



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

WERUSKA BRASILEIRO FERREIRA

**APROVEITAMENTO DO CONCENTRADO DA DESSALINIZAÇÃO  
VIA OSMOSE INVERSA PARA DESENVOLVIMENTO DE  
*CHLORELLA SP* E *CHLORELLA VULGARIS* VISANDO A PRODUÇÃO  
DE BIODIESEL**

CAMPINA GRANDE  
2012

WERUSKA BRASILEIRO FERREIRA

**APROVEITAMENTO DO CONCENTRADO DA DESSALINIZAÇÃO VIA OSMOSE  
INVERSA PARA DESENVOLVIMENTO DE *CHLORELLA VULGARIS* E  
*CHLORELLA SP* VISANDO A PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

Tese apresentada ao Programa de Pós –  
Graduação em Engenharia Química da  
Universidade Federal de Campina Grande –  
UFCG, em cumprimento dos requisitos  
necessários para a obtenção do título de  
Doutor(a) em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Ph.D. Kepler Borges França

CAMPINA GRANDE - PB  
2012





FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCC

F383a Ferreira, Weruska Brasileiro.  
Aproveitamento do concentrado da dessalinização via osmose inversa para desenvolvimento de *chlorella sp* e *chlorella vulgaris* visando a produção de Biodiesel / Weruska Brasileiro Ferreira. - Campina Grande, 2012.  
147 f.: il. col.

Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia.  
Orientador: Prof. Ph. D. Kepler Borges França.  
Referências.

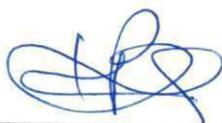
1. Microalgas - *Chlorella sp*. 2. Microalgas - *Chlorella vulgaris*.  
3. Biodiesel. 4. Lagoas *Raceway*. 4. Concentrado de Dessalinização.  
I. Título.

CDU 637.33 (043)

WERUSKA BRASILEIRO FERREIRA

APROVEITAMENTO DO CONCENTRADO DA DESSALINIZAÇÃO VIA OSMOSE  
INVERSA PARA DESENVOLVIMENTO DE *CHLORELLA VULGARIS* E *CHLORELLA*  
*SP* VISANDO A PRODUÇÃO DE BIODIESEL

**TESE APROVADA EM: 17 de fevereiro de 2012**



---

**Prof. Kepler Borges França, Ph.D**  
**Orientador**  
**(UFCG/UAEQ)**



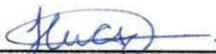
---

**Prof. Dra. Ana Cristina Silva Muniz**  
**Examinadora**  
**Interna (UFCG/UAEQ)**



---

**Prof. Dr. Ernani Sebastião Sant'Anna**  
**Examinador**  
**Externo (UFSC/ CAL)**



---

**Prof. Dra. Hélvia Waleska Casullo de Araújo**  
**Examinadora**  
**Externa (UEPB/DQ)**



---

**Prof. Dra. Marcia Isabel Cirne França**  
**Examinadora**  
**Externa (UEPB/DQ)**

## DEDICATÓRIA

*A Deus por estar comigo em todos os momentos da minha vida e por sempre guiar os meus passos.*

*Ao meu filho e meu grande amor Mikael que me fortalece a cada dia para as concretizações das minhas conquistas.*

*À minha tia Lourdinha, que é um exemplo de ser humano e que sempre me incentivou e apoiou incondicionalmente, principalmente durante as adversidades que às vezes passamos pela vida.*

*À minha mãe "in memoriam" que mesmo com o pouco tempo de convivência me deixou ensinamentos preciosos que me ajudam a manter as pessoas queridas ao meu lado e, a saber, viver com dignidade.*

*À minha avó Noemia "in memoriam" por toda dedicação a mim durante toda sua vida.*

*Amo-os profundamente!!!*

*Com amor e carinho, dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A todos da minha família, meu avô Clodoaldo, meus tios e meus sobrinhos pelo amor e constantes incentivos para o meu sucesso profissional.

Ao meu pai por sempre acreditar na vitória das minhas conquistas, pela educação e amor dedicado a mim.

Em especial ao meu irmão pelo o amor, carinho, atenção e por me compreender tão bem.

Ao meu tio Carlos Fernando que sempre acreditou na minha luta para alcançar meu sonho profissional.

Às minhas amigas de sempre Márcia Liana e Marcinha pelo apoio e amizade incontestáveis.

À minha amiga Waleska que se tornou mais que uma amiga, hoje é a minha irmã do coração, que conto com sua amizade em todos os momentos, além de puder conviver com os prazerosos momentos de descontração com seu maravilhoso humor.

Aos meus amigos Maniza e Ramom que me ajudaram na concretização desse trabalho em todas as etapas, os trabalhos de vocês foram indispensáveis para conclusão desta tese, serei eternamente grata aos dois.

À Maniza um agradecimento especial pela amizade, companheirismo e por toda sua presteza em todos os momentos que precisei.

À Jaqueline que contribuiu nos estudos realizados em Uruçu.

A meu Orientador prof. Dr. Kepler França que não apenas neste trabalho mas ao longo de toda minha vida acadêmica me ajudou com sua vasta experiência de vida e acadêmica sempre procurando contribuir com meu melhoramento profissional.

Ao meu Co-Orientador Prof. Dr. Ernani Sant'Anna que sempre com muita paciência soube sabiamente mostrar os melhores caminhos para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao professor Howard William pelos ensinamentos e apoio durante todo esse trabalho.

À banca examinadora, por aceitarem o convite apesar do pouco tempo disponível para avaliar o trabalho, mas tenho certeza que todas as correções enriqueceram bastante o trabalho final.

À Regina Coeli minha amiga que mesmo longe me orientou bastante para realização desta tese.

A todos meus amigos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização desse trabalho

A todos do LABDES pelos bons momentos de descontrações que vivemos no laboratório.

À comunidade de Uruçú que sempre nos recebeu de braços abertos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desse estudo.

## RESUMO

Os combustíveis fósseis por ser uma fonte esgotável tornaram-se uma preocupação mundial, em razão da necessidade de atender a excessiva demanda, tanto em termos industriais como em transportes. Uma das maiores preocupações atuais com relação aos combustíveis fósseis são também os efeitos danosos causados ao meio ambiente proveniente da geração dos gases que provocam o superaquecimento global. Assim sendo, esses motivos têm levado o homem à procura de novas fontes de energias renováveis. Dentro deste prisma, as oleaginosas vêm se tornando a principal fonte de biocombustíveis, porém tem sido alvo de fortes críticas, principalmente pelo uso excessivo de terras aráveis, que pode comprometer a geração de alimentos. Deste modo, outra fonte de energia renovável que não apresenta esta dificuldade é o biocombustível proveniente de microalgas. As mesmas para seu desenvolvimento necessitam de nutrientes adequados, provenientes da preparação de um meio sintético, ou de outros meios modificados, como o uso de águas residuárias domésticas, águas salobras e outros efluentes. Este trabalho estudou a viabilidade de desenvolver as microalgas *Chlorella* sp e *Chlorella vulgaris* em um meio de cultivo modificado com adição do concentrado oriundo do processo de dessalinização de água salobra via osmose inversa, a fim de avaliar a potencialidade da produção de biodiesel de microalgas em estudo. Este trabalho foi desenvolvido em duas etapas: a primeira etapa realizou estudos em escala de bancada, desenvolvido nos laboratórios LABDES/UFCG e BIOTEC/UFSC. Nesta etapa foi avaliado o crescimento celular de duas cepas da *Chlorella* sp (TU1 e TU3) e de uma cepa da *Chlorella vulgaris* cultivadas no meio de cultura *Bold's Basal Medium* (BBM). Os cultivos foram realizados a 26°C, sob iluminação de 5klux e fotoperíodo de 12 horas, com agitação contínua. A *Chlorella vulgaris* apresentou maior produtividade celular atingindo o máximo crescimento celular com  $5,9 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup> e lipídica com teor de 8,56%, no perfil de ácidos graxos analisado via cromatografia gasosa foi obtido 34,68% de ácidos graxos saturados. Os estudos seguiram com meios de cultura modificados pela adição do concentrado. A faixa que apresentou melhores resultados de crescimento celular, produtividade e produção lipídica foi com adição ao meio de cultura de 10 a 25% do concentrado. Com 25% do concentrado ao meio de cultura que correspondeu a uma condutividade de  $1.622 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$  e com SDT aproximado de  $1.054,30 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , foi obtido uma densidade celular de  $4,7 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup>, que alcançou teor de lipídios de 9,76% com 40,57% de ácidos graxos saturados, os teores de carboidratos e proteínas não sofreram alterações com relação ao cultivo em 100% de BBM. A separação da biomassa por meio da floculação para este tipo de célula foi ineficiente devido a grande perda da biomassa. O processo de separação utilizando membranas por microfiltração apresentou melhor eficiência. A segunda etapa deste trabalho foi desenvolvida em lagoas *raceway* de 4000L, localizada na comunidade de Uruçu, distrito do município de São João do Cariri-PB. Os resultados obtidos nestas lagoas não foram satisfatórios, apresentaram lipídios de 2,88%, com decréscimo também nas proteínas e carboidratos, em razão principalmente das variações de temperatura e luminância. O cultivo a céu aberto mostrou alta complexidade para operar nas condições climáticas locais o que prejudicou o desenvolvimento celular. Porém, em condições de fotobioreatores de escala laboratorial, o uso do concentrado apresentou viabilidade, pois promoveu excelente desenvolvimento celular além de manter altos valores de carboidratos e proteínas, exceto para os ácidos graxos, mostrando assim a possibilidade de minimizar os impactos ambientais causados pelo concentrado.

**Palavras-chave:** Microalga *Chlorella* sp. Microalga *Chlorella vulgaris*. Biodiesel. Lagoas *Raceway*. Concentrado da dessalinização.

## ABSTRACT

Fossil fuels to be an inexhaustible source became a worldwide concern because of the need to meet excessive demand both in industrial and transportation. A major concern with current fossil fuels is the harmful/hazardous environmental effect it causes by the generation of gases that cause global overheating warming. These reasons this concern have led man looking for new sources of renewable energy. In this regard, oilseeds have become the main source of biofuels, though it has been under heavy criticism mainly because of the excessive use of arable land that would compromise the generation production of food. Another source of renewable energy that does not present this difficulty is biofuel from microalgae. The (microalgae) need adequate nutrients for development. These nutrients can be from the preparation of a synthetic or supplied form other sources, such as the use of domestic wastewater, brackish waters and other waste. This study examined the feasibility of (growing) microalgae *Chlorella* sp and *Chlorella vulgaris* in a modified culture medium with addition of the concentrate product from the process of desalination of brackish water via the reverse osmosis in order to evaluate the potential production of the biodiesel microalgae studied. This study was conducted in two stages: the first step carried out studies in a bench scale, developed in the LABDES/UFCG and BIOTEC/UFSC laboratories. In this step, two strains of *Chlorella* sp (TU1 and TU3) and a strain of *Chlorella vulgaris* were grown in culture medium Bold's Basal Medium (BMB) and there growth assessed. The culture was carried out at 26 C under illumination 5klux and a photoperiod of 12 hours with continuous stirring. *Chlorella vulgaris* showed higher productivity growth, reaching a maximum cell growth of  $5.9 \times 10^7 \text{ cel. mL}^{-1}$  with lipid content of 8.56%. In the fatty acid profile analyzed by gas chromatography, 34.68% of the fatty acids were saturated. The studies followed with culture media modification by addition of the concentration. The track showed a better cell growth yield and with lipid was added to the culture medium 10-25% of the concentrate. 25% of the concentrate to in the culture medium corresponded to a conductivity of  $1.622 \mu\text{S. cm}^{-1}$  and approximately  $1054.30 \text{ mg. L}^{-1}$  SDT. A cell density of  $4.7 \times 10^7 \text{ cel. mL}^{-1}$  was obtained, which had a lipid content of 9.76%, 40.57% saturated fatty acids, the levels of carbohydrates and proteins remained unchanged with respect to culture in 100% of BBM. The separation of the cell type by means of flocculation was inefficient due to the great loss of biomass. The separation process by microfiltration membranes showed better efficiency. The second stage of this work was developed in raceway ponds of 4000L, Uruçu located in the community, district of the ray tracing-PB. The results obtained in these ponds were not satisfactory. The lipids contents were 2.88%, there was also a decrease in protein and carbohydrates concentrations, mainly due to variations in temperature and luminance. The culture in the open proved highly complex to operate in local weather conditions which hampered cell development. However, under conditions of a laboratory scale photobioreactors, the use of the concentrate was viable because it provided excellent cell growth while maintaining high values of carbohydrates and proteins, except for fatty acids, thus showing the possibility of minimizing the environmental impacts caused by concentrated.

**Keywords:** *Chlorella* sp. *Chlorella vulgaris*. Biodiesel. Raceway ponds. Concentrate desalination.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fluxo osmótico	24
Figura 2	Equilíbrio osmótico	24
Figura 3	Osmose inversa	24
Figura 4	Sistema de um processo de Dessalinização de Água por osmose inversa (OI)	25
Figura 5	Percentual de empresas mundiais que cultiva microalgas para obtenção de óleo	31
Figura 6	Representação esquemática de taxa de crescimento de algas em cultura (linha sólida) e a concentração de nutrientes (linha tracejada) em função de um período de tempo	36
Figura 7	Tanques de cultivos de microalgas em lagoas abertas para fins comerciais	47
Figura 8	Tipos de fotobioreatores	48
Figura 9	Esquema de fotobioreator	49
Figura 10	Percentual dos sistemas de cultivo de microalgas mundialmente para produção de biodiesel	53
Figura 11	Fluxograma dos componentes típicos das microalgas	54
Figura 12	Esquema 1 de diagramas que apresenta o processo biotecnológico das microalgas	65
Figura 13	Conversões energéticas utilizando a biomassa algal	66
Figura 14	Fontes de aproveitamento comerciais com o cultivo das microalgas	70
Figura 15	Reação de transesterificação de Triglicerídeos	81
Figura 16	Fluxograma das sequências dos procedimentos experimentais em etapas	82
Figura 17	Fotomicrografia da <i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Chlorella sp.</i>	84
Figura 18	Cepário para cultivo das microalgas localizado LABDES-UFCG	85
Figura 19	Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> em escala laboratorial em fotobioreatores de 2L em cepário climatizado	86
Figura 20	Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> em escala laboratorial nos fotobioreatores de fibra de vidro de 50L	87
Figura 21	Sistema de separação de biomassa por membranas de microfiltração	89
Figura 22	Sistema de dessalinização por osmose Inversa da comunidade de Urucu	90
Figura 23	Layout do tanque <i>raceway</i>	91
Figura 24	Fotobioreatores de 120L com cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i>	92
Figura 25	Fotobioreatores de 120L com cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> no volume máximo para inoculação	92
Figura 26	Tanque <i>raceway</i> com 2000L de meio de cultura BBM	93
Figura 27	Tanque <i>raceway</i> com 2000L de meio de cultura BBM e 200L de inoculo	94
Figura 28	Sedimentador em fibra de vidro de 3000L da biomassa após cultivo em fibra de vidro	95
Figura 29	Biomassa seca da <i>Chlorella vulgaris</i> em cultivo <i>raceway</i>	96
Figura 30	Processo de separação da biomassa por membrana de osmose inversa	97
Figura 31	Secagem da biomassa após separação por membranas	97

Figura 32	Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> em 100% de BBM sem adição de concentrado em reatores de 2000mL	101
Figura 33	Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> em 100% de BBM sem adição de concentrado em fotobioreatores de 50L	102
Figura 34	Cultivo de <i>Chlorella sp</i> (cepa TU1) em 100% de BBM em reatores de 2000mL sem adição de concentrado	103
Figura 35	Cultivo de <i>Chlorella sp</i> (cepa TU3) em 100% de BBM em reatores de 2000mL sem adição de concentrado	103
Figura 36	Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> em reatores de 2000mL com meio de cultura contendo 75% de BBM e 25% de concentrado	104
Figura 37	Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> em fotobioreatores com meio de cultura contendo 90% de BBM e 10% de concentrado	105
Figura 38	Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> em fotobioreatores com meio de cultura contendo 80% de BBM e 20% de concentrado	106
Figura 39	Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> em fotobioreatores com meio de cultura contendo 75% de BBM e 25% de concentrado.	106
Figura 40	Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> em fotobioreatores com meio de cultura contendo 70% de BBM e 30% de concentrado	107
Figura 41	Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> em fotobioreatores com meio de cultura contendo 65% de BBM e 35% de concentrado	107
Figura 42	Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> em fotobioreatores com meio de cultura contendo 60% de BBM e 40% de concentrado	108
Figura 43	Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> em fotobioreatores com meio de cultura contendo 55% de BBM e 45% de concentrado	108
Figura 44	Cultivo <i>Chlorella vulgaris</i> em 100% de BBM com contaminação	112
Figura 45	Cultivo <i>Chlorella vulgaris</i> em 100% BBM com contaminação	112
Figura 46	Cultivo da <i>Chlorella vulgaris</i> com aumento em 50% da concentração de Fe ao meio de cultura	113
Figura 47	Cultivo da <i>Chlorella vulgaris</i> com redução de 50% na concentração de nitrato ao meio de cultura BBM	114
Figura 48	Variação clorofila-a para o cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> com diferentes teores de concentrado	115
Figura 49	Cultivo da <i>Chlorella vulgaris</i> . (cepa- FURG) com adição de 25% de concentrado ao meio de cultura e 75% de BBM	121
Figura 50	Cultivo da <i>Chlorella sp</i> (cepa- TU3) com adição de 25% de concentrado ao meio de cultura e 75% de BBM	121
Figura 51	Concentração de clorofila-a em função do tempo de processamento por membranas de microfiltração para separação de <i>Chlorella vulgaris</i>	123
Figura 52	Tanques Raceway com desenvolvimento de <i>Chlorella vulgaris</i>	124
Figura 53	Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> em tanque <i>Raceway</i> com 100% de BBM	125
Figura 54	Cultivo no início da fase estacionária	125
Figura 55	Tanque <i>raceway</i> com cultivo de <i>C. vulgaris</i> sem desenvolvimento	126
Figura 56	Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> em tanques <i>raceway</i> em 25% de concentrado e 75%BBM	128
Figura 57	Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> em tanques <i>raceway</i> em 25% de concentrado e 75%BBM no período de inverno	129

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Concentração média da biomassa microalgal, concentração máxima da biomassa, produtividade e conteúdo de lipídios em base seca	34
Tabela 02	Composição Química de várias espécies de microalgas	35
Tabela 03	Comparação dos métodos de produção de microalgas para biocombustível em fotobioreatores e <i>raceway</i>	51
Tabela 04	Comparação entre os diversos aspectos dos tanques <i>raceway</i> e fotobioreatores	52
Tabela 05	Comparação das algas com diferentes culturas na produção de biocombustível	56
Tabela 06	Conteúdo em óleo de algumas microalgas	57
Tabela 07	Produtividade de biomassa e lipídica de diversas espécies de microalgas	58
Tabela 08	Produção de microalgas atualmente e potencial comercial	71
Tabela 09	Produtividade da biomassa em peso seco com variação na concentração de sais	110
Tabela 10	Avaliação do desenvolvimento das microalgas para diferentes aclimações	116
Tabela 11	Composição química da biomassa seca de <i>Chlorella vulgaris</i> para diversas condições de cultivo com adição do concentrado ao BBM	117
Tabela 12	Perfil de ácido graxo determinado por cromatografia gasosa da espécie <i>Chlorella vulgaris</i> em meio básico BBM sem adição de concentrado	118
Tabela 13	Perfil de ácido graxo determinado por cromatografia gasosa da espécie <i>Chlorella vulgaris</i> em meio básico BBM com adição de 25% de concentrado	120
Tabela 14	Composição química do cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> em tanques <i>raceway</i>	130

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG – Ácidos graxos

AOAC- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS -

AIE – Agência Internacional de Energia

BBM- *Bold's Basal Medium*

BIOTEC - Laboratório de Biotecnologia Alimentar

CAL – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos

CERB – Engenharia Rural da Bahia

COMPESA – Companhia Pernambucana de Saneamento

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

CV – Destilação por Compressão de Vapor

cv – Cavalo a vapor

ED – Eletrodialise

EUA – Estados Unidos da América

LABDES – Laboratório de referência em dessalinização

MED – Destilação Múltiplo Efeito

MSF – Destilação Flash com Múltiplos Estágios

OI – Osmose Inversa

pH – potencial hidrogeniônico

ppm – partes por milhão

PUFAs – Ácidos graxos poli-insaturados

SDT - sólidos dissolvidos totais

TAG – Triglicerídeos

TU – Tanque de Uruçu de peixes

UAEQ – Unidade Acadêmica de Engenharia Química

UFCG – Universidade Federal de Campina de Grande

FURG - Universidade Federal do Rio Grande

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

UV – Ultravioleta

## LISTA DE SÍMBOLOS

- ACCE – acetil – CoA carboxilase
- ATP – Trifostato de adenosina
- BBM – *Bold's Basal Medium*
- CH<sub>4</sub> – Metano
- CoA – acetil coenzima A
- CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono
- CO<sub>3</sub><sup>-</sup> – Carbonato
- DHA – ácido docosahexaenóico
- DPA – ácido docosapentaenóico
- EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EPA – ácido eicosapentaenóico
- EPA- 20:5 n3 - Ácido eicosapentaenoico
- Fe - Ferro
- FURG – Universidade Federal do Rio Grande
- GAP – gliceraldeído-fósforo
- HBO<sub>3</sub>-ácido bórico
- HCl - ácido clorídrico
- HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Bicarbonato
- HPO<sub>4</sub><sup>3--</sup> Ortofosfato
- H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> . Ácido carbônico
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - ácido sulfúrico
- K – Potássio
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> . Hidrogenofosfato de potássio
- LABCAL – Laboratório de Físico-Química
- Mg – Magnésio
- N – Nitrogênio
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – Carbonato de sódio

$\text{NaHCO}_3$  – Bicarbonato de sódio

$\text{NH}_4\text{Cl}$  – Cloreto de amônio

$\text{NO}_3^-$  - Nitrato

$\text{NO}_2^-$  - Nitrito

$\text{NO}_x$  – Óxidos de nitrogênio

$\text{NH}_3$  – amônia

$\text{NH}_4^+$  - Íon amônio

$\text{NaNO}_3$  – Nitrato de sódio

$\text{NaCl}$  – Cloreto de sódio

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - sulfato de amônia

P – Fósforo

PVC – Policloreto de vinila

S – Enxofre

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	16
2	OBJETIVOS .....	19
2.1	OBJETIVO GERAL .....	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	20
3.1	ÁGUAS SUBTERRÂNEAS E SUAS CARACTERÍSTICAS NO SEMIÁRIDO .....	20
3.2	PROCESSOS DE DESSALINIZAÇÃO POR MEMBRANAS.....	22
3.2.1	<b>Osmose inversa</b> .....	24
3.2.1.1	Equações características do processo de osmose inversa.....	26
3.3	MICROALGAS.....	29
3.3.1	<b>Histórico</b> .....	29
3.3.2	<b>Produção mundial de microalgas</b> .....	30
3.3.3	<b>Crescimento das microalgas</b> .....	36
3.4	<i>CHORELLA VULGARIS</i> .....	37
3.4.1	<i>Chlorella vulgaris e Chlorella sp</i> : características e classificação.....	37
3.4.2	<b>Principais fatores relacionados ao cultivo de microalgas – <i>Chlorella sp.</i></b> .....	38
3.4.2.1	Luminosidade dos cultivos .....	39
3.4.2.2	Temperatura.....	40
3.4.2.3	Agitação e aeração nos cultivos .....	40
3.4.2.4	Condições de pH .....	41
3.4.3	<b>Meios de cultura e fontes nutricionais</b> .....	41
3.4.4	<b>Tipos de cultivos</b> .....	44
3.4.5	<b>Sistemas de produção de microalgas</b> .....	46
3.4.5.1	Comparativo entre tanques abertos e fotobioreatores.....	50
3.4.6	<b>Viabilidade para produção das microalgas</b> .....	53
3.5	MICROALGAS COMO FONTE DE PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEL.....	54
3.5.1	<b>Produção de lipídios por microalgas</b> .....	58
3.5.1.1	<b>Biossíntese de lipídios</b> .....	60
3.5.1.1.1	<i>Formação de ácidos graxos e alongação da cadeia carbônica</i> .....	61
3.5.1.1.2	<i>Formação de triacilgliceróis</i> .....	61
3.5.1.1.3	<i>A influencia do nitrogênio na produção de lipídios</i> .....	61
3.5.1.1.4	<i>A influencia do ferro na produção de lipídios</i> .....	62
3.5.1.1.5	<i>A influencia do fósforo da produção de lipídios</i> .....	63
3.5.1.1.6	<i>A influencia do silício da produção de lipídios</i> .....	63
3.5.1.1.7	<i>A influencia de uma fonte de carbono na produção de lipídios</i> .....	64
3.6	OUTRAS APLICAÇÕES DAS MICROALGAS.....	65
3.6.1	<b>Geração de energia a partir das microalgas</b> .....	66
3.6.2	<b>Bioetanol</b> .....	67
3.6.3	<b>Biometano</b> .....	68
3.6.4	<b>Outras aplicações através do extrato das microalgas</b> .....	71
3.6.4.1	Químicos finos a partir das microalgas .....	71
3.6.4.1.1	<i>Ácidos graxos poli-insaturado</i> .....	71
3.6.4.1.2	<i>Caratenóides</i> .....	73

3.7	PROCESSOS DE SEPARAÇÃO DA BIOMASSA DO MEIO DE CULTIVO .....	74
3.7.1	<b>Separação por floculação e agregação ultrassônica</b> .....	76
3.7.2	<b>Separação por flotação</b> .....	76
3.7.3	<b>Separação por gravidade e centrifugação</b> .....	77
3.7.4	<b>Separação por filtração</b> .....	77
3.8	BIODIESEL .....	78
3.9	TECNOLOGIAS PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL.....	80
4	<b>PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS</b> .....	82
4.1	PRIMEIRA ETAPA: ESCALA DE LABORATÓRIO(CULTIVO DAS MICROALGAS <i>CHLORELLA VULGARIS</i> E <i>CHLORELLA SP.</i> ) .....	83
4.1.1	<b>Meio de cultura</b> .....	84
4.1.2	<b>Condições de cultivo nas duas fases laboratoriais</b> .....	84
4.1.3	<b>Estudo do crescimento celular da <i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Chlorella sp.</i></b> .....	87
4.1.3.1	Determinação da densidade celular: contagem de células em câmara de Neubauer.....	87
4.1.3.2	Tempo de cultivo.....	88
4.1.3.3	Produtividade celular .....	88
4.1.4	<b>Separação e coleta da biomassa</b> .....	88
4.1.5	<b>Secagem da biomassa</b> .....	89
4.1.6	<b>Características físico – químicas do concentrado do dessalinizador de osmose inversa</b> .....	90
4.2	SEGUNDA FASE: DESENVOLVIMENTO DAS ATIVIDADES PILOTO.....	91
4.2.1	<b>Construção do tanque “raceway”</b> .....	91
4.2.2	<b>Cultivo nos tanque pilotos <i>raceway</i></b> .....	92
4.2.3	<b>Separação gravitacional e coleta da biomassa</b> .....	94
4.2.3.1	Secagem da biomassa separada por sedimentação.....	95
4.2.4	<b>Separação por membranas e coleta da biomassa</b> .....	96
4.2.5	<b>Secagem da biomassa separada por processo de membranas</b> .....	97
4.2.6	<b>Determinação da composição química da biomassa seca</b> .....	98
4.2.6.1	Quantificação de lipídios totais e perfil de ácidos graxos .....	98
4.2.6.2	Proteínas totais.....	99
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	100
5.1	CULTIVO EM ESCALA DE LABORATÓRIO E PILOTO .....	100
5.2	SEPARAÇÃO DAS MICROALGAS POR MEMBRANA DE MICROFILTRAÇÃO.....	122
5.3	CULTIVO EM TANQUES RACEWAY.....	124
6	<b>PERSPECTIVA</b> .....	132
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	133
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	135
	<b>ANEXO A - LAUDO DO LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA EM DESSALINIZAÇÃO</b> .....	145

## 1 INTRODUÇÃO

O mundo com o uso excessivo dos combustíveis fósseis pelas indústrias e principalmente pelo setor de transporte faz com que se viva uma dupla crise mundial que é a escassez das fontes de combustíveis fósseis e a degradação ambiental.

Desta forma, seja pelos efeitos negativos causados ao meio ambiente ou esgotamento das reservas de combustíveis fósseis, é imprescindível e urgente à procura de fontes energéticas alternativas que sejam de custo competitivo com as atuais fontes de energia existente, como também serem renováveis, biodegradáveis, de produção limpa e não tóxicas. Dentro desse prisma, destacam-se os biocombustíveis que constituem recursos biodegradáveis, renováveis e estão associados com várias vantagens ambientais, uma vez que permitem a redução das emissões de poluentes, principalmente os gases de efeito estufa responsáveis pelo superaquecimento global.

Atualmente o país que vem se destacando mundialmente na produção de energia limpa e renovável é o Brasil que possui em sua matriz energética 45% de energia renovável, enquanto no mundo este valor não ultrapassa a 14% (EMBRAPA, 2010).

O biocombustível que vem se destacando no cenário mundial atualmente é representado em sua maioria pelos derivados de culturas terrestres, tais como: soja, milho, cana-de-açúcar. No entanto, vem a cada dia sendo pressionado pelo mercado de alimentos devido a enorme área de terras agricultáveis necessárias para sua produção, além de contribuir também com a escassez de água potável e para a destruição das florestas no mundo.

Neste sentido, as microalgas apresentam um grande potencial em substituir essas fontes de energias derivadas das oleaginosas, pois as microalgas apresentam diversas vantagens em relação às fontes alternativas de energias renováveis, se destacando primordialmente duas vantagens que são: maior taxa de sequestro de CO<sub>2</sub> quando comparado com as plantas superiores, sendo esta a fonte de carbono utilizada nos processos bioquímicos da célula para produção de lipídios e a outra vantagem primordial é a não competição por terras aráveis, sendo o espaço para o cultivo das microalgas destinado apenas para suporte, podendo assim utilizar terras improdutivas ou degradadas. Outras vantagens também merecem que se destaquem tais como: 1) as microalgas apresentam rápido crescimento e com alta produtividade em óleo para obtenção de biodiesel (comportamento diferenciado entre as espécies); 2) utilizam águas residuais, águas salobras ou impróprias para o consumo convencional; 3) reciclagem do meio líquido, 4) a demanda de água é bem menor quando

comparada com os cultivos agrícolas, 5) pode além da extração do óleo, obter outros produtos de alto valor para as indústrias alimentícias e farmacêuticas, dentre outras.

Além do mais, o biodiesel não é a única fonte de energia renovável derivado das microalgas outras fontes energéticas podem ser obtidas como: o metano ou biogás produzido pela digestão anaeróbica da biomassa, biohidrogênio produzido pela lignina celulósica através da fermentação, bioetanol e biobutanol obtido do açúcar da biomassa por meio de fermentação (BOROWITZAKA, 1999; MALCATA, 2011).

Contudo, o potencial das microalgas dentro do estudo desse trabalho tem voltado à atenção para o contexto de produção de lipídios e a produção de outras fontes de energias alternativas, como o etanol, que podem ser incorporadas em trabalhos futuros, como um caminho ambientalmente correto para os resíduos provenientes da extração do óleo da biomassa algal, reduzindo os custos na produção de biodiesel e os impactos ambientais.

No entanto, dentro da realidade e da necessidade que o mundo vive em obter uma fonte de energia renovável, a opção de obter biocombustível por meio das microalgas torna-se mais atrativa na medida em que se aliam algumas situações problemáticas oriundas das necessidades atuais, como destino adequado para as águas residuais e ocupação de áreas impróprias para cultivo e produção de alimentos. Esta situação está bem presente na região do semiárido no Nordeste onde devido sua carência hídrica existe a necessidade da utilização de águas subterrâneas. Porém, devido às características geológicas e climáticas, além de ações antrópicas, muitos destes aquíferos apresentam águas impróprias para consumo humano devido aos altos teores de sais. Pois, conforme Baretta (2008), a concentração média de sólidos totais dissolvidos nos aquíferos cristalinos que estão presentes na região semiárida do Nordeste é de  $2.719 \text{ mg.L}^{-1}$ . Logo, para que estas águas possam ser utilizadas para o consumo humano, faz-se necessária a utilização de processos de dessalinização. No entanto, a tecnologia dominante para dessalinização da água na região semiárida é o processo por separação de membranas via osmose inversa. Contudo, estes sistemas produzem rejeitos com elevadas concentrações salinas que apresentam grande impacto ambiental, o qual presta-se sobremaneira para o cultivo de microalgas, particularmente de *Chlorella sp* e *Chlorella vulgaris*.

Diante da importância incontestável dos sistemas de dessalinização por osmose inversa na região semiárida do Brasil, atualmente é a técnica mais adequada para tornar as águas salobras em água potável. Todavia, poucos estudos vêm sendo efetuados para promover um destino adequado ao concentrado de sais gerado no processo e evitar os impactos ambientais.

comparada com os cultivos agrícolas, 5) pode além da extração do óleo, obter outros produtos de alto valor para as indústrias alimentícias e farmacêuticas, dentre outras.

Além do mais, o biodiesel não é a única fonte de energia renovável derivado das microalgas outras fontes energéticas podem ser obtidas como: o metano ou biogás produzido pela digestão anaeróbica da biomassa, biohidrogênio produzido pela lignina celulósica através da fermentação, bioetanol e biobutanol obtido do açúcar da biomassa por meio de fermentação (BOROWITZAKA, 1999; MALCATA, 2011).

Contudo, o potencial das microalgas dentro do estudo desse trabalho tem voltado à atenção para o contexto de produção de lipídios e a produção de outras fontes de energias alternativas, como o etanol, que podem ser incorporadas em trabalhos futuros, como um caminho ambientalmente correto para os resíduos provenientes da extração do óleo da biomassa algal, reduzindo os custos na produção de biodiesel e os impactos ambientais.

No entanto, dentro da realidade e da necessidade que o mundo vive em obter uma fonte de energia renovável, a opção de obter biocombustível por meio das microalgas torna-se mais atrativa na medida em que se aliam algumas situações problemáticas oriundas das necessidades atuais, como destino adequado para as águas residuais e ocupação de áreas impróprias para cultivo e produção de alimentos. Esta situação está bem presente na região do semiárido no Nordeste onde devido sua carência hídrica existe a necessidade da utilização de águas subterrâneas. Porém, devido às características geológicas e climáticas, além de ações antrópicas, muitos destes aquíferos apresentam águas impróprias para consumo humano devido aos altos teores de sais. Pois, conforme Baretta (2008), a concentração média de sólidos totais dissolvidos nos aquíferos cristalinos que estão presentes na região semiárida do Nordeste é de  $2.719 \text{ mg.L}^{-1}$ . Logo, para que estas águas possam ser utilizadas para o consumo humano, faz-se necessária a utilização de processos de dessalinização. No entanto, a tecnologia dominante para dessalinização da água na região semiárida é o processo por separação de membranas via osmose inversa. Contudo, estes sistemas produzem rejeitos com elevadas concentrações salinas que apresentam grande impacto ambiental, o qual presta-se sobremaneira para o cultivo de microalgas, particularmente de *Chlorella sp* e *Chlorella vulgaris*.

Diante da importância incontestável dos sistemas de dessalinização por osmose inversa na região semiárida do Brasil, atualmente é a técnica mais adequada para tornar as águas salobras em água potável. Todavia, poucos estudos vêm sendo efetuados para promover um destino adequado ao concentrado de sais gerado no processo e evitar os impactos

Barreta (2008) estudou o aproveitamento econômico dos sais provenientes do rejeito salino dos sistemas de dessalinização de osmose inversa, em especial a exploração do magnésio presente em elevadas concentrações no concentrado apresentando elevado potencial econômico. Mas, em razão das pequenas vazões nos sistemas analisados não foi possível obter elevados volumes dos sais de magnésio em curto espaço de tempo inviabilizando os ganhos econômicos.

Alguns estudos estão voltados para a criação de peixes com alta capacidade de absorção de sais, como as tilápias. Porém, os efluentes gerados nesses processos principalmente quando se faz o uso de ração, podem causar sérios danos ambientais tanto ao solo como aos corpos hídricos.

Também vem realizando o cultivo de ervas sal, *atriplex*, que tem um elevado poder de reter sais, mas ao lançar o resíduo líquido salino gerado pelo dessalinizador, este pode não ser absorvido totalmente pelas ervas sal e provocar possível infertilização no solo.

Mas, alguns processos de aproveitamento do concentrado vêm obtendo sucesso como é o caso do cultivo hidropônico com o uso do concentrado, porém, ainda existe a preocupação com os resíduos líquidos gerados por esta técnica, caso os mesmos não sejam tratados adequadamente podem trazer danos ambientais. Além, de as espécies cultivadas via hidroponia ter um teor de tolerância aos sais limitando assim o uso de maior quantidade do concentrado.

Assim sendo, o presente trabalho apresenta uma proposta inédita para utilização do concentrado na produção de microalgas em tanques *raceway* na própria fonte geradora do concentrado.

Dentre as microalgas existentes que se adaptam bem a elevadas concentrações de sais, destaca-se a *Chlorella sp* e *Chlorella vulgaris*, além da vantagem de adaptabilidade aos sais, esta microalga possui ácidos graxos em sua biomassa com potencial para produção de biocombustível e também apresenta alta produtividade celular, favorecendo desta forma um maior sequestro de carbono durante seu processo de crescimento, caracterizando-se assim como uma das microalgas adequadas para a produção de biodiesel na região semiárida do Nordeste, onde é comum o uso de dessalinizadores de osmose inversa para produção de água potável.

Portanto, este trabalho pretende fornecer subsídios para viabilizar a produção de biodiesel a partir de microalgas no semiárido do Nordeste da Paraíba tendo como base os meios de cultivos do concentrado (rejeito) dos dessalinizadores utilizando as microalgas *Chlorella vulgaris* e/ou *Chlorella sp*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar e viabilizar o crescimento de *Chlorella vulgaris* e *Chlorella sp* em escala laboratorial e em lagoas *Raceway* em meios de cultura modificados com o reuso do concentrado a partir do processo de dessalinização via osmose inversa com o intuito de analisar a viabilidade para produção de biocombustível a partir da *Chlorella vulgaris* e *Chlorella sp*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Selecionar e adaptar cepas apropriadas de *Chlorella vulgaris* e *Chlorella sp* para crescimento em águas com moderada salinidade;
- b) Padronizar o concentrado através da operacionalização do dessalinizador de osmose inversa por meio das análises físico-químicas das águas dessalinizada e concentrado;
- c) Otimizar meios de cultivo em escala de laboratório para o crescimento de *C. vulgaris* *Chlorella sp*;
- d) Verificar rendimentos, densidade celular, produtividade e clorofila-a em biomassa frente ao meio de cultivo modificado;
- e) Verificar os teores de lipídios, proteína e carboidratos da biomassa obtida;
- f) Verificar o perfil de ácidos graxos da biomassa;
- g) Viabilizar o crescimento de *C. vulgaris* em um tanque piloto, tipo *raceway*, de 200 m<sup>2</sup>;
- h) Estabelecer os parâmetros para cultivo a “céu aberto”;
- i) Avaliar os métodos de separação e secagem.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 ÁGUAS SUBTERRÂNEAS E SUAS CARACTERÍSTICAS NO SEMIÁRIDO

A distribuição de água no planeta, na qual observa-se que 97,5% correspondem à água salgada e o restante, à água doce. Do total de água disponível para abastecimento, somente 31,1% vêm dos rios, lagos, fontes subterrâneas e outros reservatórios (DI BERNARDO; PAZ, 2008).

Segundo Borghetti et al. (2004), a água subterrânea representa 29,9% da água doce disponível no planeta. Em alguns continentes e países, o abastecimento é efetuado, em grande parte, por esse tipo de fonte, destacando-se: Índia (80%), Europa (75%), Brasil (61%), Estados Unidos da América (51%), Ásia/Pacífico (31%) e América do Sul (29%).

As águas que se encontram no subsolo da superfície terrestre são denominadas águas subterrâneas e classificadas em águas de lençol freático e águas de lençol confinado (ou artesiano). As primeiras se encontram sob pressão atmosférica. A alimentação do lençol freático ocorre geralmente ao longo dele próprio sendo, susceptível à poluição e à contaminação decorrentes de infiltração de lixiviados contendo substâncias de interesse sanitário. Neste tipo de fonte, a turbidez e a concentração de sólidos suspensos normalmente são baixas; porém, a concentração de sólidos dissolvidos pode ser elevada, principalmente, pela presença de metais e de íons que conferem dureza à água. Sua maior desvantagem é o fato de não fornecer grande vazões e depender das variações climáticas; períodos secos prolongados que podem reduzir drasticamente a capacidade de extração.

As águas de lençol confinado (aquífero artesiano) são aqueles que se encontram limitadas por camadas impermeáveis e sujeita à pressão maior que a atmosférica. O aproveitamento dessas águas se dá por meio de poços profundos. A alimentação do lençol acontece somente no contato da formação geológica com a superfície do solo. Por suas características, pode apresentar sólidos dissolvidos de interesse sanitário. As condições climáticas pouco ou nada afetam suas características.

As minas são águas subterrâneas que surgem espontaneamente na superfície da terra em pequenas vazões, comumente, inferiores a  $2,0\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$  são menos susceptíveis à contaminação. Em geral, o escoamento acontece durante todo o ano, com vazão maior na época de chuvas e menor na época de estiagem.

As águas subterrâneas que apresentam água salobra ou salgada apresentam altas concentrações de sais, principalmente cloretos, tanto em águas do lençol freático, quanto em águas de lençol confinado (artesiano). Pelas características das águas, dificilmente podem ser tratadas nas Estações de Tratamento de águas comumente utilizadas no Brasil. Neste caso, é indispensável o uso de técnicas de dessalinização, como a osmose inversa.

Segundo o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), através da Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, considera-se água doce àquela que possui salinidade igual ou inferior a 0,5‰ (500 ppm); salobra aquela com salinidade superior a 0,5‰ e inferior a 30‰; e salina a que possui salinidade acima de 30‰ (3.000 ppm).

Os terrenos sedimentares apresentam os melhores aquíferos, e ocupam cerca de 4.130.000Km<sup>2</sup>, ou seja, aproximadamente 48% do território nacional. Os terrenos cristalinos constituem os aquíferos cárstico-fraturados e fraturados, que ocupam cerca de 4.380.000 Km<sup>2</sup>, 52% do território nacional (FERREIRA, 2008).

As bacias sedimentares, por sua vez, possuem grande volume de águas subterrâneas, porém estima-se que 70% deste volume situa-se em terras do Piauí e Maranhão. Com relação ao seu potencial hídrico, este varia de 100 km<sup>3</sup>.ano<sup>-1</sup> (Alagoas/Sergipe) até 17.500 km<sup>3</sup>.ano<sup>-1</sup> (Maranhão). De todos os estados nordestinos pertencentes à região do semiárido, o Piauí é o que fornece os maiores volumes de água (5.000 m<sup>3</sup>.hab<sup>-1</sup>.ano<sup>-1</sup>). Todos os outros, com exceção da Bahia, fornecem valores abaixo de 2.500 m<sup>3</sup>.hab<sup>-1</sup>.ano<sup>-1</sup>, sendo considerados pobres em água. Dentre eles, destacam-se a Paraíba e Pernambuco como os estados com a menor oferta hídrica, ocorrendo, no último, uma oferta de apenas 1.320 m<sup>3</sup>.hab<sup>-1</sup>.ano<sup>-1</sup> (SUASSUNA, 2005).

Normalmente os problemas da qualidade da água nos terrenos cristalinos estão fortemente relacionados à elevada salinidade que é típica dos aquíferos do cristalino do semiárido do Nordeste (FERREIRA, 2008).

No Brasil a maior parte do semiárido do Nordeste cerca de 600.000km<sup>2</sup> é constituída por terrenos cristalinos. A associação nesta região de baixas precipitações, distribuição irregular das chuvas, cobertura vegetal esparsa, especialmente no bioma caatinga, favorece o escoamento superficial em detrimento da infiltração. Assim, no cristalino do semiárido brasileiro, os poços muito comumente apresentam vazões entre 1 e 3 m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup> e elevado conteúdo salino geralmente acima dos padrões de potabilidade. Apesar disso, diversas comunidades do interior do Nordeste, esses poços constituem a única fonte de abastecimento disponível (ANA, 2005).

No Brasil, existem regiões, principalmente nos estados do Nordeste, que não dispõem de água doce suficiente para abastecimento das comunidades, especialmente na época de estiagem, de sorte que as fontes subterrâneas salinas são a única alternativa para suprir constantemente as

necessidades de água das comunidades. Neste contexto, no Estado de Pernambuco, a Companhia Pernambucana de Saneamento (COMPESA), com base nas experiências da Companhia de Engenharia Rural da Bahia (CERB), instalou 15 sistemas de dessalinização por osmose inversa em pequenas localidades, com o intuito de fornecer água potável à população. A implantação dos sistemas permitiu o aproveitamento de fontes de água alternativas e reduziu o custo no uso de carro-pipa (LINS; PINHO, 1997).

De acordo com Campos (2007), O custo do m<sup>3</sup> da água dessalinizada, para os sistemas que operam com vazões superiores a 800 litros por hora, situa-se dentro dos padrões aceitáveis de cobrança, e que a análise de custo-benefício é bastante positiva e principalmente diante dos benefícios que água dessalinizada traz como, a diminuição do índice de mortalidade infantil, a redução dos internamentos hospitalares, de infecções por diarreia, de exames laboratoriais, de gastos com remédios, dos índices de hipertensos, além de proporcionar a melhora sensível de pessoas que sofrem de problemas renais.

Em diversas localidades dos estados do Rio Grande do Norte, do Ceará, Paraíba e Bahia é comum o uso de dessalinizadores, com o intuito de aproveitar a reserva de água de poços e açudes com salinidade relativamente alta na região semiárida (concentração de cloretos na faixa de 200 a 3000mg.L<sup>-1</sup>). Segundo Oliveira e Barros (1999), apesar das possíveis dificuldades de manutenção que ocorrem nestes sistemas em pequenas comunidades, eles concluíram que a tendência futura no Nordeste do Brasil é uma maior utilização da tecnologia de dessalinização via osmose inversa, como forma de viabilizar as poucas fontes de água disponíveis na região do semiárido do Nordeste.

Em se tratando de dessalinização de água do mar, tem-se o exemplo de Fernando de Noronha, onde existe uma unidade de dessalinização por osmose inversa que dessaliniza água do mar, fornecendo água potável à ilha, projeto este implantado pelo LABDES/UFCG. A técnica de dessalinização por Osmose Inversa é difundida no mundo inteiro, por exemplo, na Arábia Saudita, em Jubal, existe uma unidade com capacidade de produzir 900 mil metros cúbicos por hora para abastecimento público e em Cingapura a técnica é utilizada para produção de água potável com custo de R\$ 0,80 (DI BERNARDO; PAZ, 2009).

### 3.2 PROCESSOS DE DESSALINIZAÇÃO POR MEMBRANAS

A tecnologia de membranas não é apenas utilizada na osmose inversa, existem outros três tipos de sistemas: microfiltração (com poros de diâmetros médios entre 0,1 e 1µm); ultrafiltração

(poros entre 0,01 e 0,1 $\mu$ m) e nanofiltração (poros do tamanho de moléculas). De todas essas, a osmose inversa é a mais eficiente eliminando as menores partículas, que são os sais dissolvidos na água – por isso somente esse processo é utilizado para tornar a água do mar própria para o consumo.

A Osmose Inversa é obtida através da aplicação mecânica de uma pressão superior à pressão osmótica do lado da solução mais concentrada, invertendo-se, desta maneira, o sentido do fluxo de solvente que atravessa a membrana.

Assim sendo, a água pura pode ser retirada de uma solução salina por meio de uma membrana semipermeável, contanto que a solução em questão se encontre a uma pressão superior à pressão osmótica relativa à sua concentração salina.

Na prática isto pode ser obtido pressionando-se a solução por meio de uma bomba e passando esta solução sob alta pressão por um vaso de pressão onde está contida a membrana, vaso este denominado de permeador.

Nos processos de dessalinização por meio de osmose inversa, o fluido atravessa a membrana em fluxo “cruzado” ou tangencial, ou seja, ocorre um contato do fluxo paralelo à área da membrana. Nos processos de dessalinização de grande escala ocorre com elementos de membranas do tipo espiral.

O módulo em espiral é composto por praticamente três camadas com funções específicas: espaçador, membrana e filme coletor.

O espaçador como o próprio nome sugere, facilita a passagem da água através do módulo, aumenta a turbulência da água na superfície da membrana auxiliando no processo de dessalinização e ajuda a carrear os sais que tendem a precipitar nas superfícies das membranas.

A membrana é o elemento responsável pela seletividade, o que vai passar através dela ou não, durante o processo de osmose inversa. E o filme coletor é responsável por captar toda a água que atravessou a membrana e direcioná-la para o tubo coletor que se encontra no centro do módulo.

A água pura e a solução agora mais concentrada são retiradas de forma contínua dos dois lados da membrana, de modo que a pressão osmótica e a concentração de sais se mantenham em nível aceitável para que o processo não seja interrompido.

A água assim obtida é denominada de produto e a solução concentrada de sais de rejeito ou concentrado.

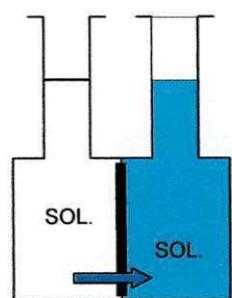
Existem diversos processos aplicados à purificação de água, mas para a dessalinização de águas, utilizam-se apenas os térmicos e com membranas. Dentre os processos térmicos tem-se:

Todos os métodos Destilação Flash com Múltiplos Estágios (MSF); Destilação Múltiplo Efeito (MED); Destilação por Compressão de Vapor (CV), já para os processos de membranas tem-se: Osmose Inversa (OI) e Eletrodialise (ED) citados apresentam vantagens e desvantagens em suas aplicabilidades e em relação aos seus custos de instalação, consumo de energia, manutenção, operação, volume de água tratada, volume de rejeito gerado, qualidade de água produzida, tempo e espaço físico utilizado (SILVA, 2008).

### 3.2.1 Osmose inversa

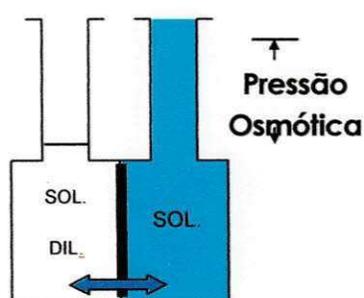
A osmose inversa é a técnica que vem consolidando no mercado para produção de água potável e ocorre quando uma pressão superior à pressão osmótica é aplicada no lado da solução mais concentrada. Quando isso ocorre, se obtém água pura a partir de uma solução salina por meio de uma membrana semi-permeável, como apresenta as Figuras 01, 02 e 03. Em processo de grande escala o fenômeno ocorre com auxílio de uma bomba de alta pressão e sob fluxo contínuo, passando por um permeador (vaso de pressão) onde fica situada a membrana.

Figura 01 - Fluxo osmótico



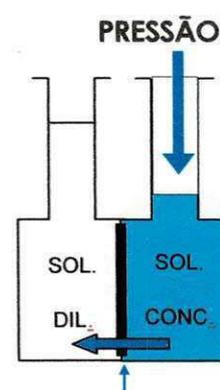
Membrana semi-permeável

Figura 02 - Equilíbrio osmótico



Membrana semi-permeável

Figura 03 - Osmose inversa



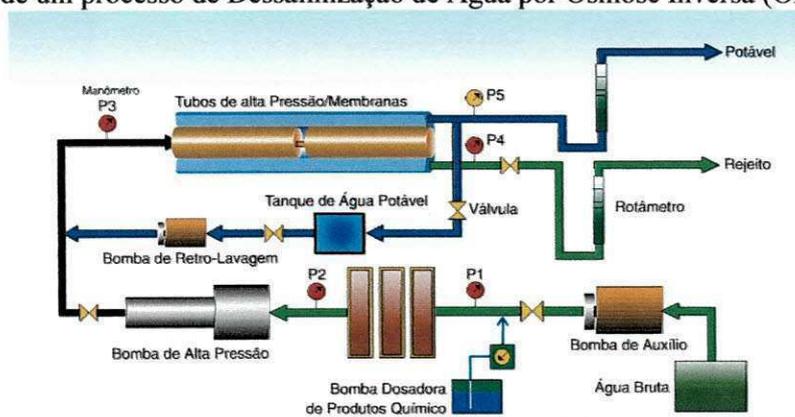
Membrana semi-permeável

A osmose inversa é utilizada para a obtenção de água com alto grau de qualidade, inclusive água para abastecimento a partir de água salina ou salobra, já que possibilita a remoção de sais dissolvidos ou moléculas inorgânicas, bem como moléculas orgânicas. A taxa de rejeição de sais inorgânicos pode variar de 95% a mais de 99%, dependendo do tipo de membrana utilizada, concentração de sais dissolvidos na corrente processada, tipo de substâncias envolvidas e condições operacionais do sistema (CONLON, 1990). Sistemas de osmose possibilitam o tratamento de águas com uma concentração de sais dissolvidos variando de  $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$  até  $34.000 \text{ mg.L}^{-1}$  (WAGNER, 2001).

A dessalinização via osmose inversa já se encontra consolidada no mundo. Em alguns lugares da Arábia Saudita ainda é utilizado o processo térmico para dessalinização de águas, mas estes vêm sendo substituídos pelos processos de membranas. Essa mudança se deve ao fato dos sistemas com membranas serem mais leves, modulares, ocuparem menor espaço, serem de fácil manuseio e manutenção, tem menor consumo de energia e o custo do produto é inferior (AMJAD et al., 1992).

A Figura 04 apresenta a configuração típica de um sistema de dessalinização via osmose inversa, que é composto por módulos de membranas de baixa porosidade alojadas em dutos de alta pressão, composto por duas bombas uma auxiliar que inicia o funcionamento do sistema e a bomba de alta pressão é responsável pela permeação da água salobra sobre as membranas. A água inicialmente é filtrada em um sistema de filtros de acetato celulose para remover o material em suspensão com o intuito de conservar a membrana de osmose inversa. A bomba dosadora no sistema em questão tem a função de efetuar o pré-tratamento químico e impedir a incrustação nas membranas.

Figura 04 - Sistema de um processo de Dessalinização de Água por Osmose Inversa (OI)



Fonte: França (2007)

Pilat (2001) fala que o processo de dessalinização de águas com membranas tem maior vantagem no que se refere ao projeto instalado com perspectiva de futura ampliação, vantagem na venda de serviços pelas empresas executoras; possui baixo consumo de energia comparado aos outros processos de dessalinização, o que faz com que o custo do produto final seja reduzido, facilidade na construção, operação e manutenção, sua rejeição de sais chega a 99,5% e maior que 99,9%, para algumas espécies químicas; 100% de rejeição de microorganismos, outra vantagem que vem sendo aplicada é a utilização do rejeito gerado durante o processo para ser utilizado na irrigação de plantas halófitas do tipo *atriplex nummularia* e no cultivo de espécies de hortaliças por meio hidropônico, como também em tanques de viveiros de peixes que se adaptam a altas salinidades tais como a tilápia rosa e na obtenção de sais para o consumo animal.

O processo de dessalinização por osmose inversa, como qualquer outra operação unitária, obedece às conservações de massa e energia.

Para que o processo ocorra com sucesso, muitas vezes se faz necessário à modelagem, ou uma simulação do processo, resultando-se, desta maneira, no cálculo de vazões, pressões de operação, fluxo de permeado e concentrado, coeficientes de transferência de soluto e solvente, recuperação do sistema, dentre outras equações que possam tornar o processo o mais real. Assim, serão listadas as principais equações de maior interesse neste trabalho.

### 3.2.1.1 Equações características do processo de osmose inversa

#### *Rejeição de sais(RS)*

A Rejeição de Sais (RS) fornece a capacidade da membrana de rejeitar os sais dissolvidos durante a permeação da água.

$$RS(\%) = \frac{C_a - C_p}{C_a} \cdot 100 \quad (1.0)$$

Onde: RS é a rejeição de sais,  $C_a$  é a concentração de alimentação ( $\text{mg.L}^{-1}$ ),  $C_p$  é a concentração do permeado ( $\text{mg.L}^{-1}$ ).

### *Recuperação do sistema*

A recuperação do sistema refere-se à razão da água de alimentação convertida em água purificada e depende de vários fatores, como a formação de *Scaling* na superfície das membranas, a pressão osmótica, temperatura da água da alimentação e a qualidade do permeado.

$$r(\%) = \frac{Q_p}{Q_a} \cdot 100 = \frac{Q_p}{Q_p + Q_r} \cdot 100 \quad (2.0)$$

Onde:  $r$  é a recuperação do sistema,  $Q_p$  é a vazão da água produzida,  $Q_a$  é a vazão da água de alimentação e  $Q_r$  é a vazão da água de rejeito, ambas em L/min.

Com o aumento da recuperação do sistema, mais água é convertida em produto. Isto reduz o volume da água a ser rejeitada e, conseqüentemente, aumenta a concentração de sais dissolvidos na corrente do concentrado, assim como a possibilidade de incrustação dos elementos de membranas.

### *Concentração de sais*

Quanto à concentração de sais dissolvidos na corrente do rejeito pode ser calculada com o auxílio da seguinte equação:

$$C_r = \frac{C_a}{1 - R} \quad (3.0)$$

Onde:  $C_r$  = concentração de sais dissolvidos na corrente de rejeito ( $\text{mg.L}^{-1}$ ),  $C_a$  = concentração de sais dissolvidos na corrente da alimentação ( $\text{mg.L}^{-1}$ ),  $R$  = nível de recuperação do sistema (%).

A qualidade das águas do afluente e dos efluentes do sistema de dessalinização é monitorada através de análises físico-químicas. Nos procedimentos de campo, a qualidade da água geralmente de forma superficial é avaliada através de aparelhos como condutímetro e pHmetro. Uma vez que, a condutividade indicará de forma aproximada, a concentração de sais da água.

A qualidade da água dos efluentes do dessalinizador não permeados geralmente apresenta elevadas concentrações de sais que irá depender da salinidade presente no afluente e da taxa de recuperação do equipamento.

Em razão desta característica de concentrações elevadas de sais do efluente não permeado ou rejeito do dessalinizador, vem se estudando técnicas de minimizar o impacto ambiental gerado pelo seu lançamento a céu aberto como comumente é efetuado principalmente nas comunidades rurais, podendo provocar a infertilidade dos solos.

Como citado por Pinho (2009), estudos demonstraram que o rejeito lançado ao solo é absorvido, e o próprio aquífero de onde provém o afluente pode ser contaminado por diversos agentes químicos utilizados no pré-tratamento do processo, além de aumentar sua dureza e salinidade devido à alta concentração dos sais. As altas concentrações de sódio, cloro e boro reduzem a produtividade do solo e suas plantas.

Sabe-se que o uso prolongado do concentrado pode ser prejudicial ao solo, podendo causar erosão da estrutura do mesmo, além de afetar a produtividade. Como consequência, o uso da terra torna-se não sustentável, em longo prazo. (HUSSAIN et al., 2002).

Conforme relatado por Pinho (2009) é imprescindível à implantação de um processo que minimize os impactos ambientais negativos nas áreas onde ocorrem os processos de dessalinização para que assim possa oferecer a sustentabilidade desta tecnologia que tem como objetivo principal a produção de água potável. Mohamed, Maraqa e Al Handhal (2005) e Jordan et al. (2009) citam a necessidade da aplicação de regulamentações quanto à qualidade dos rejeitos lançados no meio ambiente e apontam as seguintes alternativas técnicas para este problema:

- a) Ajustes nos mecanismos de evaporação na dessalinização térmica: o tamanho do tanque de evaporação influi na taxa de produção do concentrado;
- b) Conversões químicas: há possibilidade de produzir compostos químicos a partir do resíduo, por exemplo:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$  e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  obtidos a partir do  $\text{NaCl}$  presente no concentrado;
- c) Aplicações em biotecnologia: o resíduo pode ser utilizado na irrigação de *Atriplex lentiformis*, uma planta que ocorre naturalmente em solos alcalinos e é adaptada a alta salinidade. Que podem ser utilizadas principalmente como ração para caprinos;
- d) A alta salinidade e alcalinidade, aliado a disponibilidade de altas temperaturas e radiação solar típicas das áreas onde dessalinização é realizada, podem constituir uma forma de produção tilápias e produção de microalgas como a *Spirulina* e outras

espécies com potencial para produção de bicomcombustível que se adaptem bem a altas concentrações de sais, gerando assim produtos de alto valor comercial.

### 3.3 MICROALGAS

#### 3.3.1 Histórico

A cultura com algas teve início em 1919, com a introdução de *Chlorella sp.* verificando-se que certas algas podiam duplicar-se com muita velocidade e que sua matéria seca podia duplicar-se com muita velocidade e que sua matéria seca podia conter 50% de proteína. Os primeiros testes de produção em grande escala foram realizados na Alemanha em 1942, mas o grande interesse no assunto instalou-se apenas nos anos 50 e progrediu rapidamente. Durante a segunda guerra mundial a *Chlorella sp.* também foi investigada por pesquisadores alemães devido ao potencial em duplicar sua biomassa algumas vezes por dia em laboratório com iluminação adequada, sendo que a mesma proporcionaria uma estocagem de fontes de alimentos, principalmente de proteínas (BORGHETTI; BORGHETTI J.R; ROSA FILHO,2004).

O cultivo de microalgas com produção em larga escala foi iniciada em 1960 no Japão por Nikon Chlorella com a cultura de *Chlorella sp.* Em 1970 a *Arthrospira platensis* foi cultivada em larga escala no Lake Texcoco, México e em 1977 na Tailândia. Por volta de 1980, 46 indústrias produziam cerca de uma tonelada de *Chlorella* por mês na Ásia. As microalgas têm um interesse comercial muito grande em razão dos seus bioprodutos com potencial nutricional de alto valor comercial, como por exemplo, a astaxantina pigmento produzido por determinadas espécies de microalgas utilizadas como antioxidante e como corantes de alimentos que custa em torno de US\$3milhões por tonelada (WILLAMS; LAURENS, 2010).

### 3.3.2 Produção mundial de microalgas

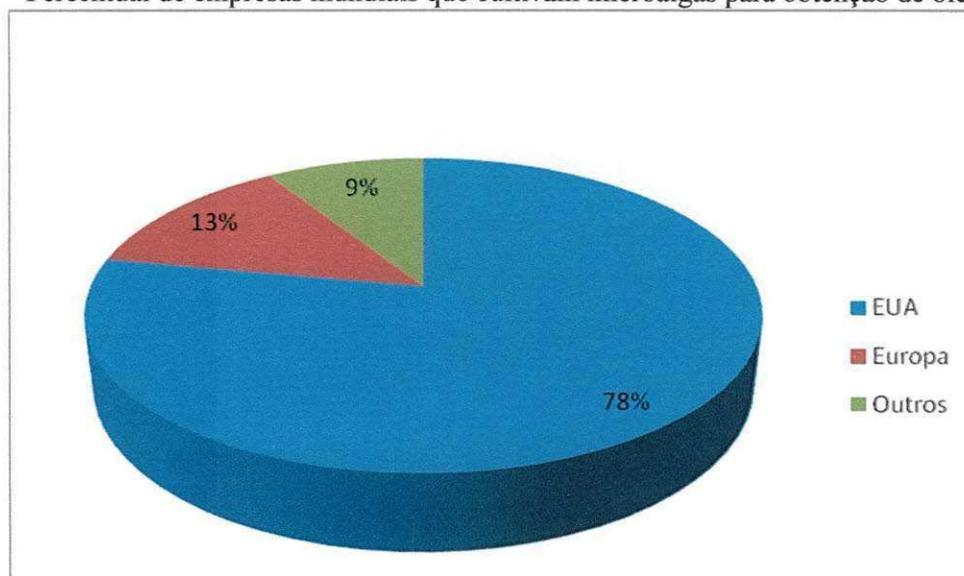
A Europa vem investindo em grandes projetos para produção de microalgas, como o projeto da *Carbon Trust* que investiu 26 milhões de euros para implantação de grandes fazendas de cultivo de microalgas no norte da África. Em 2009 a *Carbon Trust* investiu mais 8 milhões de euros no projeto intitulado “*Algae Biofuels Challenge*” (ABC), atualmente este projeto é constituído por 11 instituições incluindo as universidades de Manchester, New Castle, associação escocesa para ciências marinhas entre outros. O governo escocês investiu 6 milhões de euros para o projeto chamado “Biomara” que consiste no estudo de várias espécies algal com rápido crescimento como também a separação das mesmas do meio de cultivo. A companhia de energia renovável da Espanha e a companhia de energia verde de Massachussetts formaram uma parceria de 92 milhões de dólares em 2007 para produção de óleos de algas, este projeto consiste de uma área de 100ha de estufa de cultivo de algas, produzindo 25.000 toneladas de biomassa de algas por ano. A companhia italiana de energia, instalou uma planta piloto de 1ha para produção de óleo derivado de algas em fotobioreatores e lagoas abertas (GU; SINGH, 2010).

De acordo com Piccolo (2010 apud GU; SINGH, 2010), os países mais favoráveis para instalar as fazendas de cultivo de algas são os localizados no sul do mar mediterrâneo devido ao clima que dificilmente a temperatura fica abaixo de 15°C, tornando mais econômico o cultivo, pois favorece um maior crescimento das algas. Alguns exemplos como em Israel tem desenvolvido o cultivo e colheita de algas com o propósito de produzir substância para fins medicinais como também para suplemento alimentar.

Os países que fazem fronteira com o sul do mar mediterrâneo como, por exemplo: Marrocos, Argélia, Tunísia e Egito têm um atrativo particular para o cultivo de microalgas em razão de suas altas temperatura e a enorme extensão de terras desérticas. No entanto, alguns países como Líbia, Chipre e Turquia tem mais dificuldade em virtude da carência de água, mas, esta dificuldade pode ser sanada com o cultivo de algas que se adaptam em águas salobras ou salinas (GU; SINGH, 2010).

O Quadro 01 apresenta os perfis das empresas em todo mundo que cultivam microalgas para fins comerciais com objetivo principal na produção de bicomcombustível e outras finalidades. Já Figura 05 sintetiza o percentual da distribuição mundial de produção de microalgas realizadas por diversas empresas e verifica-se que as empresas que mais cultivam microalgas para biocombustíveis estão localizadas nos EUA com 78% do percentual total.

Figura 05 – Percentual de empresas mundiais que cultivam microalgas para obtenção de óleo



Fonte: Gu e Singh (2007)

Quadro1 - Lista das companhias existentes mundialmente que cultivam microalgas para conversão em biodiesel com suas respectivas técnicas de cultivo

Companhias	Região	Estratégias/comentários
<b>Método de cultivos: Lagoas Abertas</b>		
<b>Livefuels, Menlo Park Califórnia</b>	EUA	A empresa pretende criar o bio- Petróleo bruto por meios das algas utilizando um sistema de refinaria.
<b>OriginOil Inc, Los Angeles, Califórnia</b>	EUA	Desenvolvimento de uma tecnologia para transformar algas em verdadeiro concorrente ao petróleo. a empresa afirma que possui tecnologia patenteada para produzir óleo novo a partir de algas, com processo de manufaturar rápido a um custo efetivo. Esta fonte de óleo pode ser utilizada como diesel, gasolina, combustíveis para aviões, plásticos e solventes sem efeitos do aquecimento global.
<b>PetroSun, Scottsdale, Arizona</b>	EUA	Começou a produção de biodiesel de algas em 2007 com a fábrica no Texas. O cultivo consiste de 1100ha utilizando águas salobras em lagoas. A companhia anseia em produzir 4,4milhões de óleo de algas e 110milhoes de lagoas de biomassa. A empresa pretende extrair o óleo das algas e transportar para refinaria de biodiesel. A companhia já possui lagoas abertas no Alabama, Arizona, México, Brasil e Austrália.
<b>Neste Oil, Helsinki</b>	Europa	Refina o óleo importado de vegetais e de algas produzindo 170.000toneladas de biodiesel por ano. O óleo renovável pode ser utilizado em todos os motores a diesel. A estratégia da Neste é em 10 anos produzir 70% de o óleo renovável ser derivado de matérias primas não alimentares e para 2020 toda a matéria-prima não pertença à cadeia alimentar.
<b>(Continua)</b>		

<b>Companhias</b>	<b>Região</b>	<b>Estratégias/comentários</b>
<b>Método de cultivos: Lagoas Abertas (continuação)</b>		
<b>Ingrepo, Netherlands</b>	Europa	Grande companhia biotecnológica especializada em produção de algas em escala industrial, sua planta de produção de algas foi construída na Malásia devido às condições climáticas e aos incentivos governamentais.
<b>Seambiotic, Ashkelon Israel</b>	Mediterrâneo	Fundada em 2003, produz algas para varias finalidades entre elas: saúde, alimentação, química fina e biodiesel. Trabalhando junto com a companhia elétrica de Israel, utilizando a chaminé da companhia como fonte de CO <sub>2</sub> .
<b>Método de cultivos: Ambientes naturais</b>		
<b>Kelco, San Diego</b>	EUA	A empresa possui técnicas especializadas com maquina de corte do leito natural das lagoas de algas para a produção de ácido alginico.
<b>Neptune Industries, Boca Raton</b>	EUA	A companhia criou soluções alternativas ambientais sustentáveis, como crescimento de vegetais hidropônicos, lagoas de peixes com aproveitamento dos residuos para o crescimento de algas com finalidade de produção de biodiesel e gás metano.
<b>Blue Marble Energy, Seattle</b>	EUA	A companhia já possui experiência com bactérias para despoluir meio ambiente. Eles também pesquisaram o uso de algas em meio ambientes rico de nutrientes favorecendo o rápido crescimento das algas. A empresa conseguiu limpar a água poluída produzir a biomassa que foi processada e comercializar
<b>Biofuel Systems, Espanha</b>	Europa	Desenvolveu um sistema de produção de energia a partir de algas marinhas com a esperança de substituir o petróleo fóssil para reduzir a poluição. Espera produzir grandes quantidades de biopetroleo( termo utilizado para biodiesel) de microalgas em área limitada e custos moderados.
<b>Método de cultivos: Sistemas Fechados</b>		
<b>A2BE Carbon Capture, Boulder Colorado</b>	EUA	A companhia criou a captura e reciclagem de CO <sub>2</sub> . Através de um avançado sistema combinado de produção de algas utilizando o CO <sub>2</sub> industrial.
<b>Greenfuel Technologies Cambridge, Massachusetts</b>	EUA	A empresa construiu uma biorefinaria de algas utilizando o CO <sub>2</sub> reciclado. A companhia patenteou um sistema que produz algas em 1 ha e separa para produção de vários componentes que inclui 7000 galões de combustível de avião, 5000 galões de etanol, 1000 toneladas de proteínas para alimentos, 200 quilos de nutrientes e 20 quilos de pigmentos.
<b>Algeneol Biofuels, Fort Meyers, Flórida (continua)</b>	EUA	A empresa foi fundada em 2006 para produção em escala industrial de um sistema de cultivo de algas com a finalidade de produção de etanol de algas usando terras desérticas e CO <sub>2</sub> . Patenteou um sistema de cianobactérias que fixa o N <sub>2</sub> para reduzir o custo com fertilizantes.

<b>Companhias</b>	<b>Região</b>	<b>Estratégias/comentários</b>
Ao fim de 2009 a empresa produziu nos desertos do México 100 milhões de galões de etanol anualmente e pretende em 2012 alcançar a meta de produção de 1 bilhão de galão de etanol.		
<b>Método de cultivos: Lagoas Abertas (Conclusão)</b>		
<b>Solazyme, Inc. San Francisco</b>	EUA	Desenvolve o cultivo de microalgas para a produção limpa em alta escala de óleo com a finalidade de produção de biodiesel e químicos verdes. A companhia desenvolve o cultivo de algas sem utilizar a luz solar, que é feito no escuro utilizando como fonte de carbono a glicose, que alcança uma produtividade 1000 vezes superior ao processo de cultivo natural.
<b>Solix Biofuels, Fort Collins, Colorado</b>	EUA	A companhia fundada em abril de 2006, viabiliza a produção de biodiesel por de algas sem o uso de vegetais comestíveis, utilizando o CO <sub>2</sub> produzido pela fabrica de cerveja.
<b>Aurora Biodiesel</b>	EUA	A companhia utiliza algas modificadas geneticamente e pretende aumentar o rendimento em 125 vezes e reduzir o custo em 50% para produção de biodiesel.
<b>Cellena, Hawaii</b>	EUA	Desenvolve microalgas para biodiesel através de um processo inovador de extração do óleo das algas sem utilizar produtos químicos.

Fonte: Gu e Singh (2007)

A biotecnologia das microalgas tem se desenvolvido devido às diferentes aplicações comerciais, por ser organismos fotossintéticos que produzem a clorofila pode ser usada para fins alimentícios e cosméticos. Elas também são utilizadas pelas indústrias farmacêuticas, pois, algumas espécies de microalgas produz os compostos bioativos como os antioxidantes, antibióticos e toxinas. Por outro lado, as microalgas são produzidas para uso como nutrientes suplementar para consumo humano, devido sua biomassa conter teores elevados de proteínas, vitaminas e polissacarídeos. Algumas espécies de microalgas contém níveis elevados de lipídios que podem ser extraídos para produção de biodiesel. Como exemplo da produção de microalgas para fins comerciais, pode citar a *Dunaliella Salina*, como fonte de  $\beta$ -caroteno, que foi produzida pela *Western Biotechnology Ltd e Betaten* tornando-se a terceira indústria desenvolvida na Austrália em 1986, seguido de Israel e Estados Unidos da América (EUA). Atualmente, outras indústrias vêm produzindo outros bioprodutos como astaxantina a partir do cultivo *Haematococcus pluvialis* na USA e Índia. Assim, em cerca de 30 anos, a indústria

da biotecnologia de microalgas vem se intensificando significativamente (HARUN et al., 2010; LOURENÇO, 2006; SHELEF; SOEDER, 1980).

As microalgas em razão das suas dimensões apresentam baixa concentração em termos de peso seco como apresenta a Tabela 01 na qual verifica-se que a *Chlorella* apresenta baixa produtividade e baixo teor de óleo. As espécies com maior produção de óleo são *Nannochloopsis* e *Neochloris*.

Tabela 01- Concentração média da biomassa microalgal, concentração máxima da biomassa, produtividade e conteúdo de lipídios em base seca

Espécies	Média da concentração da biomassa (g.L <sup>-1</sup> )	Concentração máxima da biomassa (g.L <sup>-1</sup> )	Produtividade (g.L <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	Conteúdo de óleo em base seca (%)
<i>Spirulina máxima</i>	2,0	3,1	0,21	4,1
<i>Chlorella vulgaris</i>	1,5	3,0	0,18	5,1
<i>Scenedesmus obliquus</i>	0,9	2,0	0,09	17,7
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	2,6	3,6	0,12	16,7
<i>Nannochloopsis</i>	1,6	2,5	0,09	28,7
<i>Neochloris</i>	1,5	2,0	0,09	29,0

Fonte: Gouveia e Oliveira (2009)

As microalgas compreendem mais de 50.000 espécies e representam a diversidade genética e metabólica que poderia ser igualada apenas por bactérias.

O interesse pelas microalgas para produção de biodiesel se intensificou com as primeiras crises do petróleo em 1970, o laboratório de energia renovável dos Estados Unidos criou em 1978 um programa dedicado a produção de energia alternativa incluindo a produção de biodiesel a partir das microalgas. Muita atenção esta sendo atraída para a cultura de massa efetiva de microalgas para aplicações comerciais, levando ao surgimento de uma área de pesquisa interessante a "biotecnologia de microalgas" (CHEN; JIANG, 2001). Um dos aspectos importantes da biotecnologia das microalgas é desenvolver alimentos funcionais e produtos nutracêuticos a partir de microalgas mesmo usando as células inteiras em razão da sua rica composição química ricas em substancias com valores farmacológicos, alimentícios (por exemplo, *Chlorella*, *Spirulina*, etc.) ou por extração de ingredientes funcionais (por exemplo, beta-caroteno, astaxantina, o ácido docosahexaenóico (DHA), o ácido eicosapentaenóico (EPA), o ácido docosapentaenóico (DPA), a ficocianina, etc a partir das

algas, confiando na acessibilidade da biomassa das algas. Na Tabela 02 verifica-se esse potencial das microalgas por meio da composição química de diversas microalgas em peso seco.

Tabela 02 - Composição Química de várias espécies de microalgas

<b>Espécies</b>	<b>Proteínas</b>	<b>Carboidratos</b>	<b>Lipídios</b>	<b>Ácidos Nucléicos</b>
<i>Scenedesmus Obliquus</i>	50-56	10-17	12-14	3-6
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	-	1,9	-
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22	4-5
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2	-
<i>Spirogyra</i>	6-20	33-64	11-21	-
<i>Dunalliella bioculata</i>	49	4	8	-
<i>Dunalliella salina</i>	57	32	6	-
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20	-
<i>Prymnesium parvum</i>	28-45	25-33	22-38	1-2
<i>Tetraselmis maculata</i>	52	15	3	-
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14	
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9	2-5
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7	3-4,5
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11	5
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7	

Fonte: Balat (2011)

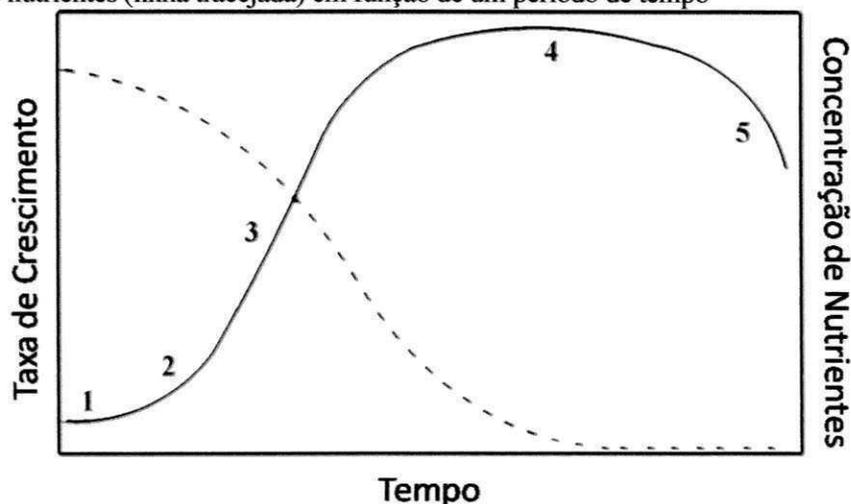
O termo microalgas aplica-se a uma ampla variedade de micro-organismos fotossintéticos, produtores de clorofila-a, apresentando desta forma metabolismo análogo ao das plantas. Sob esta denominação incluem-se organismos com dois tipos de estrutura celular: os procarióticos, com representantes na divisão *Cyanophyta* (cianobactérias) e os eucarióticos, com representantes das divisões *Chlorophyta*, *Euglenophyta*, *Rhodophyta*, *Haptophyta* (*Prymnesiophyta*), *Heterokontophyta* (*Bacillariophyceae*, *Chrysophyceae* e *Xantophyceae*), *Cryptophyta* e *Dinophyta*. Portanto, este termo não possui valor taxonômico, sendo sua caracterização sistemática baseada em uma série de critérios tais como a ocorrência e estrutura de flagelos, aspectos da divisão celular, presença e caracterização de envoltório dos cloroplastos, bem como características evidenciadas por técnicas de biologia molecular (OLAIZOLA, 2003; PULZ; GROSS, 2004; DERNER et al., 2006).

### 3.3.3 Crescimento das microalgas

Em condições climáticas adequadas e nutrientes suficientes, as microalgas podem crescer rapidamente. Comumente elas se duplicam dentro de 24h ou menos durante a fase de crescimento exponencial elas podem complementar um ciclo de vida dentro de 2 a 4 horas, como mostra a Figura 06, de acordo com as seguintes fases:

- Fase de adaptação: ocorre após a inoculação das células, neste período não ocorre crescimento, apenas adaptação ao meio.
- Fase exponencial: caracterizada pelo crescimento logarítmico, nesta fase as células se duplicam em intervalos de tempo regulares e a velocidade de crescimento atinge ponto máximo;
- Fase de diminuição do crescimento relativo: nesta fase acontece uma redução na taxa de crescimento celular, devido à redução de nutrientes e da intensidade luminosa devido ao aumento da densidade celular no meio de cultivo;
- Fase estacionária: caracterizada pela manutenção da densidade celular, a taxa de crescimento está na mesma proporção que a taxa de mortalidade, ela pode ser caracterizada por pequenos incrementos celular e decréscimos da biomassa algal;
- Fase de declínio: a fase de morte celular que ocorre em razão do esgotamento de nutrientes e ao autossombreamento, impossibilitando o crescimento e favorecendo a morte celular (DERNER et al., 2006; PEQUENO, 2010).

Figura 06 - Representação esquemática de taxa de crescimento de algas em cultura (linha sólida) e a concentração de nutrientes (linha tracejada) em função de um período de tempo



Fonte: Mata et al. (2010)

### 3.4 CHORELLA VULGARIS E CHORELLA SP

#### 3.4.1 *Chlorella vulgaris* e *Chlorella sp*: características e classificação

Foi descoberta pelos japoneses, tradicionais consumidores de algas. É uma microalga rica em nutrientes, cerca de 50% de proteínas em algumas espécies esse teor pode até ultrapassar, superior a outras fontes de proteínas como a soja que tem 37%, a carne bovina, 45% e o trigo 10%, além de outros compostos como a clorofila, diversas vitaminas e sais minerais, com destaque para beta caroteno (pró-vitamina A) e a vitamina B<sub>12</sub> e todos os aminoácidos essenciais (BORGHETTI, 2010).

É a espécie de microalga pertencente à divisão Chlorophyta, Classe das *Trebouxiophyceae* da Ordem das *Chlorellales* da Família das *Chlorellaceae* e Gênero *Chlorella* (GUIRY, 2006; KRIENITZ et al., 2004).

A divisão *Chlorophyta* é também conhecida usualmente como a divisão das algas verdes. São predominantemente microscópicas e de água doce, podendo existir em águas salgadas, na neve, no solo, em galhos, e sobre folhas de plantas terrestres (KRIENITZ et al., 2004; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1992).

Citologicamente, esse grupo apresenta características semelhantes como plantas superiores: clorofila a e b, pigmentos acessórios similares, amido como produto de armazenagem e parede celular rígida que, em alguns gêneros, são compostas por polissacarídeos tais como celulose. Acredita-se que as Chlorophytas serviram de ancestrais as plantas superiores (WEIER et al., 1982; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1992;).

Em termos de tamanho, a menor espécie de *Chlorella sp* é semelhante a uma bactéria. As espécies pertencentes a esse gênero são encontradas usualmente em habitat aquático, crescendo tanto em ambiente marinho como em água doce, rico ou pobre em nutrientes. No entanto, crescem rapidamente quando em sistema de cultivo (RICHMOND; VONSHAK; ARAD, 1980).

A espécie *Chlorella vulgaris* possui forma esférica, medindo de 2 a 10 µm de diâmetro, unicelular e eucariótica. Micro-organismo fotossintetizante e com reprodução assexuada, em que uma célula mãe origina oito células filhas. A divisão é rápida e ocorre por ruptura ou dissolução da parede parental, de duas a três vezes em pouco tempo, chegando ao crescimento máximo após 2 h (RICHMOND, 1990; DUARTE, 2001).

A *Chlorella* sp ocorre em águas doces e águas marinhas, podem ser encontradas em lagos de águas doces, em valas de terras úmidas, mas é muito abundante em oceanos, nos mares, nos lagos salgados e em outros diversos habitat. A *Chlorella parasitica* é encontrada em simbiose com células do Protozoário *Paramecium*. *Chlorella vulgaris*, *Chlorella conductrix*, *Chlorella gonglomerata* e *Chlorella parasitica* são as espécies mais comuns encontradas e produzidas na Índia A *Chlorella* sp é representada por apenas oito espécies (PHUKAN et al., 2011).

*Chlorella* sp tem uma imensa importância econômica, não só na produção para aplicação na alimentação humana. Mas, também na geração de bioenergia, tornando-se uma alternativa como fonte de energia renovável (PHUKAN et al., 2011).

Illman et al. (2000), estudou o crescimento de várias cepas de *Chlorella* sp (*Chlorella protothecoides*, *C. vulgaris*, *Chlorella emersonni* e *Chlorella sorokiniana*) de águas doces e uma cepa de águas marinhas (*Chlorella minutissima*) utilizando meios de cultivos com baixo teor de nitrogênio e concluiu que estas cepas de *Chlorella* sp podem ser capazes de substituir o diesel derivado do petróleo.

A composição química da *Chlorella* sp quando seca em média apresenta cerca de 20% de óleo, 45% de proteína, 20% de carboidratos e 10% de diversos minerais e vitaminas (PHUKAN et al., 2011).

### 3.4.2 Principais fatores relacionados ao cultivo de microalgas – *Chlorella* sp

A composição bioquímica da biomassa das microalgas não é determinada somente pela função da natureza de cada espécie algal. Ela depende de determinados fatores, como a intensidade de luz, temperatura, pH, nutrientes e agitação (MIAO; WU, 2004).

Pesquisas relacionadas à interação entre intensidade luminosa, temperatura, agitação e concentração de nutrientes podem contribuir para a otimização do cultivo de *Chlorella* sp, pois o crescimento dessa microalga deriva de diversas reações bioquímicas e biológicas. Quando se trata de meio de cultura sintético, o alto custo dos nutrientes pode ser um fator limitante para a produção. Entretanto, no caso de cultivos em meios de cultura alternativos, os fatores limitantes para a produção de biomassa restringem-se à luz, temperatura e agitação da cultura (DUARTE, 2001).

A fotossíntese realizada pelas microalgas consiste no fato dela ser afetada pela limitação de nutrientes (KOLBER; ZENH; FALKOWSKI, 1988; GREENE; GEIDER;

FALKOWSKI, 1991). Assim, é possível afirmar que a velocidade de crescimento e a produtividade estão diretamente relacionadas às exigências nutricionais, ao pH, à agitação, à temperatura e à luz (intensidade e duração da irradiação luminosa) (JOHN; FLYNN, 2000; CARLOZZI; SACCHI, 2001; BABEL; KAYOMBO et al., 2003; TUKAJ et al., 2003).

#### 3.4.2.1 Luminosidade dos cultivos

A luz é fundamental para o crescimento microalgal, em especial as microalgas fotoautotróficas. A quantidade de energia luminosa recebida pelas células irá repercutir na quantidade de carbono fixado, atuando assim como a principal fonte de energia no processo de produção de biomassa e na taxa de crescimento das culturas microalgais (LACAZ-RUIZ, 1996; DERNER, 2006). A luminosidade induz a atividade enzimática, influenciando a síntese de proteína (RUYTERS, 1984; UMINO; SATOH; SHIRAIWA, 1991).

A quantidade de oxigênio no meio está diretamente relacionada à atividade fotossintética (LEE; LOW, 1993). Pesquisadores demonstraram que a atividade fotossintética da *Chlorella sp* é tão eficiente quanto às das plantas.

Determinados organismos mantidos em temperaturas fisiológicas podem ser protegidos por alguns pigmentos, como os carotenóides. No entanto, mesmo contendo carotenóides, algumas células, quando submetidas a foto-oxidação e à baixas temperaturas, não sobrevivem. Indicando que algumas enzimas reguladoras estão envolvidas nesse mecanismo de proteção das células (ABELIOVICH; SCHILO, 1972).

Apesar disto, observa-se que, sob alta intensidade de luz, ocorre uma proteção da clorofila *a* em relação à foto-oxidação, através dos carotenóides. Entretanto, quando a intensidade da luz é menor, eles passam a agir como pigmentos acessórios, ou seja, captam a energia luminosa e a transferem para moléculas de clorofila (OLAIZOLA; DUERR, 1990 apud DUARTE, 2001).

Células que não possuem carotenóides apresentaram sensibilidade à foto-oxidação, assim os níveis de pigmentos intracelulares estão envolvidos na absorção da irradiação de luz (ABELIOVICH; SHILO, 1972; FOX, 1983).

### 3.4.2.2 Temperatura

A temperatura afeta a composição, as taxas metabólicas e o crescimento celular das microalgas. No entanto, a resposta à temperatura de crescimento varia de espécie para espécie, sem nenhuma relação generalizada para todas as espécies (RAVEN; GEIDER, 1988; JAMES; AL-HINTY; SALMAN, 1989).

Reunaud et al. (2004) estudaram espécies de microalgas tropicais no litoral da Austrália e constataram aumentos significativos na produção de ácidos graxos saturados 14:0, 16:0 e 18:0 com o aumento da temperatura de todas as espécies em estudos e constatou a diminuição dos percentuais dos ácidos graxos poli-insaturados, ômega -3 e ômega -6.

Quando as células de *Chlorella sp* são cultivadas em temperatura entre 25 e 35°C, o teor de proteína diminui e o de carboidratos aumenta (OGBONNA; TANAKA, 1996).

### 3.4.2.3 Agitação e aeração nos cultivos

O processo de agitação do meio de cultivo microalgal é um parâmetro essencial, pois permite a homogeneização das células, melhora a transferência dos gases, impede a estratificação térmica, auxilia na distribuição homogênea dos nutrientes. A agitação da cultura, em meio líquido, mantém as células em suspensão, evitando que algumas células fiquem depositadas no fundo, enquanto outras que permanecem na superfície recebam luz em excesso (BECKER; VENKATARMAN, 1981; SUH; LEE, 2003). Além disso, a agitação evita a foto-oxidação através da eliminação do oxigênio supersaturado no meio (RICHMOND et al, 1993).

A aeração é um processo mecânico, por meio do qual se aumenta o nível de oxigênio dissolvido em um meio de cultivo. Fast e Boyd (1992) afirmam que aeração mecânica se faz necessárias, principalmente, nas seguintes condições: durante a noite, devido à alta taxa de respiração das microalgas; quando as microalgas estão com alguma limitação de desenvolvimento (enfermas ou velhas), o que origina uma menor produção de oxigênio e um alto risco de morte repentina de toda a biomassa; durante a falta ou carência de luz, pois com pouca radiação (solar ou artificial), diminui substancialmente a produção de oxigênio que pode inibir o processo de fotossíntese.

Assim, a agitação da cultura torna-se muito importante, pois pode otimizar todos os fatores essenciais relacionados à produção de biomassa de microalgas (SOARES, 2010; PEQUENO, 2010).

#### 3.4.2.4 Condições de pH

O controle do pH é essencial para que os componentes do meio de cultura possam ser efetivamente absorvidos, afetando diretamente a disponibilidade de vários elementos químicos. O pH é fundamentalmente influenciado pelas proporções entre as formas de carbono dissolvidas no meio de cultivo, interferindo na disponibilidade de CO<sub>2</sub> que afeta diretamente no crescimento das microalgas (LOURENÇO, 2006). A variação de pH no cultivo de microalgas ocorre devido ao consumo de substratos, solubilização e consumo do dióxido de carbono, e à degradação de metabólicos produzidos (GRIMA et al., 1999)

O melhor pH para o cultivo de diversas algas varia de neutro a alcalino. Para microalgas verdes o pH ótimo está na faixa de 4,0 a 8,5. Já valores de pH iguais ou superiores a 9,5 induzem a precipitação das células de *Chlorella vulgaris* no cultivo, por meio da agregação celular, reduzindo a produção de biomassa e aumentando o diâmetro celular (MALIS-ARAD et al., 1980).

#### 3.4.3 Meios de cultura e fontes nutricionais

O investimento em reagentes químicos para elaboração do meio de cultura é um dos maiores problemas no cultivo de microalgas (SIPAÚBA-TAVARES, 1995). Segundo Cozza (1999), o custo estimado do substrato para o cultivo de micro-organismos, costuma representar de 40 a 60% do custo total.

Dentre os meios de culturas alternativos utilizados para a produção de biomassa de *Chlorella sp*, destacam-se: esgoto doméstico (PIPES; GOTAAS, 1960), efluentes de biodigestores (RODULFO; MARMOL; EMRALINO, 1980), lodo digerido (WONG; LAY, 1980), despejos industriais purificados (JUSSIÁK; DUSZOTA; MYCIELSKI, 1984), vinhaça de cana-de-açúcar (OLIVEIRA, 1988), águas residuais da produção de azeite de oliva

(SÁNCHEZ et al., 2001) e resíduos da suinocultura (RODRIGUES, 2000; TRAVIESO et al., 2006).

No cultivo de *Chlorella sp.*, para cada 100 partes de peso de carbono, em geral são necessários: N-15%; P-5%; Mg-2,5%; K-1,8%; S-1,6%. O carbono inorgânico é fundamental para o processo de fotossíntese, sendo a fonte relacionada ao pH, ou seja, em pH abaixo de 5,0 apenas o CO<sub>2</sub> é consumido pela microalga, entre 7 e 9 o bicarbonato passa a ser importante e, acima de 9,5 o destaque passa a ser para o carbonato. O dióxido de carbono é a fonte de carbono normalmente utilizada, porém, acima de 10% ocorre uma inibição do crescimento algal. Microalgas podem crescer autotroficamente utilizando luz e dióxido de carbono. Podem também ser cultivada em sistema heterotrófico, usando compostos orgânicos como energia e fonte de carbono, ou ainda, em sistema de cultivo mixotrófico, utilizando simultaneamente uma fonte luminosa e um substrato orgânico como fonte de energia, além de CO<sub>2</sub> e substrato orgânico como fontes de carbono (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004).

O nitrogênio é um importante elemento para o metabolismo das algas, pois contribui com a formação de proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos fotossintetizantes (clorofilas e ficobilinas). Assim, a demanda normal de nitrogênio em culturas de algas verdes é de 6,5% a 8,3% do peso seco livre de cinzas. O nitrogênio pode ser assimilado, preferencialmente, sob forma amoniacal (NH<sub>3</sub> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), mas também podem ser assimiladas na forma de nitrogênio gasoso ou molecular como algumas cianobactérias, de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), e de nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). As principais fontes são os sais de amônio e uréia. As concentrações de proteínas e clorofilas nas células são diretamente proporcionais ao suprimento de nitrogênio, com isso, a diminuição da concentração de proteína, ocasiona aumento significativo no percentual de polissacarídeos e a diminuição da clorofila aumenta a concentração de carotenóides gerando mudança de coloração no cultivo que tendem ao aspecto amarelado (LOURENÇO, 2006).

O efeito de uma redução da concentração de NaNO<sub>3</sub> no cultivo da *C. vulgaris*, verifica-se que a sua taxa de crescimento específico não foi significativamente afetado, ocorrendo um triplo aumento do teor de lipídios (CONVERTI et al., 2009).

Quando a fonte de nitrogênio apresenta-se na forma de nitrato, a microalga terá que realizar gastos celulares energéticos, pois precisa reduzir esse íon a nitrito através da enzima nitrato-redutase. Posteriormente, ocorre outra redução pela nitrito-redutase, obtendo então a amônia, que é forma de nitrogênio que a alga utiliza em seu metabolismo (CORNET; DUSSAP; GROS, 1998).

O fósforo tem uma função vital, sendo o trifostato de adenosina (ATP), o exemplo mais comum na participação da síntese de proteína e das reações de síntese e desdobramento dos carboidratos (FERRI, 1979). O fósforo é tão importante que, em pequenas quantidades no meio de cultura, pode limitar o crescimento de algumas espécies de algas (ROUND, 1983). O fósforo também é importante na regulação do metabolismo celular principalmente na síntese de lipídios e carboidratos. O fósforo é assimilado na forma de ortofosfato ( $\text{HPO}_4^{3-}$ ). As microalgas são capazes de absorver quantidades elevadas do fósforo (8 a 16 vezes a mais que a sua capacidade de absorção mínima) (LOURENÇO, 2006).

*Chlorella sp* cultivada com  $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$  de fosfato apresentou 15,7% de proteína. Entretanto, quando a concentração de fosfato aumentou para  $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$  a quantidade de proteína passou a ser de 37%. Assim, a quantidade de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  influencia a concentração de proteína (MAHASNEH, 1997). Em pequenas quantidades pode limitar o crescimento de algumas espécies (ROUND, 1983). O fósforo também atua como transportador de substratos ou energia química, pois faz parte dos ácidos nucleicos e das membranas (ROCHE et al., 1993). A carência de fosfato produz um aumento no teor de lipídios presente nas algas (SIPAÚBA-TAVARES, 1995).

O enxofre representa 1 a 2% do peso celular e a maior parte dele se encontra presente na constituição dos aminoácidos metionina e cisteína, mas também está presente como cofatores de enzimas e em certas vitaminas tais como biotina e tiamina (LOURENÇO, 2006).

O potássio é regulador da pressão osmótica, estimula a respiração em pH reduzido, é cofator de várias enzimas e na conformação e estabilidade de proteínas (LOURENÇO, 2006).

O Ferro que é um micronutriente tem uma importância fundamental para as algas. Participa das funções como respiração, fotossíntese, da via biossintética da clorofila e do citocromo, reduz o sulfato, o nitrato e o nitrito, fixa o nitrogênio molecular e é cofator de diversas enzimas (LOURENÇO, 2006).

O manganês é outro micronutriente essencial para as microalgas, é o componente estrutural dos tilacóides, dos cloroplastos e da superóxido – dismutase (enzima que remove radicais superóxidos tóxicos para as células) (LOURENÇO, 2006).

### 3.4.4 Tipos de cultivos

Conforme a fonte de carbono empregada, os cultivos de microalgas podem ser classificados em três tipos:

- a) Heterotrófico: o fornecimento de carbono é realizado pela introdução de compostos orgânicos apropriados ao meio de cultura (glicose, glicerol, entre outros);
- b) Mixotrófico: o carbono é disponibilizado tanto por meio de compostos orgânicos quanto pelo CO<sub>2</sub> atmosférico (CO<sub>2</sub> inorgânico);
- c) Autotrófico: a única fonte de carbono disponibilizada é o CO<sub>2</sub> inorgânico. Neste caso, o carbono inorgânico pode estar na forma de CO<sub>2</sub>, ácido carbônico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ou carbonato (CO<sub>3</sub><sup>-</sup>). A maioria das espécies das microalgas são fotoautotrófica, ou seja, através da fotossíntese obtém-se energia da luz para fixar o carbono a partir do CO<sub>2</sub>.

O cultivo autotrófico é o mais utilizado no cultivo de microalgas, principalmente quando a produção é em larga escala. Mas, várias espécies podem tanto ser cultivadas em processos autotróficos como em heterotróficos. As microalgas podem assimilar diversos compostos orgânicos no cultivo heterotrófico (como: glicose, glicerol, acetato, frutose, lactose e outros), evitando a forte dependência da luz e aumentando a produtividade da biomassa. A *Chlorella protothecoides* obteve um aumento de 40% no conteúdo de lipídio quando passou do cultivo autotrófico para o heterotrófico. Assim, o cultivo heterotrófico promove um rápido crescimento e um maior acúmulo de lipídios também pode ser obtido. Este processo heterotrófico pode ser efetuado em águas residuárias que contém as fontes de carbono orgânico reduzindo os custos com nutrientes para produção em grande escala (MALCATA, 2011). De acordo com Huang et al. (2010), o cultivo heterotrófico apresenta várias vantagens frente ao cultivo autotrófico, que pode ser a independência da luz, melhor controle do cultivo, diminuição do custo na separação devido ao aumento da densidade celular.

O processo heterotrófico promove um alto grau de crescimento, isso favorece uma redução nos custos para realizar a separação da biomassa em razão do aumento da densidade celular no meio do cultivo (BRENNAM; OWENDE, 2010). No entanto, o cultivo heterotrófico tem algumas limitações: 1) o número de espécies de microalgas que se desenvolvem em meio heterotrófico é bastante limitado; 2) aumento dos custos com adição de substrato orgânico; 3) mais probabilidade de contaminação e competição com outros micro-

organismos; 4) inibição do crescimento com excesso de substrato orgânico (BASHAN et al., 2011).

O alto potencial comercial dos produtos derivados das microalgas incentiva estudos para o aumento desses produtos na biomassa seca, que pode ser através da manipulação física ou química do meio de cultivo. Através do meio com fonte de carbono verifica-se que pode favorecer o aumento de ácidos graxos, ácidos graxos de cadeia longa de poli-insaturados e carotenóides (BASHAN et al., 2011).

A saturação de ácidos graxos é diretamente dependente da quantidade do excesso de açúcar e das condições autotróficas ou heterotróficas. Sabe-se que com a deficiência de nitrogênio no cultivo das microalgas *C. pyrenoidosa*, *C. sorokiniana*, *Nitzchia alba*, *Skeletonema costatum*, *C. conhii*, acumula grandes quantidades de lipídios, e nas diatomáceas com a restrição de silício. Em geral, este comportamento, é uma resposta de sobrevivência gerando lipídios de reserva até que ocorra restauração nutricional (BASHAN et al., 2011). No entanto, quando a concentração de açúcar aumenta os ácidos graxos gerados são mais saturados. Por exemplo, *C. saccharophila*, *C. vulgaris*, *N. laevis*, *Cylindrotheca fusiformis*, *Navicula incerta* e *Tetraselmis suecica* acumulam mais lipídios sob as condições de cultivos heterotróficos que nos cultivos autotróficos e frequentemente na forma de triglicerídeos (BASHAN et al., 2011).

A microalga *C. protothecoides* é mais suscetível para a produção de biodiesel, para o cultivo em meio heterotrófico, essa espécie é capaz de produzir quantidades de lipídios em torno de 50% do peso seco da biomassa (BASHAN et al., 2011). A referida espécie cultivada em meio heterotrófico tendo como fonte carbono a glicose apresentou 55,2% de lipídios na sua biomassa seca cerca de 3,4 vezes superior que no meio autotrófico (MIAO et al., 2004).

Uma das fontes de carbono mais adequada para produção de biodiesel por meio heterotrófico é o glicerol. O glicerol pode ser obtido como subproduto da reação de transesterificação para obtenção do biodiesel. O acúmulo de lipídios é maior quando utiliza o glicerol que as outras fontes de carbono como a glicose por exemplo.

Assim, percebe que é muito promissor e pode deixar a produção de microalgas para geração de biodiesel competitiva com as outras fontes de biodiesel renovável ou não quando efetua-se o cultivo com a presença de uma fonte de carbono.

Miao e Wu (2006) estudaram a *Chlorella photothecoides* e verificaram que o conteúdo de lipídios pode ultrapassar a 55% quando realiza-se o cultivo heterotrófico, isso significa um aumento de 4 vezes mais que no cultivo autotrófico que atinge apenas 15% de lipídios em

condições similares. Assim conclui-se que o cultivo heterotrófico pode não só aumentar a produção da biomassa como também o acúmulo de lipídios nas células.

Brennam e Owende (2010) compararam o cultivo autotrófico em fotobioreatores fechados com o cultivo mixotrófico, às taxas de crescimento são maiores que o cultivo em lagoas abertas. No entanto, são menores que o cultivo heterotrófico.

Chojnacka e Noworyta (2004), comparando crescimento da *Spirulina sp*, em meios de cultivos autotróficos, mixotrófico e heterotróficos, encontraram que no cultivo mixotrófico reduz a foto-inibição e obtém melhores taxas de crescimento tanto com relação ao cultivo autotrófico como heterotrófico.

### 3.4.5 Sistemas de produção de microalgas

As microalgas podem ser cultivadas em um grande número de sistemas. Para pequenas escalas ou de laboratório, o cultivo pode ser feito em pequenos fotobioreatores com iluminação interna, ou tanques de água. Para o cultivo de escalas maiores as microalgas podem crescer tanto em sistemas de culturas abertos, nos chamados tanques de recirculação (*raceway*), quanto em sistemas fechados, nos fotobioreatores. Que serão discutidos a seguir:

As microalgas podem ser cultivadas autotroficamente em tanques abertos ou em fotobioreatores com luz solar ou artificial, com adição de nutrientes, podendo ser utilizada na alimentação humana e animal (BECKER, 1981).

A Figura 07 ilustra as lagoas abertas que podem ser construídas e exploradas de forma mais econômica e, portanto, oferecem muitas vantagens, desde que as espécies para o cultivo possam ser mantidas (WEISSMAN et al., 1999). A produção de biomassa de microalgas é geralmente mais caro do que as plantações. Para minimizar os custos da produção de biodiesel deve contar com a luz solar disponível livremente. Existem três métodos potenciais e muito comuns de produção em larga escala de microalgas. Lagoas abertas têm uma variedade de formas e tamanhos, mas o projeto mais comumente utilizado é a lagoa da pista. É um circuito fechado retangular com o canal de recirculação. Eles costumam operar em águas com profundidade de 15-20 cm. Os canais *Raceway* são construídos em concreto ou terra compactada, pode ser de diferentes comprimentos e diâmetros e, geralmente, forrado com plástico branco. Os sistemas de cultivo aberto normalmente são mais fáceis de construir tem funcionamento mais simples e são duráveis. Contudo, os tanques usam mais energia elétrica

para homogeneizar os nutrientes e evitar a sedimentação das células, favorecendo que as mesmas recebam maior incidência solar necessária para seu crescimento.

Figura 07- Tanques de cultivos de microalgas em lagoas abertas para fins comerciais



A produção de biomassa em tanques abertos é feita em contínuo processo de propagação (SALINAS et al., 1986). O ideal é que os tanques sejam rasos com até 30 cm de profundidade, feitos de plástico, concreto ou fibra de vidro.

A tecnologia de produção de microalgas em lagoas abertas é antiga, datada de 1950. Sua dimensão é variável, havendo relatos de até 440.000m<sup>2</sup> para produção de algas para alimentação (SPOLAORE et al., 2006).

Percebe-se que os custos de implantação e operação são bem menores quando comparados com os fotobioreatores. Apesar de seu baixo custo, as lagoas *raceway* têm uma baixa produtividade comparada com os fotobioreatores. A principal desvantagem dos sistemas abertos é que por ser aberta à atmosfera, elas perdem água por evaporação a uma taxa similar à terra e as culturas, além da perda de CO<sub>2</sub> para atmosfera, a flutuação da temperatura durante o dia ou mesmo nos períodos sazonal e também são suscetíveis à contaminação por espécies indesejáveis (CHISTI, 2007; HARUN et al., 2010).

Na prática, lagoas abertas são normalmente reportadas a ser dominada por 2 à 6 espécies com uma gama de processos evolutivos, tem a vantagem de ter rápido crescimento, tolerância a altos níveis de oxigênio dissolvido, etc (SCHENK et al., 2008). Como desvantagem tem a questão da contaminação por outras espécies, como bactérias e outras microalgas e o fator da diluição provocado pelas chuvas e a evaporação, que pode favorecer a contaminação, exigindo desta forma técnicas rápidas de restabelecer o meio de cultura.

Nos tanque abertos, com intuito de reduzir mais os custos de produção das microalgas, faz-se a reciclagem contínua do meio de cultura que também pode favorecer a contaminação

decorrente do acúmulo de matéria orgânica causado pela morte e decomposição das algas produzidas, além de alguns metabólitos produzidos durante o desenvolvimento das microalgas que podem representar alguma toxicidade.

Bastantes estudos vêm sendo realizados para possibilitar o cultivo de microalgas usando os sistemas de lagoas abertas. Harun et al. (2010) reportam que um número limitado de espécies que apresentam determinadas condições de cultivo é mais favorável ao cultivo em lagoas abertas devido as suas condições severas no meio de cultura, como a *Spirulina sp* que se desenvolve em meio fortemente alcalino, *Dunaliella sp* que requer alta salinidade e a *Chlorella sp* que necessita alta nutrição.

Fotobioreatores são tipos diferentes de tanques, ou sistemas fechados, nos quais as microalgas são cultivadas em uma série de tubos transparentes, responsável por coletar a luz solar para realização da fotossíntese (CHISTI, 2007). Nos fotobioreatores por manter o controle melhor de vários parâmetros, evita a contaminação sendo possível ter apenas o cultivo de uma única espécie, por períodos prolongados de culturas contínuas, em razão desse maior controle operacional permite que os fotobioreatores tenham uma alta produtividade de células e é um dos mais satisfatórios sistemas para culturas ao ar livre, sendo a maioria construída com tubos de vidro ou plástico como ilustra na Figura 08. Os tubos formam o sistema coletor de luz solar, no interior dos quais uma solução de microalgas é circulada. Os tubos são orientados de forma a maximizar a captação de luz solar, no sentido norte-sul, e têm 0,10m ou menos de diâmetro, sendo esse diâmetro limitado para que a luz penetre profundamente na cultura, assegurando uma elevada produtividade do fotobioreator. Além disso, os tubos estão dispostos verticalmente a fim de aumentar a área para capturar a luz. (CHISTI, 2007).

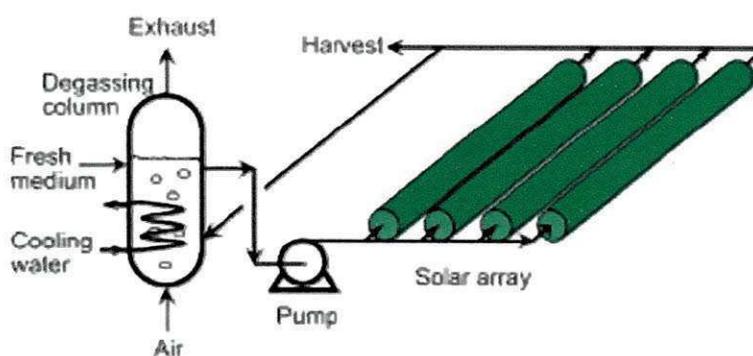
Figura 08 – Tipos de fotobioreatores



Fonte: World (2008)

O esquema de fotobioreator está ilustrado na Figura 09 onde existe uma unidade de degaseificação para eliminar o oxigênio saturado e evitar a foto-oxidação das células. Além do mais, os fotobioreatores requerem resfriamento durante as horas do dia, sendo útil o controle da temperatura durante a noite, diminuindo a temperatura para evitar a perda de biomassa pela respiração. Esse controle pode ser feito com custos reduzidos utilizando um trocador de calor, localizado na coluna de degaseificação (MOLINA GRIMA; FERNÁNDEZ et al., 2001).

Figura 09 – Esquema de fotobioreator



Fonte: Chisty (2007)

O controle operacional também permite otimizar de acordo com as características fisiológicas das espécies algal a serem cultivadas (MATA, 2010).

Dependendo do tipo de fotobioreatores eles apresentam várias vantagens frente às lagoas abertas como: 1-oferecer melhor controle nas condições do cultivo e dos parâmetros que interferem no crescimento (pH, temperatura, mistura, CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>); 2- previne a evaporação, 3- menor perda de CO<sub>2</sub>, 4- maior concentração de células, 5- alta produtividade volumétrica, 6- menor impacto ambiental, 7- evita a contaminação ou minimiza a invasão de micro-organismos (MATA, 2010).

Por outro lado, os fotobioreatores têm sérias desvantagens como: 1- superaquecimento, 2- incrustações biológicas; 3- acúmulo de oxigênio; 4- dificuldade em mudança de escala; 5- alto custo de construção e operação (MATA, 2010).

Os fotobioreatores têm diferentes tipos de modelos, basicamente são: os tubulares ou os tipos planos os mais utilizados. Sendo os tubulares considerados mais apropriados para cultivo ao ar livre (HARUN et al., 2010).

A utilização de fotobioreatores é feita para o cultivo laboratorial, semi-industrial ou industrial, Pirt et al. (1983) foram os primeiros a indicarem a possibilidade de utilização de reatores tubulares para a produção de biomassa de micro-organismos fotossintetizantes que, na ocasião, propuseram a teoria e o desenho dos equipamentos. O maior benefício dos fotobioreatores é a redução do efeito de sombreamento entre os micro-organismos. A desvantagem dos reatores em relação aos tanques abertos está relacionada aos custos para a mesma produção de microalgas (DAY; EDWARDS; RODGERS, 1991; GLAUDE; MAXEY, 1994).

#### 3.4.5.1 Comparativo entre tanques abertos e fotobioreatores

Para uma melhor seleção dos processos de produção de biomassa é preciso fazer uma comparação entre os dois tipos lagoas *raceway* e fotobioreatores. A Tabela 4 apresenta um estudo realizado por Chisti (2007a) que compara os métodos de produção de biomassa de microalgas para os dois tipos de sistemas. Essa comparação tem como base de cálculo a produção de 100 toneladas de biomassa para os dois sistemas.

Nesse estudo verifica-se que a produtividade de óleo nos fotobioreatores é maior que nas lagoas *raceway*, além do mais, os métodos de separação nos fotobioreatores são menos onerosos que nas lagoas *raceway*, visto que a concentração de biomassa nos fotobioreatores é 30 vezes maior facilitando a separação da biomassa. A Tabela 03 apresenta a comparação dos métodos de produção de microalgas para biocombustível em fotobioreatores e *raceway*.

Tabela 03 – Comparação dos métodos de produção de microalgas para biocombustível em fotobioreatores e *raceway*

Variáveis	Fotobioreatores	Lagoas <i>Raceway</i>
Produção anual de biomassa-Kg	100.000	100.000
Produtividade volumétrica (Kg/m <sup>3</sup> d)	1,535	0,117
Produtividade por área (Kg/m <sup>2</sup> d)	0,048 <sup>a</sup> 0,072 <sup>c</sup>	0,035 <sup>b</sup>
Concentração de biomassa no meio (Kg/m <sup>3</sup> )	4	0,14
Área necessária (m <sup>2</sup> )	5681	7828
Rendimento de óleo (m <sup>3</sup> /ha)	136,9 <sup>d</sup> 58,7 <sup>e</sup>	99,4 <sup>d</sup> 42,6 <sup>e</sup>
Consumo anual de CO <sub>2</sub>	188.356	188.356
Geometria do sistema	132 unidades tubos de 80m, com 0,06m de diâmetro, em paralelo	978m <sup>2</sup> /tanque com 12m de largura, 82m de comprimento e 0,30m de profundidade
Número de sistemas	6	8

Fonte: Baseado em *Biodiesel from Microalgae* (CHISTI, 2007)

<sup>a</sup>Baseado na área do estabelecimento, <sup>b</sup>baseado na área do tanque, <sup>c</sup> baseado na área projetada dos tubos do fotobioreator, <sup>d</sup> baseado em 70% em peso de óleo na biomassa, <sup>e</sup>baseado em 30% em peso de óleo na biomassa.

Detalhando em termos de custos, a produção de um quilograma da biomassa é US\$2,95 e US\$3,80 para os fotobioreatores e *raceways*, respectivamente, admitindo a produção dos sistemas apresentados na Tabela 04. Caso a capacidade anual de biomassa ultrapassar 10.000 toneladas, os custos de produção por quilograma reduzem para US\$ 0,47 e US\$ 0,60, para os fotobioreatores e tanques abertos, respectivamente, devido à escala econômica (CHISTI, 2007a). A produtividade volumétrica dos fotobioreatores é 13 vezes maior que nos tanques abertos. Se considerada a produtividade por área, a produtividade no primeiro caso é 100% superior. As necessidades de área também favorecem aos fotobioreatores, que é 30% inferior, assumindo uma produtividade igual entre os dois equipamentos.

Tabela 04 – Comparação entre os diversos aspectos dos tanques *raceway* e fotobiorreatores

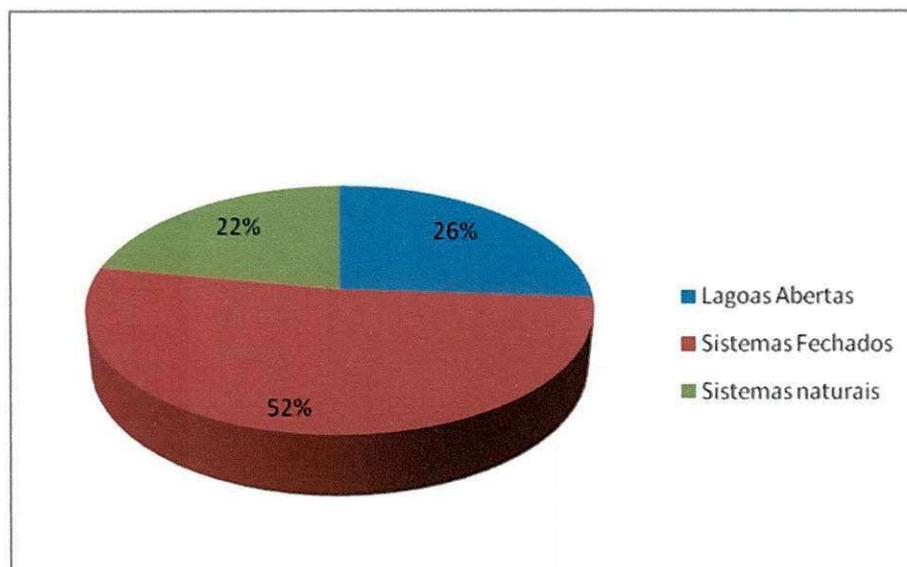
SISTEMAS	TANQUES <i>RACEWAY</i>	FOTOBIOREATORES
Espaço requerido	Alto	Baixo
Perda de água	Muito alta, podendo causar precipitação salina	Baixa
Perda de CO <sub>2</sub>	Alta, dependendo da profundidade da lagoa	Baixa
Concentração de oxigênio	Normalmente baixa por causa da contínua saída de gases	O <sub>2</sub> deve ser removido para prevenir inibição da fotossíntese e danos foto-oxidativos
Controle do processo	Difícil	Fácil
Controle da espécie	Difícil	Fácil
Controle de Temperatura	Difícil	Temperatura mais uniforme
Risco de contaminação	Alto	Baixo
Qualidade da biomassa	Alta variabilidade	Baixa variabilidade
Concentração de biomassa	Baixa, entre 0,1 – 0,5g/L	Alta, entre 2 e 8g.L <sup>-1</sup>
Custo de separação/Colheita	Alto (devido à baixa concentração da espécie)	Relativamente baixo (devido à alta concentração de biomassa e melhor controle sobre as espécies)
Flexibilidade de produção	Possível apenas para poucas espécies, com difíceis trocas de culturas	Alta, inclusive é possível a troca de culturas
Dependência do clima	Alta (intensidade luminosa, temperatura e chuvas)	Média (intensidade luminosa, requer resfriamento)
Custo de implantação	Alto (US\$ 100.000 por ha)	Muito alto (US\$ 1.000.000 por ha)
Custo operacional	Baixo	Alto
Eficiência na captura da luz	Baixo	Alto
Mudança de escala	Difícil	Difícil
Atuais aplicações comerciais	5000t de biomassa por ano	Limitado a processos para componentes de alto valor agregado ou algas utilizadas para alimentação e cosméticos.

Fonte: Carlsson (2007), Beilen et al. (2007), Mata et al. (2010) e Harun et al. (2010)

O cultivo de microalgas tem sido efetuado em maiores proporções nos sistemas fechados ou fotobiorreatores, os quais sempre são instalados próximos a fontes de liberação de CO<sub>2</sub>, com o intuito de servir como seqüestro de carbono minimizando o efeito estufa. As

lagoas abertas são também bastante utilizadas principalmente nas regiões onde existem terras suficientes para a instalação das lagoas, sem comprometer a produção dos produtos agrícolas. A Figura 10 apresenta as tecnologias utilizadas para os cultivos de microalgas para produção de biodiesel (GU; SINGH, 2010).

Figura 10 – Percentual dos sistemas de cultivo de microalgas mundialmente para produção de biodiesel

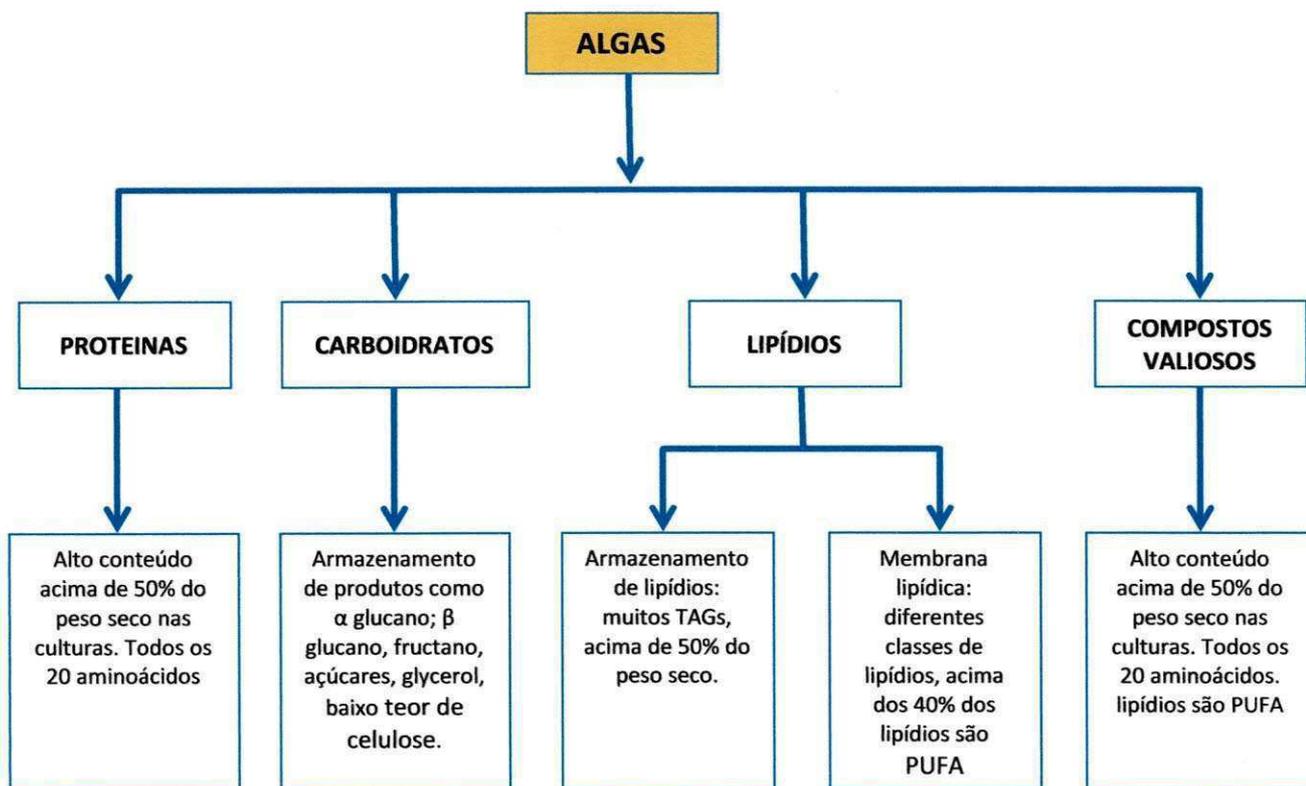


Fonte: Gu e Singh (2007)

### 3.4.6 Viabilidade para produção das microalgas

Com o intuito de tornar a produção das microalgas economicamente viável, muitos pesquisadores vêm sugerindo a criação de uma biorefinaria. O conceito da biorefinaria é semelhante às refinarias de petróleo de hoje, a qual produz diversos óleos e produtos (petroquímicas) de petróleo. A biorefinaria consiste em produzir biodiesel em grande escala por meio do cultivo de microalgas. Além, do biodiesel pode-se também obter simultaneamente alimentos para animal, biogás, bioetanol e energia elétrica. A Figura 11 apresenta o fluxograma que contém os principais componentes presentes nas microalgas.

Figura 11 – Fluxograma dos componentes típicos das microalgas



Fonte: Adaptação de Gu e Singh, 2007

### 3.5 MICROALGAS COMO FONTE DE PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEL

A substituição de todo o combustível derivado de petróleo utilizado pelos transportes nos EUA por biodiesel de oleaginosa requeria 0,53 bilhões de m<sup>3</sup> de biodiesel anualmente, na razão de consumo de 2007. Para abastecer 50% do combustível utilizado pelo setor de transporte nos EUA utilizando o óleo de palma, que é derivado de uma planta com alto rendimento de óleo por hectare, seria necessário 24% do total de área agrícola disponível no país. Em contraste, caso fosse utilizado óleo de microalgas, cultivado em fotobioreatores, seria necessário 1 a 3% do total da área de cultivo (CHISTI, 2007b).

De acordo com Malcata (2011), admitindo a produção de biodiesel através da palma, que é a oleaginosa com maior produtividade de óleo com rendimento de 6000l/ha, para suprir a necessidade presente de combustível para o transporte dos EUA, é preciso 110 milhões de ha, que corresponde 60% de suas áreas agricultáveis. Por outro lado, se o biocombustível

fosse produzido por meio das microalgas com conteúdo de 30% de óleo em peso seco de biomassa obteria uma produtividade de  $1,5\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{dia}^{-1}$ , que significa uma produção de  $120\text{m}^3\text{óleo}\cdot\text{ha}^{-1}$ . Atualmente, os EUA requerem 500 milhões de  $\text{m}^3$  de bicombustível para atender toda sua frota de transporte, com a produção a partir das microalgas teria uma área ocupada de 5,4 milhões de ha que corresponde a 3% da área agricultável dos EUA.

Microalgas podem oferecer vários tipos de biocombustíveis renováveis. Estes incluem o metano ou biogás produzido pela digestão anaeróbica da biomassa, o biodiesel derivado de óleo de microalgas, biohidrogênio produzido pela lignina celulósica através da fermentação, bioetanol e biobutanol obtido do açúcar da biomassa por meio de fermentação (BOROWITZKA, 1999; MALCATA, 2011). A idéia da utilização de microalgas como fonte de combustível não é nova, mas agora está sendo levado a sério por causa do aumento do preço do petróleo e, mais significativamente, a preocupação emergente sobre o aquecimento global que está associado com a queima de combustíveis fósseis. Pesquisas recentes têm demonstrado que a biomassa de microalgas parece ser a fonte promissora de biodiesel renovável que é capaz de satisfazer a demanda global por combustíveis para uso em transportes. As microalgas como fonte de produção de biodiesel têm a vantagem de não comprometer a produção de alimentos, forragens e outros produtos derivados de culturas.

O cultivo de microalgas apresenta uma característica importante em relação às outras espécies vegetais que é a de possuírem elevadas taxas de crescimento e em meios de culturas relativamente simples, duplicando sua biomassa em 24 horas (CHISTI, 2007a; SOUZA, 2008) Um componente fundamental para o seu crescimento consiste em um eficiente sistema de fotossíntese, o que requer iluminação, fator vantajoso no Brasil principalmente na região Nordeste que apresenta alta insolação durante a maior parte do ano.

As vantagens do cultivo de microalgas em relação às plantas superiores como fonte de produção de biocombustíveis são numerosas, tais como:

- 1º As microalgas podem sintetizar e acumular grandes quantidades de lipídios neutros e óleo [20-50% de peso seco e crescer a taxas elevadas (por exemplo 1-3 duplicações / dia).
- 2º A produção de óleo por área de culturas de microalgas pode exceder consideravelmente o rendimento das melhores oleaginosas.
- 3º As microalgas podem ser cultivadas em água salgada / salobra / salgada costeiras em terras não aráveis, e não competir por recursos com a agricultura convencional.
- 4º Microalgas toleraram terras marginais (por exemplo, árido deserto, e terras semiáridas) que não são apropriadas para a agricultura convencional.

- 5º Microalgas podem utilizar nitrogênio e fósforo a partir de uma variedade de fontes de águas residuais (por exemplo, escoamento agrícola, operações concentradas de alimentação animais e efluentes industriais e municipais), oferecendo o benefício adicional de biorremediação de águas residuárias.
- 6º As microalgas promovem o seqüestro de CO<sub>2</sub>, gases emitidos por usinas termoelétricas por meio do uso de combustível fóssil e outras fontes, reduzindo assim as emissões de gases de efeito estufa maior. 1 kg de biomassa de algas exige cerca de 1,8 kg de CO<sub>2</sub> (RODOLFI, 2009).
- 7º Microalgas produzem diversas substâncias de alto valor agregados, por exemplo, biopolímeros, proteínas, polissacarídeos, pigmentos de alimentos para animais e fertilizantes e seu cultivo não precisa de herbicidas e pesticidas.
- 8º As microalgas crescem em recipientes apropriados (fotobioreatores) durante todo o ano, com maior produtividade de biomassa anual com base na área.
- 9º As microalgas requerem muito menos água que as plantas terrestres, pois, para produzir 1L de óleo as microalgas requerem apenas 1,5L contra 10.000L das plantas, (MALCATA, 2011).

A comparação de algumas fontes de óleo vegetal é indicada na Tabela 05 que apresenta, as microalgas como sendo a única fonte de biodiesel, que tem potencial para substituir completamente o combustível fóssil.

Tabela 05 - Comparação das algas com diferentes culturas na produção de biocombustível

<b>Tipos</b>	<b>Galões de óleo por hectare por ano</b>
<b>Algas</b>	5000 – 20.000
<b>Palma</b>	635
<b>coco</b>	287
<b>Canola</b>	127
<b>Amedoim</b>	113
<b>Girassol</b>	102
<b>Soja</b>	48
<b>Milho</b>	39

Fonte: Khan et al. (2009)

Rodolfi et al. (2009), verificou que o teor de óleo em microalgas pode exceder 80% do peso da biomassa seca e que os níveis de óleo de 20-50% são bastante comuns (Tabela 06).

Tabela 06- Conteúdo em óleo de algumas microalgas

<b>Microalga</b>	<b>Conteúdo de óleo(% peso seco)</b>
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella sp.</i>	28-32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16-37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis sp.</i>	25-33
<i>Nannochloris sp.</i>	20-35
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30
<i>Schizochytrium sp.</i>	50-77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23

Fonte: Rodolfi et al. (2009)

Rodolfi et al. (2009), estudou algumas cepas de microalgas e selecionou-as por seu potencial de produção de lipídios, avaliando a produtividade de biomassa e teor de lipídios em culturas em balão de 250 mL (Tabela 07). A espécie que mostrou o melhor índice de produtividade de biomassa e conteúdo lipídico, foi *Nannochloropsis sp.* de habitat marinho com um teor de lipídios de 30% ou maior e uma produtividade de lipídios variando de 55 a 61 mg.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>. A espécie *Nannochloropsis* marinho pode ser considerado como uma das melhores candidatas para a produção de óleo de algas.

As dificuldades relacionadas a uma eficiente produção de biodiesel a partir de microalgas consistem em encontrar uma cepa com capacidade de produzir altos teores de lipídios e uma taxa de crescimento elevada em um sistema de cultivo de baixo custo (como por exemplo, fotobioreator) que seja o mais apropriado para a cepa utilizada. Além disso, um método de extração do óleo economicamente viável deve ser desenvolvido (ALGACULTURE, 2008).

A viabilidade econômica da cultura em massa de algas para produção biodiesel depende da grande produtividade de biomassa do alto rendimento lipídico. Para microalgas lipídios para que o custo competitivo como fonte de combustível líquido, seja a matéria-prima organismo deve ser capaz de rendimentos de lipídio (50 -60% do peso da biomassa na forma de lipídios) (NEENAN et al., 1986).

Tabela 07 - Produtividade de biomassa e lipídica de diversas espécies de microalgas

Espécies de microalgas	Produtividade de Biomassa (g.L <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	Conteúdo lipídico (%biomassa)	Produtividade lipídica (mg.L <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )
<i>Chaetoceros muelleri</i>	0,07	33,6	21,8
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	0,04	39,8	17,6
<i>Skeletonoma sp.</i>	0,09	31,8	27,3
<i>Chlorella sp.</i>	0,23	18,7	42,1
<i>Chlorella sorokiniana</i>	0,23	19,3	44,7
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,17	19,2	32,6
<i>Chlorococum sp</i>	0,28	19,3	53,7
<i>Scenedemus quadricauda</i>	0,19	18,4	35,1
<i>Scenedemus sp.</i>	0,26	21,1	53,9
<i>Tetraselmis sp.</i>	0,30	14,7	43,4
<i>Nanochloropsis sp</i>	0,21	29,6	61,0
<i>Isochrysis sp</i>	0,14	27,4	37,8
<i>Pavlava salina</i>	0,16	30,9	49,4
<i>Pavlava lutheri</i>	0,14	35,5	50,2
<i>Parphyridium cruentum</i>	0,37	9,5	34,8

Fonte: Rodolfi et al. (2009)

Analisando a Tabela 07 verifica-se que as microalgas que apresentam maior produtividade lipídica juntamente com a maior produtividade de biomassa (crescimento) é a *Chlorella sp*, *Chlorella vulgaris* e *Chlorella sorokiniana*. Sendo assim, estas espécies podem ser bastante promissoras para produção de biocombustível. Outra espécie como a *Nanochloropsis sp* que apresenta elevada produtividade lipídica e produtividade de biomassa equivalente a *Chlorella sp*, *Chlorella vulgaris*. Que também não deixa de ser uma opção bastante atrativa para produção de biodiesel. No entanto, *Nanochloropsis sp* tem dimensões bem menor que *Chlorella sp*, *Chlorella vulgaris* e isso pode acarretar num aumento dos custos de separação da biomassa.

### 3.5.1 Produção de lipídios por microalgas

Estudos comparativos mostram que o crescimento de biomassa de microalgas é cerca de 50 vezes maior do que nas plantas geralmente utilizadas como fontes de energia. A manipulação das condições de cultivo pode dobrar o conteúdo lipídico (SOUZA, 2008; HU et al., 2008). O acúmulo de lipídios nas algas ocorre tipicamente em períodos de “estresse”,

incluindo crescimento sob condições onde há deficiência no aporte de nutrientes. O conteúdo de lipídios e ácidos graxos nas microalgas varia de acordo com as condições da cultura.

Como fatores nutricionais que podem aumentar a quantidade de lipídios totais, pode-se citar a privação de nitrogênio (SPOLARE, 2006, MENG et al., 2008), o aumento da concentração do ferro (LIU; WANG; ZHOU, 2008; KUDO et al., 2001), a privação de silício em algas que possuem revestimento externo desse mineral como as diatomáceas (SIRÓN; GIUSTI; BERLAND, 1989), a deficiência de fósforos (LOMBARDI; WANGERSKI, 1991), a salinidade elevada (RAO et al., 2007), presença de alguns metais pesados como o cádmio (GUSCHINA; HARWOOD, 2006) ou co-imobilizados em alginato com a bactéria brasileira *Azospirillum* (LEBSKY et al., 2001; DE-BASHAN et al., 2002) e a presença de uma fonte de carbono para microalgas que tenham capacidade heterotrófica (CERÓN GARCIA et al., 2000).

Quando o meio é deficiente em nitrogênio ou fósforo, o que pode ocorrer na fase estacionária do cultivo ou quando o meio de cultura adicionado é pobre nessas substâncias, as células exibem um aumento da velocidade de captação do nutriente limitante. À medida que o nutriente vai se esgotando no meio, fica mais difícil para a célula encontrar esse nutriente. O fato de a célula ter aprimorado seus sistemas de captação para manter sua velocidade de crescimento, e não haver disponibilidade do nutriente para isso ocorrer, gera um estresse fisiológico que aumenta à medida que a concentração dos nutrientes diminui. Esse estresse altera o metabolismo microalgal, direcionando os processos metabólicos para a produção de lipídios de reserva para preparar a célula para um período de privação (FALKOWSKI, 199; ALONSO et al., 2000; BEARDALL; YOUNG; ROBERTS, 2001; SANTOS; MACEDO; ALEGRE, 2003; MENG, 2006; LOURENÇO, 2006; GREENE; GEIDER; PENTEADO, 2010).

As microalgas sintetizam duas classes principais de lipídios: a) lipídios neutros, que compreendem os mono, di e triacilgliceróis; e b) lipídios polares que incluem os fosfolipídios e galactolipídios. Esses lipídios são produzidos a partir das fontes de carbono fornecidas à microalga, sejam elas orgânicas, como a glicose, acetato ou glicerol, ou inorgânicas como o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (HUANG et al., 2010). O perfil lipídico, as proporções relativas de lipídios neutros e polares alteram-se com a fase do ciclo de crescimento em que o cultivo se encontra: na fase exponencial ou estacionária. Lipídios são mais abundantes quando as células estão na fase estacionária. Lipídios polares e os lipídios poli-insaturados se apresentam em maiores quantidades na fase exponencial do cultivo (ALONSO et al., 2000).

Essa mudança do perfil lipídico com a fase do cultivo é explicada por Grima et al (1994), pela quantidade de nutrientes e luminosidade. Quando há disponibilidade de nutrientes, a tendência do cultivo é possuir um maior número de células gerando uma maior competição nutricional e menor disponibilidade de luz. Nessa condição, a alga é obrigada a ativar um aparato fotossintético mais complexo e passa a sintetizar mais lipídios polares para fazer parte das membranas dos cloroplastos. Isso quer dizer que células jovens, na fase exponencial do cultivo, tendem a captar mais nitrogênio pela alta disponibilidade destes nutrientes no meio, produzindo, assim, mais lipídios polares. Quando há restrições de nutrientes e uma alta concentração de células, a captação de nitrogênio e fósforo diminui, as células param de se multiplicarem e o cultivo entra na fase estacionária. A célula então passa a utilizar fontes de carbono, seja orgânico ou inorgânico desde que estejam disponíveis, para manutenção do seu metabolismo e para produção de lipídios de reservas.

#### 3.5.1.1 Biossíntese de lipídios

A biossíntese de triglicerídeos nas microalgas compreende três etapas principais: a formação de acetil coenzima A (Acetil – CoA) no citoplasma, a elongação e dessaturação das cadeias carbônicas dos ácidos graxos e a formação dos triacilgliceróis (HUANG et al., 2010).

##### *Formação de acetil-CO-A*

As rotas de utilização de fontes de carbono, como dióxido de carbono, levam à formação de acetil – CoA nos cloroplastos durante as reações fotossintéticas e ciclo de Calvin. O piruvato originando na via glicolítica é convertido pelo complexo piruvato desidrogenase em acetil CoA (LEHNINGER, 2004; YANG; HUA; SHIMIZU, 2000).

O gliceraldeído-fosforo (GAP), precursor do piruvato, é o ponto chave das duas vias. O GAP é formado no ciclo de Calvin em reações de fixação de CO<sub>2</sub> e durante a via glicolítica. Pode também ser formado a partir de outras fontes de carbono. O GAP é exportado do cloroplasto ao citoplasma onde é utilizado na síntese de lipídios para a formação de ácidos graxos, na síntese de lipídios para a formação de ácidos graxos, na síntese de açúcares ou na oxidação a piruvato pela via glicolítica (HUANG et al., 2010).

### *3.5.1.1.1 Formação de ácidos graxos e alongação da cadeia carbônica*

A síntese da cadeia carbônica dos ácidos depende principalmente da reação de dois sistemas enzimáticos: a ACCE (acetil- CoA carboxilase), responsável pela conversão do acetil- CoA em malonil- CoA, e a síntese de ácido graxo, responsável por ativar os grupos acetil e malonil para iniciar o processo de alongação. Em cada passagem por este ciclo, a cadeia carbônica é estendida em 2 carbonos.

A formação de ácido graxo de cadeia curta ( $C_{14}$ -  $C_{18}$ ) é similar em células de plantas superiores, animais, fungos, bactérias e algas. Em microalgas, a dessaturação da cadeia carbônica do ácido graxo ocorre no carbono 18 e facilita alongação da cadeia carbônica para produzir ácidos graxos de cadeia longa, o que é incomum em plantas. Ácidos graxos de cadeia longa ( $C_{20}$ -  $C_{22}$ ) são produzidos com frequência pelas microalgas, mas a quantidade varia de espécie para espécie.

### *3.5.1.1.2 Formação de triacilgliceróis*

Os precursores da formação de triacilgliceróis são os compostos Acil- CoA graxo, formando a partir de ácidos graxos sob ação da acil- CoA, e L-glicerol- 3-fósforo, formado através da ação da glicerol-3-fósforo-desidrogenase. A condensação destes precursores.

### *3.5.1.1.3 A influencia do nitrogênio na produção de lipídios*

Como já foi relatada anteriormente, a depleção de nitrogênio pode aumentar o conteúdo de lipídios de uma microalga. Isso é explicado pelo fato de que a falta de nitrogênio direciona o metabolismo microalgal, antes voltado à multiplicação celular, para a produção de componentes de reserva, como os ácidos graxos saturados, para preparar a célula para um período de privação (ALONSO et al., 2000).

Youngmanitchai e Ward (1991) descreveram que a concentração de nitrogênio no meio influencia no grau de insaturação dos lipídios produzidos. Para algumas microalgas,

como a *Dunaliella salina* e *Botryococcus braunii*, a depleção de nitrogênio aumenta a produção de ácidos graxos polinsaturados. Já para a *Phaeodactylum trocornutum*, a produção desses ácidos graxos diminui sob privação e aumenta em um meio rico em nitrogênio.

Santos, Macedo e Alegre (2003) privaram a microalga *spirulina máxima* de nitrogênio, e obtiveram um aumento de até 207% de lipídios totais por grama de biomassa seca. Borowitzka (1992) submeteu a microalga *Phaeodactylum trocornutum* à privação de nitrogênio e obteve um aumento de aproximadamente 20% na produção de lipídios por grama de biomassa seca.

#### 3.5.1.1.4 A influencia do ferro na produção de lipídios

No ambiente natural, muitas vezes a pequena disponibilidade de ferro limita o crescimento algal, uma vez que, o ferro tem uma importância essencial para vários processos bioquímicos agindo como cofator, sendo responsável pela redução de nitrato, nitrito e sulfato, na via biossintética da clorofila e dos citocromos, na fotossíntese e na cadeia de transporte de elétrons, na fixação de nitrogênio molecular e na desintoxicação de espécies reativas de oxigênio (LOURENÇO, 2006).

O ferro ocorre em várias formas químicas, sendo que o  $Fe^{+2}$ , apresenta uma maior solubilidade que o  $Fe^{+3}$  em meio aeróbico e em pH neutro ou alcalino. Os micro-organismos não têm capacidade de assimilar o ferro na sua forma iônica, mas sim na forma ligada a agentes quelantes, como o EDTA, tomando o ferro biodisponível (LOURENÇO, 2006).

De acordo com Liu, Wang e Zhou (2007), o ferro tem sido demonstrado ser um fator chave no aumento da biomassa de fitoplâncton. Além disso, certas condições de cultivo podem resultar em elevadas quantidades de lipídios. Portanto, o efeito de ferro no crescimento e no teor de lipídios na linhagem marinha *C. vulgaris* foi investigado para descobrir se o ferro poderia promover a produtividade de biomassa, ou acúmulo de lipídios em condições de laboratório. Os estudos de Liu, Wang e Zhou (2007), mostraram que a densidade celular final foi aumentada pela adição de  $Fe^{+3}$  assim como houve um aumento considerável no teor de lipídios na biomassa seca *C. vulgaris*. Esses pesquisadores observaram que o incremento de lipídios com a suplementação de Fe atinge 56,6% quando comparada a produção com meio padrão.

### 3.5.1.1.5 A influencia do fósforo da produção de lipídios

A deficiência de fósforo no meio afeta o perfil lipídico da célula, já que o fósforo faz parte dos fosfolipídios presente na membrana celular, uma limitação desse nutriente direciona o metabolismo da microalga para produção de triglicerídeos saturados e lipídios neutros, causando também a redução dos ácidos graxos poli-insaturados (SIRON; GIUSTI; BERLAND, 1989; PENTEADO, 2010).

Alguns estudos relatam um aumento na quantidade de lipídios totais intracelulares, aliada à diminuição do crescimento celular e mudança no perfil lipídico da célula com a redução de fósforo no meio de cultivo. Khozin-Goldberg (2006), obtiveram um aumento em 15,5% em ácidos graxos poli-insaturados e 39% de triacilgliceróis cultivando a *Monodus subterraneus* em meio com deficiência de fósforo. Lombardi e Wangerski (1991) submeteram a microalga *Chaetoceros gracilis* a um meio com deficiência de fósforo e obtiveram como resultado uma maior quantidade de lipídios totais intracelulares atribuídas a maior produção de triglicerídeos. Obtiveram ainda uma redução na produção de fosfolipídios e também um baixo crescimento celular. Esses resultados são consequência da redução da divisão celular e da síntese de clorofila causada pela privação do fósforo. A baixa captação desse nutriente alterou a velocidade de crescimento da microalga, gerando uma situação de estresse fisiológico, que direcionou o metabolismo da célula principalmente de triacilgliceróis (PENTEADO, 2010).

### 3.5.1.1.6 A influencia do silício da produção de lipídios

Uma baixa disponibilidade de silício induz nas diatomáceas um aumento na produção de lipídios (KEYLE et al., 1986). Alguns estudiosos conseguiram obter um aumento de lipídios por biomassa seca em cultivo de diatomáceas como a *Chaetoceros gracilis*, *Hantzschia DI-60* e a *Cyclotella cryptica*, apesar de ter obtido uma diminuição considerável do crescimento celular (ROESLLER, 2008; LOMBARDI; WANGERSKI; SHIHARAN et al., 2001).

### 3.5.1.1.7 A influencia de uma fonte de carbono na produção de lipídios

O carbono é um macronutriente necessário em maiores concentrações para o cultivo algal, uma vez que constitui 50% da biomassa seca (DERNER, 2006). O carbono pode estar na forma inorgânica, como o  $\text{CO}_2$  e compostos derivados como ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , ou  $\text{CO}_3^{2-}$ ), que pode ser proveniente do ar atmosférico ou de ar injetado na cultura, ou na forma orgânica, como a glicose, acetato, lactato e aminoácidos. Sabe-se que muitas microalgas só se desenvolvem em cultivo com a fonte de carbono inorgânico por elas serem estritamente autotróficas. Outras microalgas podem utilizar também outras fontes de carbono e, simulando tanto a fonte de carbono inorgânico como orgânico, simultaneamente, efetuando assim um cultivo mixotrófico (DERNER, 2006). Importante relatar que, o glicerol possui um especial interesse como fonte de carbono já que o mesmo é um resíduo gerado durante a reação de transesterificação durante a produção de biodiesel (CERÓN GARCIA et al., 2000).

Sob condições mixotróficas, algumas microalgas aumentam sua taxa de crescimento e sua biomassa, além de produzirem uma maior concentração de ácidos graxos (CERÓN GARCIA et al., 2000). Isso pode ser explicado pelo fato de que o uso de fontes suplementares de carbono minimiza as consequências de autoassombreamento causado pela elevada densidade celular. Com a baixa disponibilidade de luz em cultivos densos, a assimilação do carbono inorgânico pelas microalgas fica prejudicada. E quando existe outra fonte de carbono, a alga irá assimilar mais carbono, promovendo um aumento na produção de carboidratos, proteínas e lipídios (DERNER, 2006).

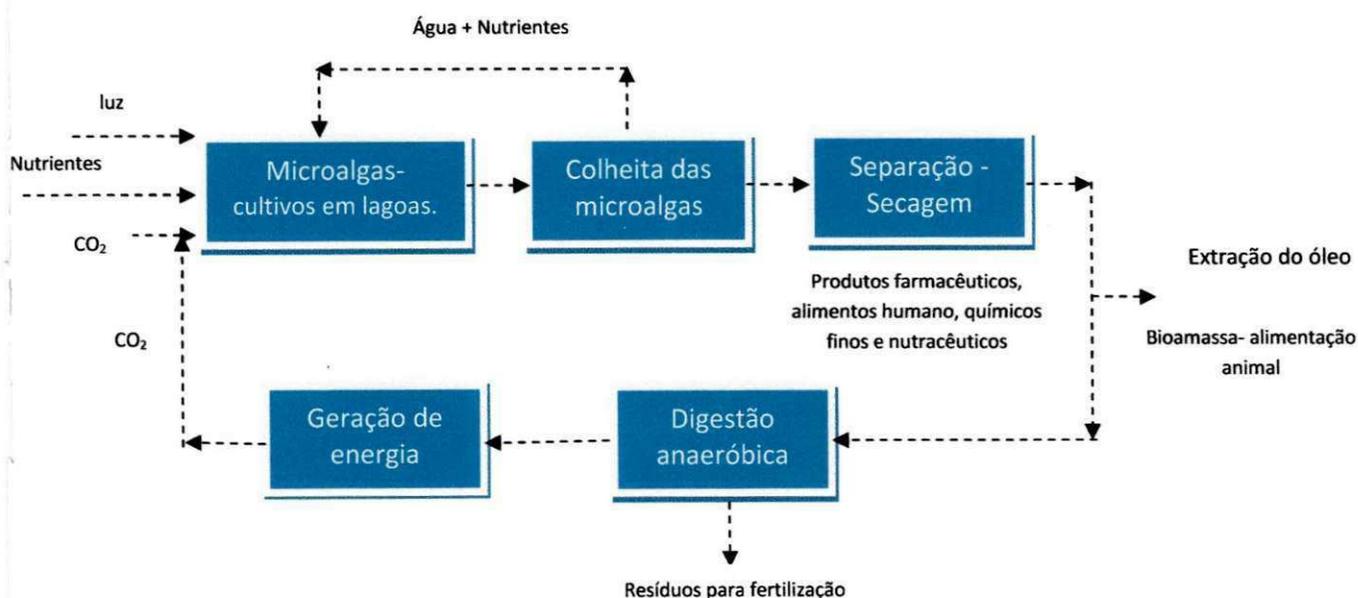
Outros autores relatam um aumento da biomassa seca e aumento da produção de lipídios pela microalga *Phaeodactylum tricornutum* utilizando como fontes de carbono como extrato de centeio, trigo ou batata (PENTEADO, 2010). Cerón Garcia et al (2000) acrescentaram glicerol ao meio durante o cultivo da microalga *Phaeodactylum tricornutum* e obtiveram uma produção de biomassa seca de 74% maior que um cultivo sem a fonte de carbono orgânico e ainda o percentual de lipídios por biomassa seca 3 vezes maior do que o controle sem glicerol.

### 3.6 OUTRAS APLICAÇÕES DAS MICROALGAS

Como já relatado algumas espécies de microalgas contém alto teor de lipídios em sua biomassa que pode ser extraído e convertido em biodiesel. Os métodos mais comuns para extração dos lipídios podem ser extração por solvente, extração fluida supercrítico e ultrasom. Depois da extração dos lipídios, realiza-se a reação de transesterificação para obter o biodiesel. Contudo, o resíduo da biomassa que resta após a extração dos lipídios pode ser convertida para produção de diferentes tipos de produtos como biometano, bioetanol e biohidrogênio (HARUN et al., 2010).

Em termos ambientais as microalgas também podem trazer várias contribuições para reduzir os problemas ambientais, como o efeito estufa pela absorção do  $\text{CO}_2$  proveniente dos processos industriais, algumas espécies têm habilidade para fixar nitrogênio, fósforo e metais pesado. A Figura 12 mostra um conceito esquemático resumido para o desenvolvimento de vários produtos das microalgas com reciclagem das fontes de carbono.

Figura 12 – Esquema 1 de diagramas que apresenta o processo biotecnológico das microalgas



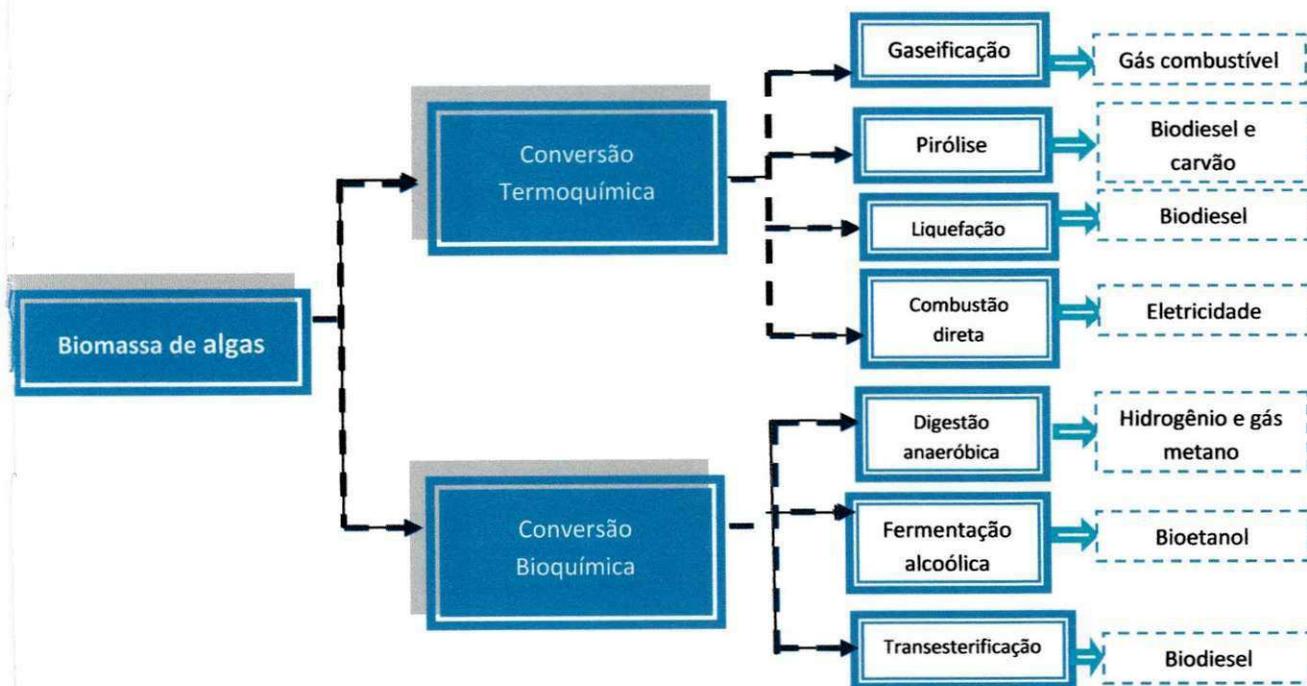
Fonte: Harun et al. (2010)

### 3.6.1 Geração de energia a partir das microalgas

As reações de conversão energética utilizando a biomassa das microalgas podem ser separadas em duas categorias as reações de conversões termoquímicas e as conversões bioquímicas (Figura 13). Os motivos que influenciam na escolha do processo de conversões incluem: o tipo e a quantidade de biomassa, a forma de energia desejada, os custos, a especificidade do projeto e a forma final desejada do produto (BRENNAM; OWENDE, 2010).

A conversão termoquímica consiste na decomposição térmica dos componentes orgânicos da biomassa realizável por diferentes processos como a combustão direta, gaseificação, liquefação termoquímica e pirólise. A conversão bioquímica consiste na conversão da biomassa para produção de energia por meio dos processos biológicos que incluem a digestão anaeróbica, fermentação alcoólica a produção de hidrogênio fotobiológico (OWENDE; BRENNAM, 2010).

Figura 13 – Conversões energéticas utilizando a biomassa algal



Fonte: Brennam e Owende (2010)

### 3.6.2 Bioetanol

Bioetanol produzido pela biomassa é produzido comumente por dois processos: 1- processo bioquímico (fermentação) e 2 – processo termoquímico (Gaseificação). Muitas das biomassas utilizadas como matéria-prima objetivando a produção de bioetanol ou etanol, como a cana de açúcar e o milho, têm grandes dificuldades devido ao seu valor alimentício e por requererem grandes quantidades de terras para seus cultivos, competindo assim diretamente com os cultivos com finalidade alimentares pela terra a fim de efetuarem a plantação.

Assim sendo, o grande interesse focado nas microalgas vem crescendo para produção de etanol, uma vez que a biomassa das microalgas serve como matéria-prima para realização do processo de fermentação, pois, isto é possível devido à presença de carboidratos e proteínas presentes na biomassa que são fontes de carbono para a fermentação (GU; SINGH, 2010; HARUN et al., 2010).

Para a fermentação dos carboidratos podem ser utilizadas bactérias, fungos ou leveduras na produção do bioetanol em condições anaeróbicas. Na fermentação além do etanol também ocorre a produção de CO<sub>2</sub> e vários subprodutos. Ueda et al. (1996) patentearam o sistema de fermentação alcoólica através das microalgas que consiste de um estágio inicial que produz o etanol através da fermentação anaeróbica em ambientes com ausência de luz. O etanol produzido da fermentação é purificado e o CO<sub>2</sub> produzido no processo fermentativo é reciclado para as lagoas de cultivo das microalgas que servirá como nutriente e favorece o crescimento. O segundo estágio consiste na utilização remanescente da biomassa algal resultante da fermentação sofrer uma digestão anaeróbica que terá como produto o gás metano que poderá ser convertido em eletricidade.

Os mais recentes trabalhos para produção de etanol tem sido apresentados por Harun et al (2010), eles estudaram a viabilidade das microalgas (*Chorococum* sp.) com substrato para fermentação utilizando leveduras e concluiu que as microalgas são bastante promissoras na obtenção de bioetanol.

Microalgas como a *Chlorella vulgaris* é uma excelente fonte para produção de etanol via fermentação devido seu alto conteúdo de amido (carboidratos ~37% de peso seco) e para o qual tem obtido uma eficiência de produção de etanol cerca de 65% (BRENNAM; OWENDE, 2010).

Moen et al. (2008 apud GU et al., 2010), demonstrou que as algas marrom marinhas produzem alta eficiência na produção de bioetanol comparada com outras espécies. Ueno et al. (1998 apud BRENNAN; OWENDE, 2010), também produziu etanol de microalgas via fermentação escura em algas marinhas verdes *Chlorococcum littorale*, sob condições anaeróbicas com o aumento da temperatura ocorreu uma maior produtividade de etanol atingindo  $450\mu\text{mol.g}^{-1}$  de base seca a  $30^{\circ}\text{C}$ .

### 3.6.3 Biometano

Nos processos descritos para produção de bioetanol via fermentação é imperativa a produção de biogás com o intuito de reduzir a produção de resíduos do processo de fermentação. O biogás é constituído de  $\text{CH}_4$  (55-75%),  $\text{CO}_2$  (25-45%) que é produzido durante a digestão anaeróbica por micro-organismos anaeróbicos. O metano gerado da digestão anaeróbica pode ser usado como gás combustível e também pode ser convertido para gerar eletricidade.

A digestão anaeróbica é um processo mais adequado quando os resíduos orgânicos apresentam alta umidade entre 80 a 90%, que pode ser útil quando a biomassa algal encontra-se molhada (BRENNAN; OWENDE, 2010). A digestão anaeróbica é bastante afetada pelo tamanho da cadeia carbônica dos resíduos orgânicos, temperatura, pH e tempo de retenção no reator. No entanto, o custo de produção do metano via microalgas é elevado comparado com outras fontes, por exemplo, a madeira.

Porém, a integração de um sistema de produção de metano integrado ao cultivo de microalgas no sistema de tratamento de águas residuárias é uma abordagem mais apropriada para reduzir os custos e torná-lo mais rentável (BRENNAN; OWENDE, 2010).

A biomassa residual da digestão anaeróbica também pode ser mais reprocessada e ser utilizada como fertilizantes. Este fato favorece as práticas agrícolas aumentando a eficiência da mesma e reduzindo o custo na produção de microalgas. As microalgas quase não contêm lignina e baixo teor de celulose isto aumenta a estabilidade e eficiência do processo de digestão anaeróbica, pois, tanto a lignina quanto a celulose que são de difícil digestão anaeróbica.

A primeira menção do uso de cultivo de microalgas para tratamento de águas residuárias e a colheita do lodo algal para produção de biogás por meio da digestão anaeróbica foi feito por Oswald e Gotaas (1957).

A importância de introduzir o cultivo de microalgas no tratamento de águas residuárias é que as microalgas na sua nutrição necessitam de compostos orgânicos assim favorece o tratamento das águas com a redução dos compostos de nitrogênio e fósforos. Logo, a remoção desses nutrientes nas águas residuárias, evita-se a eutrofização dos corpos aquáticos (MATA et al., 2010).

Aslan e Kapdan (2006), utilizando a *Chlorella vulgaris* para remoção de nitrogênio e fósforo obteve uma eficiência de remoção de 72% para nitrogênio e 28% para fósforo (de 3 a 8mg.L<sup>-1</sup> NH<sup>4+</sup> e 1,5-3,5 mg.L<sup>-1</sup> PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>). Outras culturas de microalgas vêm sendo utilizadas para remoção de nutrientes além da *Chlorella sp*, como espécies de *Scenedesmus sp* e *Spirulina sp*. Outras espécies estão em estudos para avaliar a eficiência de remoção principalmente de nitrogênio e fósforo como *Nannochloris*, *Botryococcus braunii* e *Promidium bohneri* (OLGUÍN et al., 2003; DUMAS et al., 1998; LALIBERTE et al., 1997).

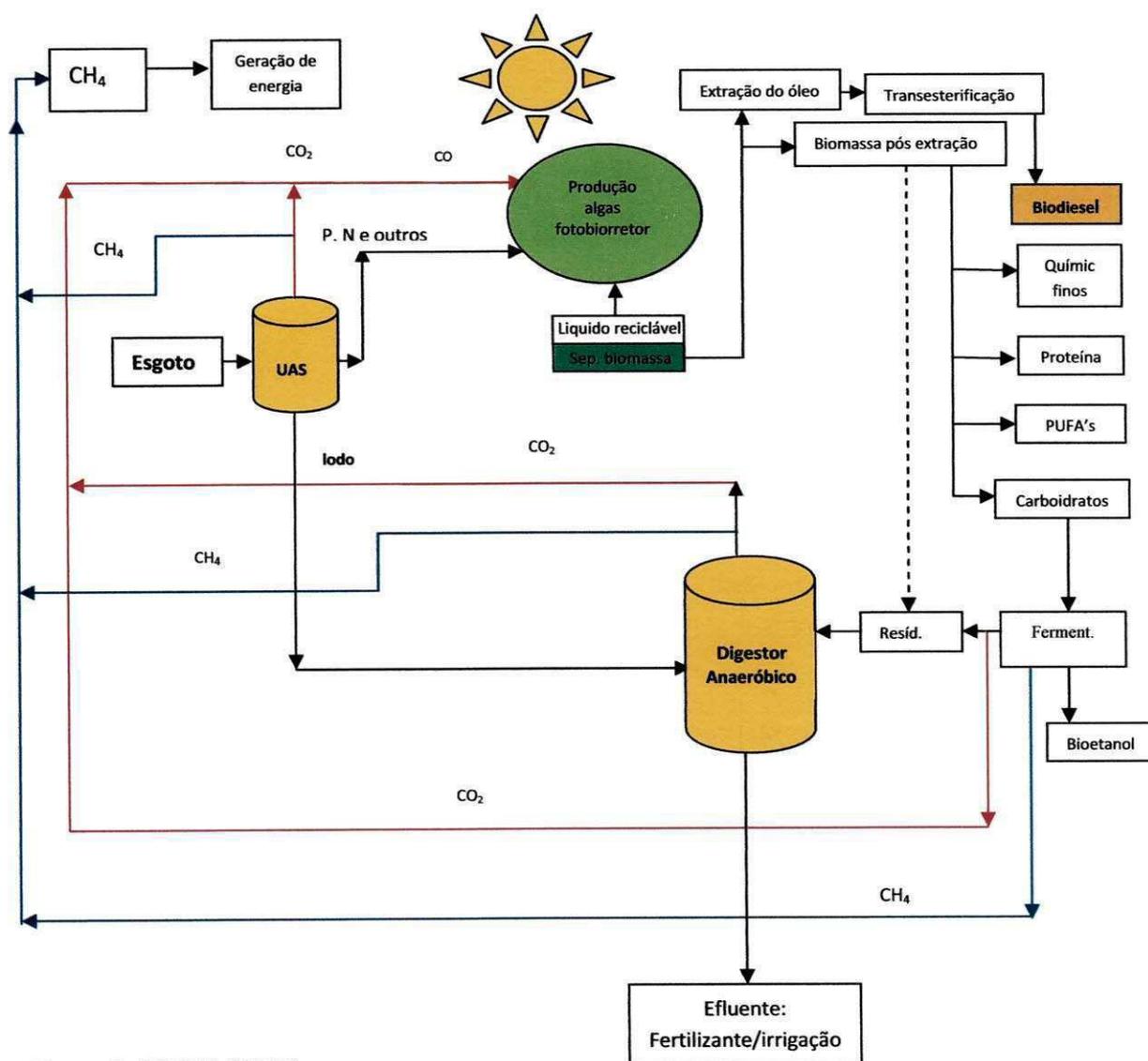
Aplicação das microalgas para tratamento de efluentes industriais ou de estações de tratamento de esgoto favorece a degradação de compostos ou substâncias que são de difícil degradação por meio de bactérias, assim um sistema de tratamento com capacidade de remover poluentes orgânicos persistentes e metais pesados pode ser mais eficaz com um sistema de tratamento incluindo as bactérias e as microalgas processo este que está apresentado na Figura 14 ilustrando um sistema de tratamento de efluente doméstico com produção de microalgas para remoção de nutrientes e o processamento da biomassa que pode gerar diversos produtos de alto valor agregado tornando um processo de enorme sustentabilidade econômica e ambiental.

De acordo com Harun et al. (2010), relataram que as algas marrom *Ascophyllum nodosum* tem uma eficiência comprovada que é melhor que as algas vermelhas e verdes na remoção de metais como cádmio, zinco e níquel. Um estudo similar comprovou que as algas marrons *Fucus vesiculosus* tem alto rendimento de remoção cromo III mesmo em altas concentrações inicial do metal.

Outra espécie de algas, *Scenedesmus obliquus* foi estuda para remoção de cianeto proveniente de efluentes de mineração e obteve remoção acima de 90% após a introdução da espécie em questão. *Spirogyra condensata* e *Rhizoclonium hieroglyphicum* também foram empregadas para remoção de cromo presentes nos efluentes de curtumes. O pH juntamente com a densidade celular da microalgas influenciam na remoção do cromo, isto indica o

potencial das microalgas em remover metais pesados de águas residuárias (GURBUZ et al., 2009).

Figura 14 – Fontes de aproveitamento comerciais com o cultivo das microalgas



Fonte: LABDES (2011)

### 3.6.4 Outras aplicações através do extrato das microalgas

A industrialização das microalgas principalmente para nutrição humana vem crescendo rapidamente desde com o cultivo inicial em 1960 com os japoneses hoje existem uma expansão por vários países como a Índia, EUA, Israel, Austrália estes são os principais. Em 2004, a indústria de microalgas produziu 7000 toneladas de biomassa seca. A Tabela 08 apresenta a produção anual dos principais países que produzem microalgas para fins comerciais com a sua aplicação e o seu valor comercial, enfatizando que estes fins comerciais não são direcionados para fins de produção de energia.

Tabela 08 - Produção de microalgas atualmente e potencial comercial

Microalgas	Produção Anual ton	País Produtor	Aplicação e produto	Preço €
<i>Spirulina</i>	3000 de peso seco	China, Índia, EUA e Japão	Nutrição humana, nutrição animal, Cosméticos e ficobiliproteínas	36/Kg 11/mg
<i>Chlorella</i>	2000 de peso seco	Taiwan, Alemanha e Japão	Nutrição humana, cosméticos aqüicultura	36/kg 50/L
<i>Dunaliella salina</i>	1200 de peso seco	Austrália, Israel, EUA e Japão	Nutrição humana, cosméticos e $\beta$ -caroteno	215-2150/kg
<i>Haematococcus pluvialis</i>	300 de peso seco	EUA, Índia e Israel	Astaxantina Aqüicultura	7150/kg 50/L
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	240 DHA óleo	EUA	DHA óleo	43/g
<i>Shizochytrium</i>	10 DHA	EUA	DHA óleo	43/g

Fonte: Macalita (2011), Brennan e Owende, 2010.

#### 3.6.4.1 Químicos finos a partir das microalgas

##### 3.6.4.1.1 Ácidos graxos poli-insaturados

Dependendo das microalgas, vários compostos químicos de alto valor econômico podem ser extraídos como os pigmentos, antioxidantes,  $\beta$ -caroteno, polissacarídeos, triglicerídeos, ácidos graxos, vitaminas e biomassa. Atualmente o mundo mantém a preocupação com diversas doenças debilitantes que vêm a cometendo facilmente a

humanidade como, por exemplo: hiperlipidemia, doenças cardiovasculares, osteoporose, câncer, mal de Alzheimer, obesidade, diabetes entre outras. E para prevenir esses tipos de doenças apenas com medicação é muito difícil, o que faz com que as pessoas procurem ter em sua dieta alimentos que possam colaborar na prevenção desses males. Tradicionalmente, as pessoas vêm utilizando como suplementos alimentares em suas dietas vegetais. No entanto, os benefícios dos micro-organismos aquáticos como as algas trazem benefícios superiores que os vegetais, como por exemplo, as microalgas são vistas por possuírem uma qualidade superior de suas proteínas que muitos vegetais, como trigo, arroz e legumes (MATA et al., 2010).

O consumo de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) vem sendo introduzidos na alimentação humana, especialmente o ômega-3 e ômega-6, como tratamento para doenças cardíacas e inflamatórias como artrite, enxaqueca e asma. Os lipídios de algumas espécies contêm quantidades relativamente altas de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, principalmente o ácido eicosapentaenóico (EPA- 20:5 n-3) e o ácido docosahexaenóico (DHA – 22:6 –n-3) estes são as fontes de ômega-3 nas microalgas (DERNER et al., 2006; HARUN et al., 2010).

Peixes como bacalhau, savelha, arenque, anchova e sardinha contêm, uma alta proporção de gordura e são empregados na obtenção de PUFA. Porém, a extração a partir dos peixes apresenta diversos inconvenientes como: odor desagradável, contaminação com metais pesados, baixa estabilidade, presença de colesterol, produção variável e um complexo perfil de ácidos graxos, podendo apresentar mais de 50 tipos diferentes (DERNER et al., 2006). Por outro lado, os ácidos graxos das microalgas não apresentam as desvantagens citadas. Além disso, nos cultivos, as condições ambientais podem ser controladas e as espécies selecionadas de acordo com o(s) ácido(s) graxo(s) desejado(s). Ademais por apresentar composição mais simples, o processo de purificação dos PUFA é mais simples e econômico (DERNER et al., 2006; HARUN et al., 2010).

Dentre as espécies conhecidas de microalgas que representam quantidades significativas de PUFA das famílias ômega-3 e ômega-6, tem como representantes: *Isochrysis* ssp, *Pavlova lutheri*, *Phaeodactylum tricorutum*, *Thalassiosira* spp, *Odontella aurita*, *Cryptocodinium cohnii* entre outras. De acordo com Patil et al.; as algas marinhas produzem mais DHA que as microalgas de águas doces. Jiang et al.; afirmam que a alga marinha *Schizochytrium mangrove* tem 33 a 39% de DHA dos ácidos graxos contidos em sua composição. Vazhappilly e Chen confirmaram que *Cryptocodinium cohnii* tem o conteúdo de 19,9% de DHA do total de ácidos graxos que é acima de outras espécies estudadas *Amphidium caryerea* (17%) e *Thrautocytrium aureum* (16,1%). Também, *Isochrysis galbana*,

apresentou uma quantidade de DHA significativa com a produtividade específica de 0,16g/L.d. O consumo de DHA traz vários benefícios para a saúde ajuda a combater o câncer, AIDS, doenças cardiovasculares, controla e reduz o colesterol, impulsiona o sistema imunológico e efeitos desintoxicantes do corpo (HARUN et al., 2010; GU; SINGH, 2010)

#### 3.6.4.1.2 Carotenóides

Semelhantemente ao que ocorre em outros organismos, cada classe de microalgas apresenta sua própria combinação de pigmentos e, conseqüentemente, coloração distinta. Os três principais grupos de pigmentos encontrados na biomassa microalgal são as clorofilas, os carotenóides e as ficobilinas (ficobiliproteínas) (ABALDE et al., 1995) De acordo com Borowitzka (1993) é possível incrementar a síntese destes compostos através da manipulação das condições de cultivo, usualmente por algum tipo de estresse ambiental.

Os carotenóides, pigmentos de grande interesse comercial, funcionam como fotoprotetores, eles podem ser usados para colorir alimentos, fonte de pro-vitamina A, forte antioxidantes, ações anti-inflamatórias, entre outros benefícios. A maioria dos  $\beta$ -caroteno cerca de 90% é produzido sinteticamente que custa no mercado em torno de € 215,00 por kg enquanto o  $\beta$ -caroteno natural pode chegar a ser comercializado em média por € 2150 por Kg (BRENNAN; OWENDE, 2010), quando os  $\beta$ -caroteno natural comparados aos corantes sintéticos, eles são mais resistentes a presença de ácido ascórbico, ao calor, aos processos de congelamento e apresentam eficiência mesmo quando aplicados nos alimentos em pequenas quantidades. O crescente interesse industrial por esses pigmentos naturais pode ser atribuído a eles pelo seu poder de prevenção as doenças degenerativas: combatendo os radicais livres e funcionando na prevenção do câncer e estimuladores do sistema imunológico (DENER et al., 2006). As microalgas podem conter entre 5 a 10 tipos de um universo de aproximadamente de 60 diferentes carotenóides presentes nas microalgas. Diversas espécies podem acumular grande concentração de betacaroteno, astaxantina, clorofila ou cantaxantina, entre outros (DENER et al., 2006).

O  $\beta$ -caroteno é um pigmento tipicamente encontrado nas microalgas, bem como nas macroalgas e plantas. Geralmente é encontrado numa fração inferior a 1% da massa seca, mas pode ser acumulado até aproximadamente 10% em espécies halotolerantes (micro-organismos que toleram elevadas concentrações de sais), como a do gênero da *Dunaliella sp.* O cultivo em escala comercial é realizado de maneira eficiente em tanques abertos, com concentrações elevadas de sais

no meio, onde a elevada incidência luminosa e alta salinidade geram estresse nas células, que respondem com a produção de glicerol e  $\beta$ -caroteno (BOROWITZA; BOROWITZA, 1998).

A astaxantina tem como fonte natural a espécie *Haematococcus pluvialis* que tem um elevado potencial de aplicação como nutracêuticos, cosméticos, na indústria de alimentos, também na saúde pode promover a proteção da irradiação UV, melhora a resposta imune e antiinflamatória. Estudos vêm sugerindo vários benefícios que a astaxantina traz para a saúde, como: atividade anti câncer (inibindo a formação de câncer de mama, de cavidade bucal, bexiga, fígado), a ajuda na produção de anticorpos, colabora na redução dos riscos de adquirir doenças neurodegenerativas (Parkinson e Alzheimer), reduz a incidência de aterosclerose (MATA et al., 2010). Mas, seu maior potencial atualmente é utilizado na aquicultura devido seu poder forte de pigmentação, sendo empregada para dar a coloração avermelhada a carne de salmão. De acordo com Brennan e Owende (2010), a *Haematococcus pluvialis* é capaz de produzir de 1 a 8% de astaxantina em peso seco. A astaxantina natural é comercializada por € 7150,00 por quilograma.

A ficobiliproteína é um pigmento azul que pode ser encontrada nas cianobactérias com grandes aplicações nas indústrias de alimentos e farmacêuticas devido seu alto poder antioxidante. Pesquisas recentes vêm mostrando um grande potencial no ramo da medicina diagnóstica. Pois, suas propriedades tornam-se muito poderosas e altamente sensíveis aos reagentes fluorescentes, que podem ser utilizados em experimentos de imunomarcagem.

É atualmente extraída do cultivo das cianobactérias *Spirulina platensis* em lagoas abertas e da alga vermelha *Porphyridium cruentum*. O preço dos produtos da ficobiliproteína é na faixa de € 215 a 1790 por quilograma quando é vendido nativo e após ser processado pode ficar na faixa de € de 10.500,00 por quilograma (BRENNAN; OWENDE, 2010).

### 3.7 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO DA BIOMASSA DO MEIO DE CULTIVO

A separação da biomassa do meio de cultivo pode contribuir com 20 a 30% do custo de produção total da biomassa. Os métodos mais comuns envolvidos para separação da biomassa podem ser através de processos químicos, físicos e biológicos. Experiências têm demonstrado que ainda não existe uma metodologia de separação consolidada, que ainda é uma área que requer mais estudos, é preciso encontrar uma técnica que seja eficiente na separação da biomassa e que seja viável economicamente e que não gerem impactos ambientais, principalmente para as microalgas

de pequenas dimensões, que são mais difíceis de separação como a *Chlorella vulgaris* e *Nannochloris sp.*

Os métodos mais comuns utilizados na separação da biomassa incluem sedimentação, centrifugação, filtração, algumas vezes com adição de coagulante ou floculante para flotação. A floculação é utilizada para agregar as células de microalgas para aumentar de tamanho e densidade, e assim facilita a sedimentação, a centrifugação e filtração.

Filtros prensas de operação sob pressão ou a vácuo podem ser usados para recuperarem grandes quantidades de biomassa. Mas, algumas aplicações de filtração podem ser relativamente lentas, que podem ser insatisfatórias. Filtração também é mais adequada para algas de grandes dimensões como *Coelastrum*, *Proboscideum*, e *Spirulina platensis*. Mas, não se pode recuperar a biomassa por filtração para microalgas de pequenas dimensões como: *Scenedesmus sp*, *Dunaliella sp*, ou *Chlorella sp*.

Alternativamente, a microfiltração ou ultrafiltração com membranas torna-se outra possibilidade para substituir a filtração convencional para separação das microalgas, que são mais adequadas para as células frágeis e processos de produção de pequena escala. Além disso, esses processos de separação são mais caros, especialmente por causa da necessidade de substituição da membrana e bombeamento.

Richmond (2004) sugeriu que o critério para decidir sobre a seleção de procedimento de colheita mais adequado é principalmente em função do produto desejado. Para produtos de baixo valor que não exigem muita pureza, pode-se utilizar a sedimentação por gravidade possivelmente com reforço da floculação por meio de coagulantes. Por outro lado, produtos de alto valor a ser recuperados das microalgas, utilizados, por exemplo, como alimento. Muitas vezes é recomendado o uso contínuo de centrifugas operacionais que podem processar grandes volumes de biomassa (MATA et al., 2010).

Como já foi comentado a seleção da técnica de separação influencia diretamente nos custos de produção e que depende essencialmente da espécie que esta se separando e que algumas facilitam o processo de separação em razão do seu tamanho e forma, como é o caso da cianobactéria *spirulina sp* que é longa em forma de espiral (20-100µm) que se presta naturalmente ao método de colheita relativamente eficiente em micro telas (BRENNAN; OWENDE, 2010).

A escolha da técnica de separação é dependente das características das microalgas como já foi enfatizado, por exemplo: tamanho, densidade e valor do produto que deseja obter.

Geralmente, a separação das microalgas envolve-se dois processos:

- a) A colheita de separação com suspensão em grandes quantidades, que necessita concentrar a biomassa a valores elevados para chegar a 2-7% do total de matéria sólida. Isso vai

depender da concentração inicial e das tecnologias empregadas, incluindo sedimentação, flotação e floculação.

- b) Outra forma de concentrar as células durante a separação é através das técnicas que possibilita agregação por meio da centrifugação, filtração e agregação ultrassônica, essas técnicas permitem reter um maior teor de sólidos, no entanto a custo do uso intenso de energia, elevando os custos de separação da biomassa.

### **3.7.1 Separação por floculação e agregação ultrassônica**

Como a floculação consiste na agregação das células das microalgas, já que as mesmas precisam ser desestabilizadas, pois possuem cargas negativas e não favorecem a aglomeração. A desestabilização é feita com adição de sais metálicos hidrolisáveis que pode ter como auxiliar polímeros com a finalidade de aumentar o tamanho das partículas aumentando a velocidade de sedimentação favorecendo uma melhor separação. Os sais metálicos mais utilizados são sulfato de alumínio, cloreto de férrico e sulfato ferroso.

Vários métodos de separação através da floculação foram testados. Knuckey et al. (2006), desenvolveram um processo de floculação com ajuste de pH, elevando o mesmo para faixa de 10 – 10,6 com NaOH seguindo com adição de polímero não iônico. O sobrenadante foi colhido por sifonagem depois de um período de decantação, e, subsequentemente, neutralizado de modo a dar uma concentração de biomassa final de 6-7g.L<sup>-1</sup>. O processo foi aplicado com sucesso para uma gama de espécies de microalgas com eficiência de floculação superior a 80%.

A técnica de ultrassom é utilizada com sucesso, pois tem um elevado poder de agregação aumentando a concentração de sólidos de 20 vezes. Além das vantagens que é a operação contínua, sem indução de tensão de cisalhamento sobre a biomassa, o que poderia destruir metabólitos potencialmente valiosos.

### **3.7.2 Separação por flotação**

O método de flotação é baseado na introdução de microbolhas que entra em contato com as células das algas, tornando-as leves propiciando que elas flutuem, ao contrário da floculação, não

requer qualquer adição de produtos químicos. Embora a flotação tenha um enorme potencial de separação da biomassa apresenta limitação na sua viabilidade em virtude dos custos energéticos.

### 3.7.3 Separação por gravidade e centrifugação

Métodos de separação através da sedimentação por gravidade e centrifugação são baseados na lei de Stoke, as características de sedimentação dos sólidos em suspensão são determinadas pela densidade da suspensão, raio das células e a velocidade de sedimentação. A separação por sedimentação gravitacional é a técnica mais comum utilizada. Contudo, o método é apenas adequado para microalgas de grandes dimensões tal como *spirulina sp.*

A separação por meio da centrifugação é o preferido para obtenção de metabólitos de alto valor e vida útil prolongada. O processo é rápido e utiliza energia com intensidade. As desvantagens do processo centram-se no alto custo energético e de manutenção. No entanto, o elevado poder de concentração de sólidos após a centrifugação da biomassa com aumento da concentração de até 150 vezes (BRENNAM; OWENDE, 2010).

### 3.7.4 Separação por filtração

Um processo de filtração convencional é o mais adequado para a separação de microalgas relativamente grande (70 $\mu\text{m}$ ), tais como *Coelastrum sp* e *Spirulina sp*. Para filtração convencional não é adequada espécies de algas que se aproximam das dimensões bactérias (30 $\mu\text{m}$ ), como *Scenedesmus sp*, *Dunaliella sp* e *Chlorella sp* (BRENNAM; OWENDE, 2010).

Para recuperação de células algais de pequenas dimensões (<30  $\mu\text{m}$ ), microfiltração e ultrafiltração por membranas (a filtração por membrana utiliza a pressão hidrostática) são alternativas tecnicamente viáveis para substituição a filtração convencional. Os processos de separação por membranas podem ter um custo superior ao processo de centrifugação, porém quando opera em grande escala acima de 20m<sup>3</sup>.dia<sup>-1</sup> torna-se mais viável economicamente (MACKAY; SALUSBURY, 1988).

### 3.8 BIODIESEL

Mais de 1,5 trilhão de barris de óleo equivalente foram produzidos desde que Edwin Drake perfurou o primeiro poço de petróleo do mundo em 1859. A Agência Internacional de Energia (AIE) informou no cenário de referência que a necessidade mundial de energia primária deverá crescer de cerca de 55% entre 2005 e 2030, a uma taxa média anual de 1,8% ao ano. Os combustíveis fósseis continuarão sendo a fonte dominante de energia primária, representando 84% do aumento global da demanda entre 2005 e 2030.

De acordo com o relatório da Agência Internacional de Energia (AIE), o consumo de petróleo caiu de 90 mil barris por dia no período entre 2008 e 2009. A taxa de crescimento de consumo anual de óleo da China está em torno de 7,5% e, enquanto a Índia é de 5,5%; e ambos são esperados de tomar um salto quântico na próxima década. Se os governos ao redor do mundo tendem para as políticas atuais, o mundo vai precisar de quase 60% de energia a mais em 2030 do que hoje, deste 45% serão contabilizados pela China e a Índia juntas.

O transporte é um dos setores que mais crescem usando 27% da energia primária. Com as taxas atuais de consumo de escalonamento, a reserva mundial de óleo fóssil estará esgotada em menos de 45 anos. Devido à escassez de combustíveis fósseis e do aquecimento global por meio do efeito estufa por dióxido de carbono e outros gases em sua combustão, combustíveis alternativos estão recebendo uma atenção considerável. Uma das alternativas promissoras é biodiesel (HILL et al., 2006).

As atuais fontes de biodiesel comerciais incluem óleo de soja, óleo de canola, óleo de palmeira, e óleo de milho, gordura animal e óleo de cozinha já usado. Contudo, o desenvolvimento, em larga escala de biodiesel a partir desses recursos não pode satisfazer de forma realista a demanda existente para os combustíveis de transporte, porque seria deslocar a produções de plantas que atualmente são utilizados para produção de alimentos. Por exemplo, nos Estados Unidos, se óleo de palmeira, fosse o óleo cultivado em alto rendimento, seriam preciso 24% do total das terras aráveis fossem dedicadas ao seu cultivo para atender a apenas 50% do transporte das necessidades de combustível e 846% da área do cultivo seria necessário se o milho fosse cultivado como fonte de biodiesel nos EUA.

Enquanto 3% do total das áreas das plantações dos EUA seriam suficientes para a produção da biomassa de algas que satisfaz 50% das necessidades de transporte do combustível, dada a produtividade da biomassa das algas em fotobioreatores de óleo de 30% por peso da biomassa.

Os maiores componentes de óleos vegetais e gordura animal são os triacilgliceróis (TAG: muitas vezes chamados triglicerídeos). Quimicamente, os TAG são ésteres de ácidos graxos (AG) com glicerol (1,2,3-propanotriol). Os TAG de óleos vegetais e gordura animal contêm, tipicamente, diferentes tipos de AG. Assim, diferentes AG podem estar ligados à cadeia do glicerol. Os diferentes AG que estão contidos nos TAG revelam o perfil de AG de óleos vegetais e gorduras animais. Como cada AG apresenta propriedades químicas peculiares, o perfil de AG é, provavelmente, o parâmetro de maior influência sobre as propriedades dos óleos vegetais e gorduras animais de onde se originam (KNOTHE, 2006).

Para que o biodiesel seja produzido, óleos vegetais e gorduras animais são submetidos a uma reação química denominada transesterificação. Nesta reação, óleos vegetais e gordura animal reagem na presença de um catalisador (usualmente uma base) com um álcool (usualmente metanol) da mistura AG que é encontrada no óleo vegetal ou na gordura animal de origem (KNOTHE, 2006).

O biodiesel pode ser produzido de uma grande variedade de matérias-primas. Estas incluem a maioria dos óleos vegetais (óleos de soja, caroço de algodão, palma, amendoim, colza/canola, girassol, açafrão, coco e outros) e gordura de origem animal (usualmente sebo), bem como óleos de descarte (óleos usados em frituras). A escolha da matéria-prima para a produção de biodiesel depende largamente de fatores geográficos (KNOTHE, 2006).

O biodiesel é miscível com o diesel do petróleo em qualquer proporção. Em muitos países, esta propriedade levou ao uso de mistura binárias diesel/biodiesel, ao invés de biodiesel puro.

O metanol é muito empregado para a produção de biodiesel porque é geralmente o álcool de menor custo. No entanto, outros álcoois como o etanol ou o iso-propanol podem ser empregados para produzir biodiesel de qualidades superiores.

Além de ser totalmente compatível com o diesel de petróleo em praticamente todas as suas propriedades, o biodiesel ainda apresenta várias vantagens adicionais em comparação com este combustível fóssil:

- a) É derivado de matérias-primas renováveis de ocorrência natural, reduzindo assim atual dependência sobre os derivados do petróleo e preservando as suas últimas reservas.
- b) É biodegradável;
- c) Gera redução nas principais emissões presentes nos gases de exaustão (com exceção dos óxidos de nitrogênio,  $\text{NO}_x$ ).
- d) Possui um alto ponto de fulgor, o que lhe confere manuseio e armazenamento mais seguros.

- e) Apresenta excelente lubricidade, fato que vem ganhando importância com o advento do petrodiesel de baixo teor de enxofre, cuja lubricidade é parcialmente perdida durante o processo de produção. A lubricidade ideal deste combustível pode ser restaurada através da adição de baixos teores de biodiesel.

Alguns dos problemas inerentes ao biodiesel estão ao seu alto custo (que tem sido compensado em muitos países por legislações específicas, marcos regulatórios ou subsídios na forma de isenção fiscal), ao aumento que causa nas emissões de NO<sub>x</sub> nos gases de exaustão, a sua baixa estabilidade quando exposto ao ar.

A maior razão para que óleos vegetais e gorduras animais devam ser convertidos em alquil ésteres é a viscosidade cinemática que, no biodiesel, é muito mais próxima daquela do diesel de petróleo. A alta viscosidade de matérias graxas não transesterificadas conduz a sérios problemas operacionais nos motores dieleis, tais como a ocorrência de depósitos em várias partes do motor (KNOTHE, 2006).

Os óleos vegetais apresentam uma excelente qualidade de injeção expressada pelo número de cetano e muitas outras propriedades são igualmente importantes para demonstrar a adequação do biodiesel como combustível alternativo. O calor de combustão, o ponto de fluidez, a viscosidade (cinemática), a estabilidade à oxidação e a lubricidade figuram entre as mais importantes dentre estas propriedades (KNOTHE, 2006).

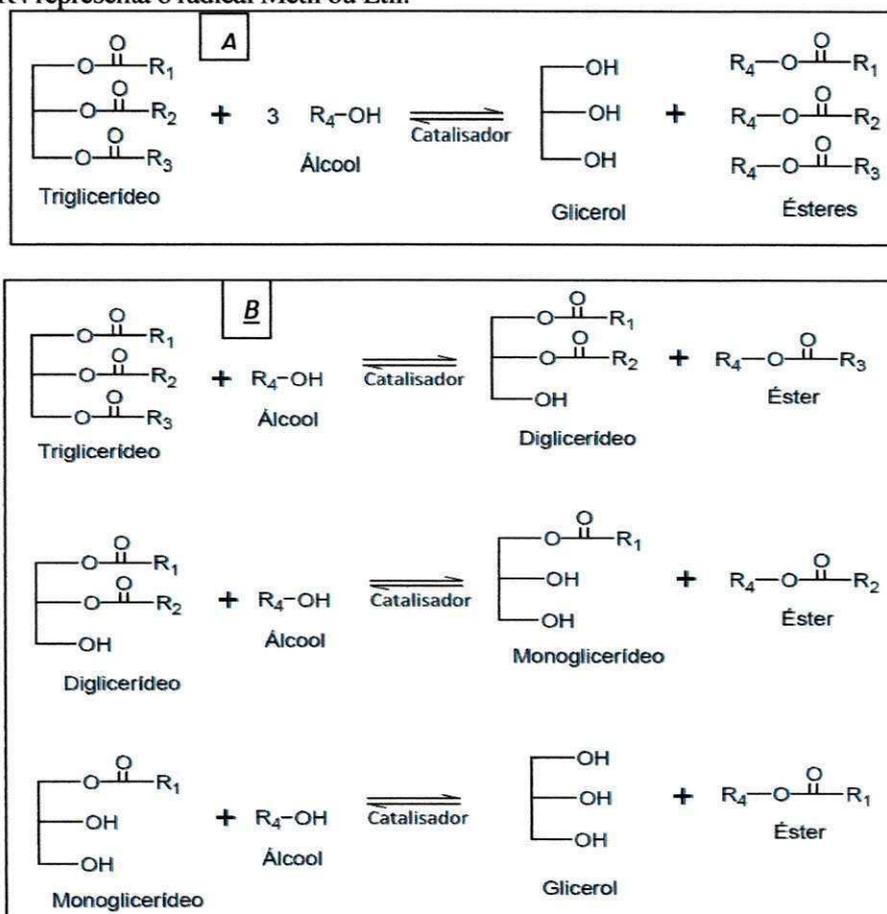
### 3.9 TECNOLOGIAS PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Os óleos vegetais e as gorduras animais *in natura* apresentam os índices de fluidez e viscosidade superiores ao diesel derivado do petróleo. Devido a estas características estes óleos e gorduras *in natura* não são apropriados para utilização de motores de combustão a diesel convencional, já que podem causar problemas adversos como entupimentos e decaimento no ponto de ignição. Assim sendo, estas matérias-primas são transformadas em biodiesel. O biodiesel pode ser obtido por diferentes processos tais como o craqueamento, o hidrocraqueamento, a esterificação, e a transesterificação, sendo este último o processo mais conhecido e utilizado nos dias atuais (PARENTE, 2003; CARTONI, 2009; SOARES, 2010).

A transesterificação pode ocorrer através de diferentes processos, tais como: a transesterificação ácida, alcalina, enzimática, em solvente supercrítico e *in situ*. A transesterificação consiste basicamente de uma reação reversível onde os triglicerídeos do óleo ou gordura (vegetal

ou animal) reagem com um álcool de cadeia curta como o metanol ou etanol, em geral na presença de um catalisador, favorecendo a formação de ésteres (metílicos ou etílicos) de ácidos graxos e gerando como subproduto a glicerina. Esta reação ocorre em três etapas, como apresentado na Figura 15, primeiramente, as moléculas de triglicerídeos são transformadas em diglicerídeos, em seguida em monoglicerídeos e, por último, em glicerol (CARTONI, 2009; SOARES, 2010). A produção de biodiesel através da transesterificação alcalina é o meio mais utilizado industrialmente. Esta preferência se deve as razões econômicas, o menor tempo de reação e aos melhores rendimentos obtidos comparados a transesterificação ácida. Em relação ao álcool, mundialmente, o metanol é mais utilizado do que o etanol, devido à sua maior disponibilidade, aos custos mais baixos e a maior conversão dos triglicerídeos em biodiesel (SOARES, 2010).

Figura 15- Reação de transesterificação de Triglicerídeos – *A*: reação simplificada, *B*: Transesterificação com etapas intermediárias. Onde: R1, R2 e R3 representam radicais de hidrocarbonetos saturados ou insaturados e R4 representa o radical Metil ou Etil.



Fonte: Soares (2010)

#### 4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

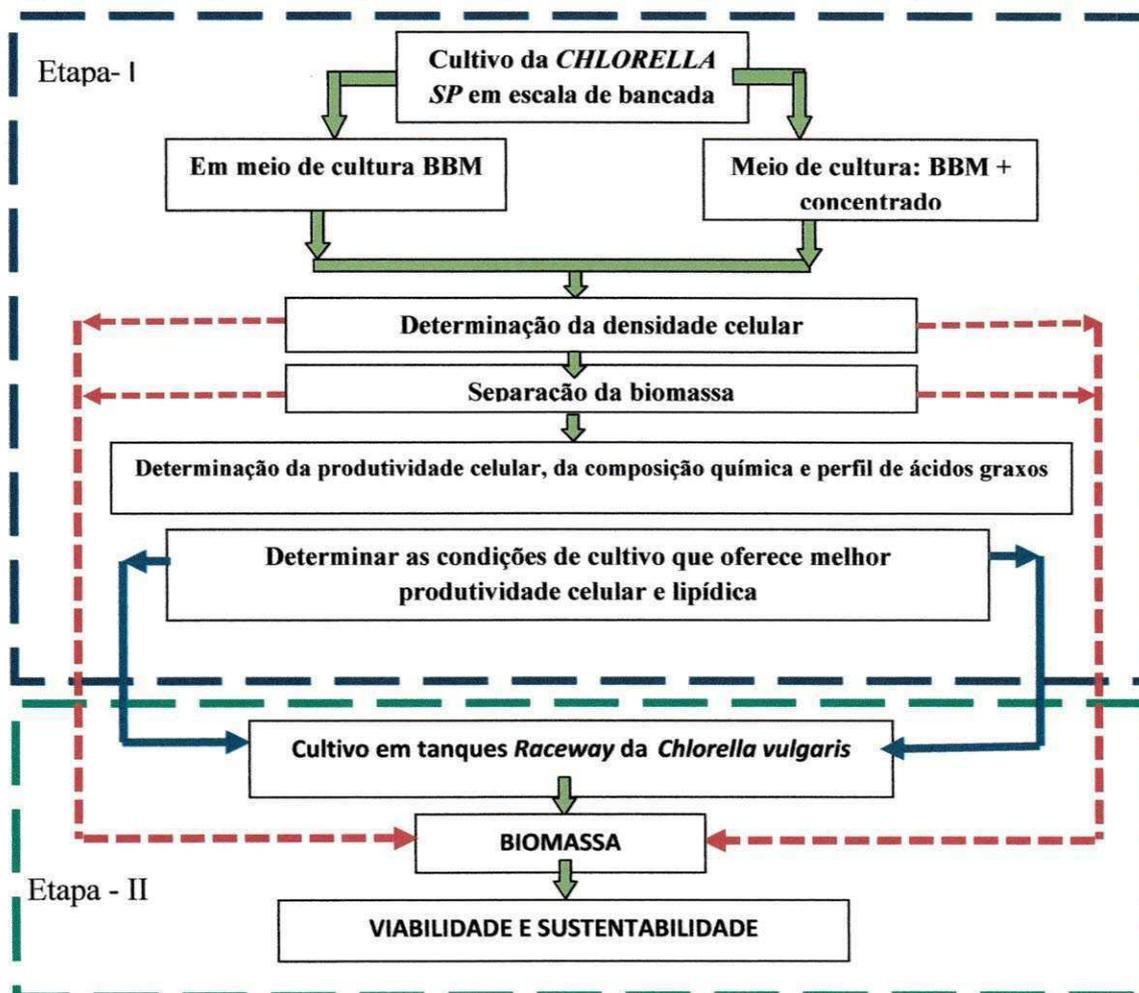
A presente pesquisa foi desenvolvida em duas etapas:

Etapa 1: Escala laboratorial;

Etapa 2: Escala piloto em lagoas *Raceway*

A Figura 16 apresenta todas as etapas desenvolvidas durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Figura 16 – Fluxograma das seqüências dos procedimentos experimentais em etapas



A etapa I foi realizada no Laboratório de Referência em Dessalinização (LABDES) da Unidade Acadêmica de Engenharia Química da (UAEQ) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) da cidade de Campina Grande, Estado da Paraíba e no Laboratório de Biotecnologia Alimentar (BIOTEC) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) localizado na cidade de Florianópolis, Estado de Santa Catarina.

A etapa 2 foi desenvolvida na comunidade de Uruçu que está localizada no semiárido do Estado da Paraíba, na região sudoeste do município de São João do Cariri, situado na Mesorregião da Borborema, na microrregião do Cariri Oriental à aproximadamente, 210 km da capital João Pessoa.

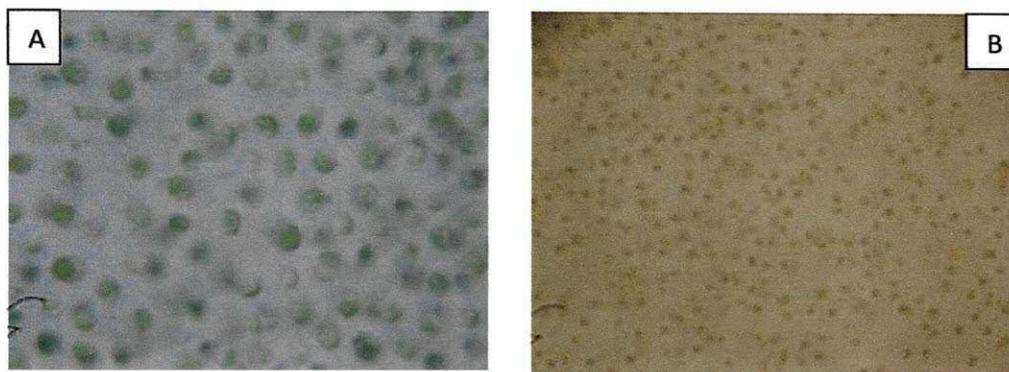
A etapa 1 objetivou definir a melhor cepa entre as *Chlorella vulgaris* e *Chlorella sp* e as melhores condições de cultivo em meio BBM modificado com adição de concentrado oriundo da dessalinização de águas salobras via osmose inversa. Os cultivos foram desenvolvidos em fotobiorreatores de 200mL de vidro e fotobiorreatores de fibra de vidro de 50L.

Na segunda etapa foi realizada em escala piloto em duas lagoas *Raceway* com capacidade volumétrica de 4000L cada, onde foram implantados os melhores resultados em termos de produtividade de biomassa e lipídica obtidos na primeira etapa experimental.

#### 4.1 PRIMEIRA ETAPA : ESCALA DE LABORATÓRIO (CULTIVO DAS MICROALGAS *CHLORELLA VULGARIS* E *CHLORELLA SP*)

A *Chlorella vulgaris* foi a primeira cepa utilizada no LABDES/UFCG, que foi cultivada inicialmente no Laboratório de Biotecnologia Alimentar (BIOTEC), esta cepa foi fornecida pela Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Após estudos preliminares de cultivo no BIOTEC, a cepa foi conservada em meio sólido e enviada para o LABDES/UFCG para iniciar os estudos de cultivo com formulação diferenciada do meio de cultura por adição do concentrado. Também foram estudadas mais duas outras cepas, coletadas nos tanques de criação de peixes localizados na comunidade de Uruçu do município de São do Cariri, os quais foram desenvolvidos com o uso do concentrado proveniente da dessalinização de águas salobras. A cepa *Chlorella sp* (TU1), foi coletada no tanque 1 dos peixes e a outra cepa definida como *Chlorella sp* (TU3) coletada no tanque de peixe 3. Todas estas espécies foram avaliadas em termos de crescimento celular e produção lipídica, para definir a cepa que melhor se adaptava as condições de cultivo em lagoas *raceway*. A Figura 17 mostra a fotomicrografia das cepas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella sp* utilizadas em todo este estudo.

Figura 17 – Fotomicrografia da *Chlorella vulgaris*(A) e *Chlorella sp* (B) utilizadas nos cultivos no LABDES – Aumento 400X



Fonte: LABDES (2011)

#### 4.1.1 Meio de cultura

O meio sintético utilizado para o cultivo da *Chlorella sp* e *Chlorella vulgaris* foi *Bold's Basal Medium* (BBM) que é o recomendado pelo Centro de Cultura de Algas e Protozoários de Cambridge (CCAP). A partir das culturas mantidas em meio sólido em tubos de ensaios, foram desenvolvidas novas culturas em *Bold's Basal Medium* (BBM), iniciando o cultivo em *Erlenmeyers* de 250 mL, que correspondeu ao início da primeira etapa laboratorial.

#### 4.1.2 Condições de cultivo nas duas fases laboratoriais

Todos os cultivos em fotobioreatores foram realizados no cepário localizado no LABDES como mostra a Figura 18 onde foi mantido todas as aclimatizações químicas e físicas. O qual era constituído por uma sala de 5m<sup>2</sup>, aclimatizado por um condicionador de ar, com paredes de cor clara, com prateleiras dispostas, a fim de acomodar os reatores com os cultivos e foram fixadas lâmpadas fluorescentes dispostas paralelamente, com a finalidade de iluminar os reatores de cultura. Os materiais utilizados neste setor foram previamente esterilizados por meio de autoclavagem a vapor, além de manter a circulação restrita de pessoas que manipulam as culturas para evitar contaminação do cultivo.

Figura 18 – Cepário para cultivo das microalgas localizado LABDES-UFMG

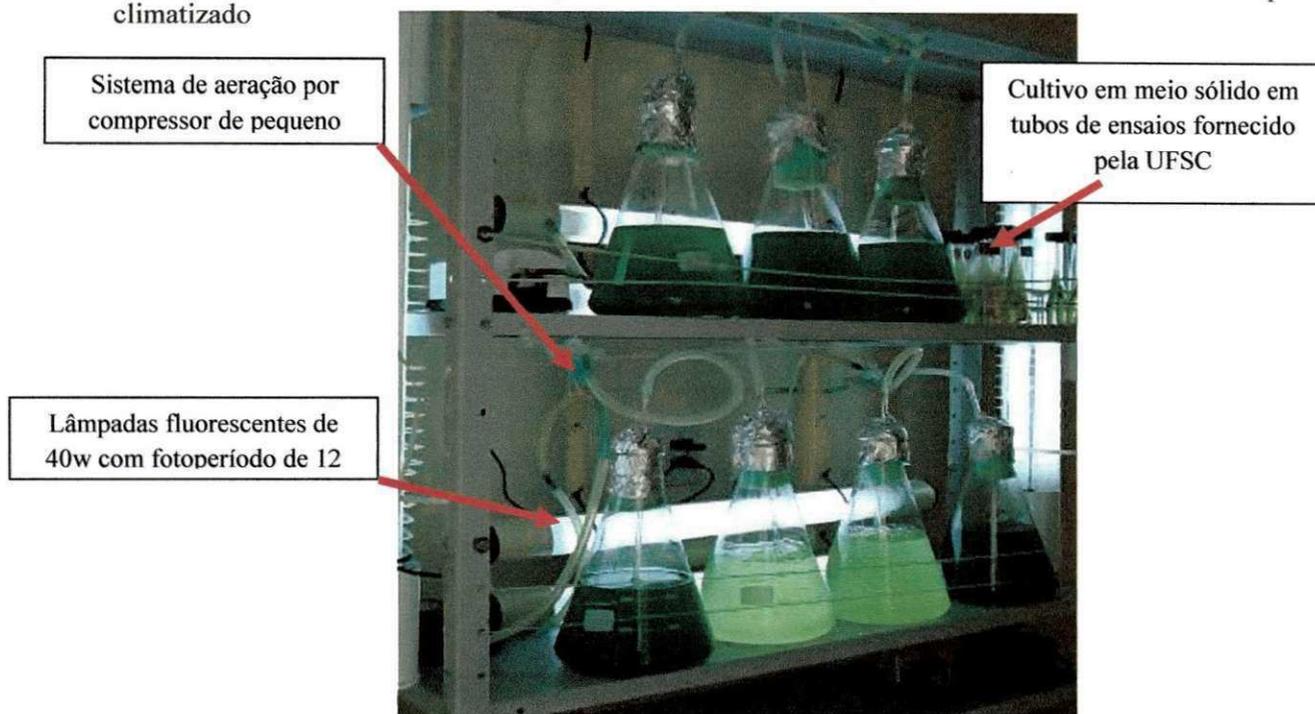


Fonte: LABDES (2010)

As aclimações químicas foram realizadas com a inoculação do cultivo no meio de cultura BBM e mantendo o pH do meio em 6,6. As condições físicas mantidas nos experimentos foram: temperatura em  $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ , agitação por injeção contínua de ar e iluminação de 4klux provenientes de lâmpadas fluorescentes de 40W com fotoperíodo de 12 horas com o tempo de iluminação mantido por um controlador de tempo automático

Os repiques das culturas algais eram executados na sua fase de crescimento máximo que corresponde o início da fase estacionária, sendo transferidas posteriormente para frascos com aeração apropriada de 2000mL (unidades experimentais), onde foi realizada a variação do meio de cultura modificando as condições de cultivo através da adição do concentrado proveniente do dessalinizador, em concentrações crescentes de sais, foi estudado diversas concentrações, com a variação de 10% a 45% de concentrado adicionado ao meio de cultura. A Figura 19 representa o cultivo de *Chlorella vulgaris* e biorreatores de 500mL. Nas condições descritas acima.

Figura 19 – Cultivo de *Chlorella vulgaris* em escala laboratorial em fotobioreatores de 2L em cepário climatizado



Fonte: LABDES (2010)

Na segunda fase laboratorial, iniciou-se o cultivo em fotobioreatores construídos em fibra de vidro com capacidade volumétrica de 50L como mostra a Figura 20. Os experimentos desenvolvidos nos fotobioreatores foram realizados sob as mesmas condições de temperatura, iluminação e aeração efetuadas nos experimentos da primeira etapa, com fotoperíodo de 12 horas e tempo de cultivo variando de 6 a 13 dias, mantendo as demais aclimações químicas para avaliar o crescimento da microalga em escala semi-piloto.

O inóculo da *Chlorella vulgaris* sempre foi iniciado na proporção de 1:100, com intuito de iniciar o experimento com a de no mínimo a população de  $10^5 \text{ cel.mL}^{-1}$  da *Chlorella vulgaris* e *Chlorella sp.* Após o cultivo atingir a fase estacionária que correspondia a uma população de  $10^7 \text{ cel.mL}^{-1}$ , o experimento era finalizado. Dando início a separação da biomassa, conforme será descrito no item 4.1.3.

Figura 20 – Cultivo de *Chlorella vulgaris* em escala laboratorial nos fotobioreatores de fibra de vidro de 50L



Fonte: LABDES (2010)

#### 4.1.3 Estudo do crescimento celular da *Chlorella vulgaris* e *Chlorella sp*

O crescimento microalgal pode ser estimado pelo emprego de determinados parâmetros, dentre os quais merecem destaques a densidade celular, a velocidade (taxa) de crescimento e o tempo de cultivo.

##### 4.1.3.1 Determinação da densidade celular: contagem de células em câmara de Neubauer

A densidade celular da biomassa cultivada em laboratório e escala piloto foi determinada diariamente através da microscopia óptica com aumento de 400x por contagem de células em câmara de Neubauer de acordo com o protocolo de Vega e Voltolina (2007). A densidade celular foi expressa em número de células por mililitro de cultivo (células.mL<sup>-1</sup>). Com os dados experimentais de densidade celular, foram elaborados gráficos que representam as curva de crescimentos da espécie em estudo, nos quais, plotou-se no eixo da ordenada o número de células.mL<sup>-1</sup> e no eixo da abscissa o tempo de cultivo em dia.

#### 4.1.3.2 Tempo de cultivo

O tempo de cultivo foi definido como o número de dias passados desde o início da inoculação que corresponde ao início da fase lag, período em que as células estão se adaptando ao meio até atingir o início da fase estacionária na qual é alcançado o número máximo da densidade celular. O tempo de cultivo foi expresso em dias.

#### 4.1.3.3 Produtividade celular

A produtividade da biomassa cultivada em laboratório e escala piloto, foi realizada em triplicata no início e fim do cultivo. Para este fim, foi utilizado membranas de acetato de celulose de porosidade de  $0,45\mu\text{m}$ , após filtração a vácuo da amostra contendo a biomassa de *Chlorella vulgaris* ou *Chlorella sp*, realizando a secagem em estufa na temperatura de secagem a  $60^{\circ}\text{C}$  até atingir peso constante e posterior pesagem da biomassa seca.

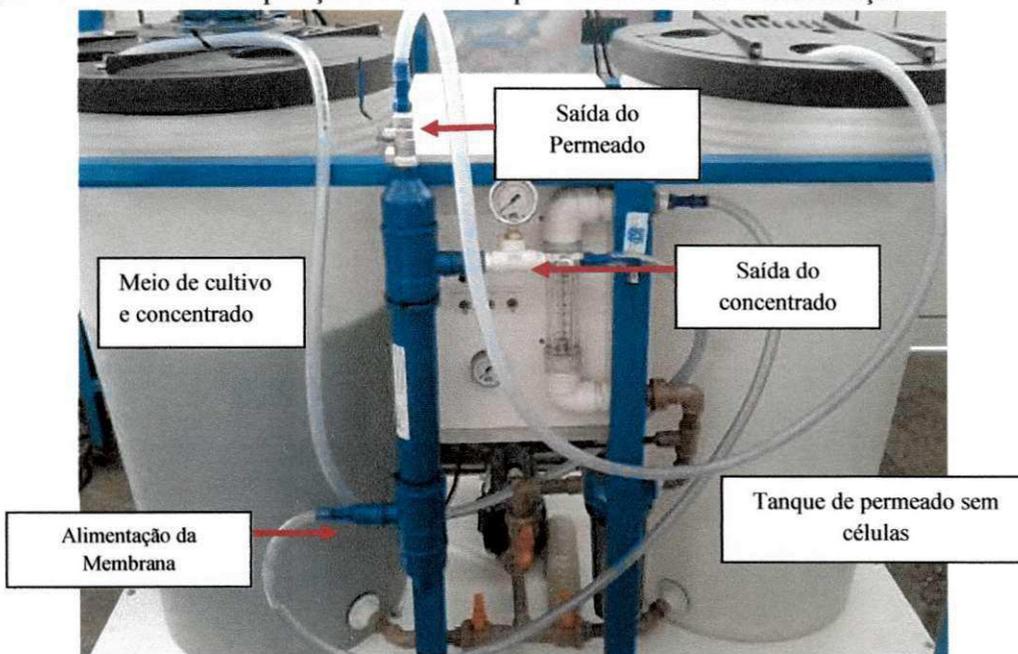
#### 4.1.4 Separação e coleta da biomassa

A separação e a coleta da biomassa cultivada em laboratório foram realizadas por meios de vários processos:

1. Processo de sedimentação gravitacional natural;
2. Processo por meio de coagulação e floculação com sais metálicos hidrolisáveis, com adição de polímeros como auxiliar da coagulação. Dentre os produtos químicos utilizados foram: Sulfato de alumínio com polieletrólito não iônico, tanino (Tanfloc) com polieletrólito não iônico e hidroxiclreto de alumínio, todos esses produtos foram fornecidos gentilmente pela Companhia Pernambucana de Saneamento com exceção do Tanfloc que foi cedido gentilmente pela Empresa Tanac S.A. - Unidade de taninos, Montenegro, Rio Grande do Sul as dosagens utilizadas foram de  $10\text{ mg.L}^{-1}$  de coagulantes e  $0,2\text{ mg.L}^{-1}$  de polímero.

3. Sistema de separação por membranas de microfiltração de geometria cilíndrica do tipo fibra oca de comprimento de útil de 420 mm, diâmetro externo de 50mm com área de filtração de  $0,5\text{m}^2$  como mostra na Figura 21. O módulo de microfiltração utilizado é alimentado lateralmente fabricado pela PAM Membranas Seletivas Ltda .

Figura 21 – Sistema de separação de biomassa por membranas de microfiltração



Fonte: LABDES(2011)

#### 4.1.5 Secagem da biomassa

A secagem da biomassa produzida em laboratório foi efetuada por meio de estufa de secagem com circulação de ar a  $\pm 60^\circ\text{C}$  para obtenção da biomassa seca sem alteração bioquímica da mesma.

#### 4.1.6 Características físico – químicas do concentrado do dessalinizador de osmose inversa

As amostras de concentrado foram provenientes do dessalinizador de osmose inversa (Figura 22) compostos por três módulos de membranas dispostos paralelamente contendo cada módulo três membranas de osmose inversa, tipo TW30 4040, com capacidade de produção de 2000L de água potável para comunidade de Uruçu Distrito do município de São João do Cariri e com produção de 2000L.

O concentrado produzido na referida localidade era utilizado para cultivo de microalgas, para produção de culturas hidropônicas e pisciculturas. A água subterrânea proveniente do poço tubular de 100 mm de diâmetro com profundidade de 27 metros, composto de uma bomba submersa de 1,50 CV; adução de PVC 40 mm que liga o poço ao tanque de alimentação do dessalinizador. O perfil físico-químico da água subterrânea e do concentrado encontra-se no anexo 1. As análises físico-químicas foram realizadas no LABDES/UFCEG seguindo as metodologias analíticas descritas no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*.

A água subterrânea que alimentava o sistema de dessalinização apresentou elevada salinidade, com a concentração de cloretos de  $720,7 \text{ mg.L}^{-1}$  que de acordo com a Portaria de potabilidade nº 2914/2011 do Ministério da Saúde, estabelece que o padrão máximo para cloretos seja de  $250 \text{ mg.L}^{-1}$ . Por isso, foi preciso efetuar a dessalinização da água em questão, produzindo desta forma um concentrado com o total de cloretos de  $1.418,2 \text{ mg.L}^{-1}$ , conforme consta no laudo das análises físico-químicas no Anexo A.

Figura 22 - Sistema de dessalinização por osmose Inversa da comunidade de Uruçu



Fonte: LABDES(2011)

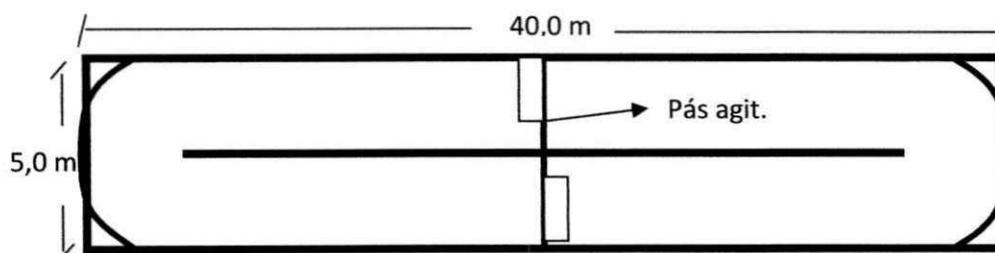
## 4.2 SEGUNDA FASE: DESENVOLVIMENTO DAS ATIVIDADES PILOTO

Esta etapa foi constituída do cultivo da *Chlorella vulgaris* em tanques *raceway* nas melhores condições de cultivo obtidas na primeira fase desse estudo. Nesta fase objetivou-se principalmente avaliar se as condições a céu aberto mantinham-se o mesmo desenvolvimento da espécie em questão obtidas em laboratório e se as condições ambientais naturais favoreciam a produção de *Chlorella vulgaris* bem como a geração de lipídios visando à obtenção de biodiesel.

### 4.2.1 Construção do tanque “*raceway*”

Foram construídos dois tanques em alvenaria com as seguintes dimensões 5,0 metros de largura com 40 metros de comprimento e uma profundidade de 0,50 metros totalizando 200 m<sup>2</sup> e capacidade total de 100m<sup>3</sup> sendo que os experimentos foram desenvolvidos em diferentes profundidades (20, 30 e 40 cm) visando a otimização do aproveitamento da luminosidade. A Figura 23 mostra o *layout* do tanque. A agitação do tanque foi mantida constante durante todo o cultivo.

Figura 23 – Layout do tanque *raceway*



Fonte: BIOTEC (2011)

#### 4.2.2 Cultivo nos tanques pilotos *raceway*

Inicialmente foi desenvolvido o inóculo em fotobioreatores (Figuras 24 e 25) construídos em fibra de vidro de 120L, mantendo aeração por injeção contínua de ar, a temperatura ambiente no meio que variou de 16°C a 34°C e iluminação natural que obteve valores entre 4klux a 14klux, o cultivo foi alimentado na fase exponencial em batelada com o meio de cultura, para evitar diluição excessiva do cultivo e favorecer a contaminação, após atingir o volume máximo em cada fotobioreator o cultivo foi mantido nas condições de aclimatizações até atingir a fase de máximo crescimento, ou seja, quando alcançava a população de  $10^7$  cél.mL<sup>-1</sup> iniciava-se a inoculação nos tanques *raceway*.

Figura.24– Fotobioreatores de 120L com cultivo de *Chlorella vulgaris*



Fonte: LABDES (2011)

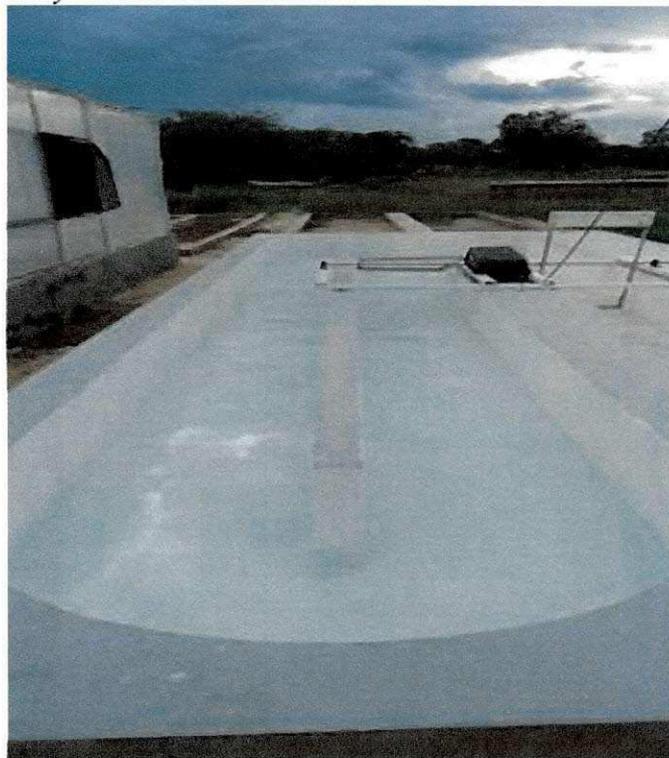
Figura 25. – Fotobioreatores de 120L com cultivo de *Chlorella vulgaris* no volume máximo para inoculação



Fonte: LABDES(2011)

O meio de cultura *Bold's Basal Medium* (BBM) foi preparado sem a adição de concentrado proveniente do dessalinizador e efetuou-se o bombeamento do mesmo para os tanques *raceway* como mostra a Figura 26 adicionando o inóculo da *Chlorella vulgaris* na população de  $10^7$  cél.mL<sup>-1</sup> no total de 200L para 2000L do meio de cultura.

Figura 26 - Tanque *raceway* com 2000L de meio de cultura BBM

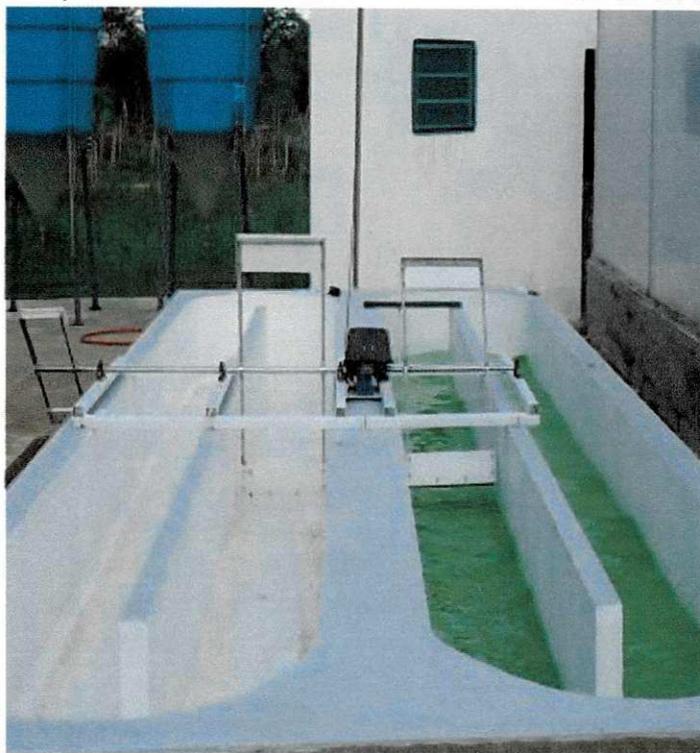


Fonte: LABDES (2011)

A Figura 27 mostra o início do cultivo em tanque *raceway* já inoculado. Foram executados os mesmos procedimentos de aclimações em termos de agitação e condições nutricionais realizados em escala de bancada. Após a diluição o número de células nos tanques *raceway* passou a ser de  $10^5$  cel.mL<sup>-1</sup>.

Todas as inoculações iniciais foram realizadas no período de menor insolação que corresponderia ao da final da tarde, para evitar a foto-oxidação das células. Todos os dias no período da manhã efetuava-se a contagem de células, medição de pH, temperatura e luminância, para avaliar o crescimento celular e verificar possíveis contaminações. No momento que a população atingiu  $10^7$  cel. mL<sup>-1</sup>, completava-se o volume do tanque para 3500L com o meio de cultura *Bold's Basal Medium* (BBM) esperando o crescimento do cultivo atingir o início da fase estacionária, em seguida foi realizada a separação, coleta e secagem da biomassa.

Figura 27- Tanque *raceway* com 2000L de meio de cultura BBM e 200L de inóculo



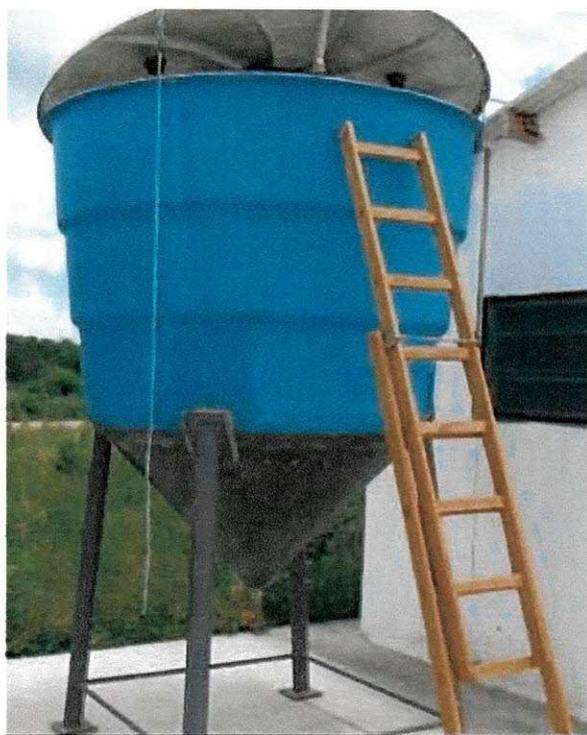
Fonte: LABDES (2011)

#### 4.2.3 Separação gravitacional e coleta da biomassa

A separação da biomassa foi inicialmente efetuada por sedimentação, quando o cultivo atingia a população de  $10^7$  cel.mL<sup>-1</sup> que correspondia ao início da fase estacionária. Assim, todo o cultivo foi bombeado para um sedimentador confeccionado em fibra de vidro de capacidade volumétrica de 3000L, conforme mostra a Figura 28.

Para proporcionar uma melhor decantação da biomassa foi adicionado o coagulante orgânico TANFLOC juntamente com um auxiliar da coagulação para este fim foi usado o polieletrólito não iônico com as respectivas concentrações 10mg.L<sup>-1</sup> e 0,2mg.L<sup>-1</sup>. O polímero foi adicionado para favorecer a formação de pontes químicas e tornar o floco das células mais denso, aglomerando assim um maior número de células para facilitar a deposição da biomassa. Após a sedimentação, que correspondeu a um período de aproximadamente 12 horas foi efetuado em seguida a coleta da biomassa concentrada e transferida para as peneiras confeccionadas com tela de baixa porosidade capazes de reterem as células.

Figura 28 – Sedimentador em fibra de vidro de 3000L da biomassa após cultivo em fibra de vidro



Fonte: LABDES (2011)

#### 4.2.3.1 Secagem da biomassa separada por sedimentação

A secagem da biomassa foi efetuada em estufa com temperaturas entre 45° e 50° C, após a secagem foi efetuado a remoção da biomassa, pesou-a para determinação da produtividade e a concentração da biomassa. Após estes procedimentos as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Biotecnologia Alimentar (BIOTEC) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) para determinação da composição química e perfil de ácidos graxos. A Figura 29 mostra a biomassa seca obtida após cultivo em tanques *raceway* em meio BBM.

Figura 29- Biomassa seca da *Chlorella vulgaris* em cultivo *raceway*



Fonte: LABDES(2011)

#### 4.2.4 Separação por membranas e coleta da biomassa

Para separação da biomassa por membrana de osmose foi utilizado um sistema de membrana com vazão de  $250\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$  tipo BW304040, marca *Filmtec* com bomba de 1 CV de seis estágios. O meio do cultivo foi bombeado e permeado gerando duas correntes de fluidos após passar pelo sistema de membranas, uma contendo água e alguns sais que retornava para o tanque de cultivo *raceway* e a outra corrente contendo o concentrado de células e alguns sais que retornava para o tanque sedimentador que já continha o cultivo, o qual era permeado até atingir o ponto máximo de saturação da membrana, como mostra a Figura 30.

Figura 30 - Processo de separação da biomassa por membrana de osmose inversa



Fonte: LABDES(2011)

#### 4.2.5 Secagem da biomassa separada por processo de membranas

A secagem foi efetuada transferindo o concentrado obtido da separação por membranas em um tanque retangular de alvenaria localizado em uma estufa aclimatizada a 50°C, o mesmo foi coberto com plástico para facilitar a remoção após a secagem, conforme mostra a Figura 31.

Figura 31 – Secagem da biomassa após separação por membranas



Fonte: LABDES(2011)

#### 4.2.6 Determinação da composição química e perfil de ácido graxo da biomassa seca

As análises de perfil de ácidos graxos e composição química da biomassa seca foram realizadas pelo Laboratório de Físico-química (LABCAL) do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – CAL, da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC em Florianópolis, Santa Catarina. Para determinação da umidade, substâncias voláteis, resíduos minerais fixos foram efetuadas as metodologias clássicas de análises físico-químicas.

##### 4.2.6.1 Quantificação de lipídios totais e perfil de ácidos graxos

O teor lipídico total da amostra foi determinado de acordo com o método de extração com solvente orgânico em extrator contínuo do tipo Soxhlet (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS -AOAC, 2005). As amostras trituradas foram submetidas à extração da fração lipídica por solvente orgânico (clorofórmio 2: metanol 1), em extrator contínuo de Soxhlet. Os resíduos lipídicos, juntamente aos solventes, foram então submetidos a tratamento em sistema evaporador rotativo a vácuo, para eliminação destes últimos. O valor de massa de lipídios foi calculado com base de diferença de peso do balão de fundo redondo, antes e depois do procedimento.

A partir do extrato obtido na determinação dos lipídios totais, foi realizada a esterificação dos ácidos graxos conforme procedimento desenvolvido por Hartman e Lago (1973). Os metil ésteres dos ácidos graxos foram determinados por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama, coluna capilar RESTEK com 105 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno com filme de fase estacionária de 0,25 µm de espessura contendo 10% de cyanopropylphenil e 90 % de biscyanopropylsiloxane. As condições operacionais a serem programadas: temperatura inicial da coluna de 140°C por 5 minutos, aumentando até 240°C a uma taxa 2,5°C por minuto, permanecendo ao final por 15 minutos. O detector ficou isotérmico a 260°C e o injetor a 260 °C splitless. Os ácidos graxos foram identificados por cromatografia gasosa (MODELO CG-2014 SHIMADZU) através do software GC solution em comparação dos tempos de retenção com padrão (Sigma), padrão de C4 a C24 (SUPELCO).

#### 4.2.6.2 Proteínas totais

O teor proteico total na biomassa seca foi determinado pelo clássico método de Kjeldahl, adotando-se o fator de 6,38 para conversão a partir dos teores de nitrogênio total (AOAC, 2005). As amostras desengorduradas, provenientes da etapa de lipídios, foram trituradas novamente e submetidas a aquecimento intenso, na presença de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) padrão analítico e catalisador. Tal procedimento promove a destruição da matéria orgânica e formação de nitrogênio inorgânico, na forma de sulfato de amônia  $(NH_4)_2SO_4$ . A alcalinização deste resíduo, durante uma etapa de destilação do nitrogênio, promove a conversão do sal em amônia, recolhida em solução saturada de ácido bórico ( $HBO_3$ ). A titulação desta solução com ácido clorídrico (HCl 0,20 N) padrão permite a determinação da concentração de nitrogênio da amostra utilizada.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Este estudo inédito centra-se no aproveitamento do concentrado de elevado teor de sais oriundo de sistema de dessalinização via osmose inversa para o desenvolvimento das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella sp* cultivadas em fotobioreatores de escala de bancada e lagoas *raceway* para escala piloto visando estudar a viabilidade para obtenção de biodiesel.

Os parâmetros analisados foram à densidade celular com intuito de estudar o crescimento celular em função das diferentes formulações do meio de cultura modificadas com adição do concentrado. Para cada experimento foram plotados quatro curvas, pois diariamente se realizava a contagem de células em triplicada, a quarta curva corresponde às médias geométricas dos três resultados obtidos diariamente com a contagem de células para cada amostra.

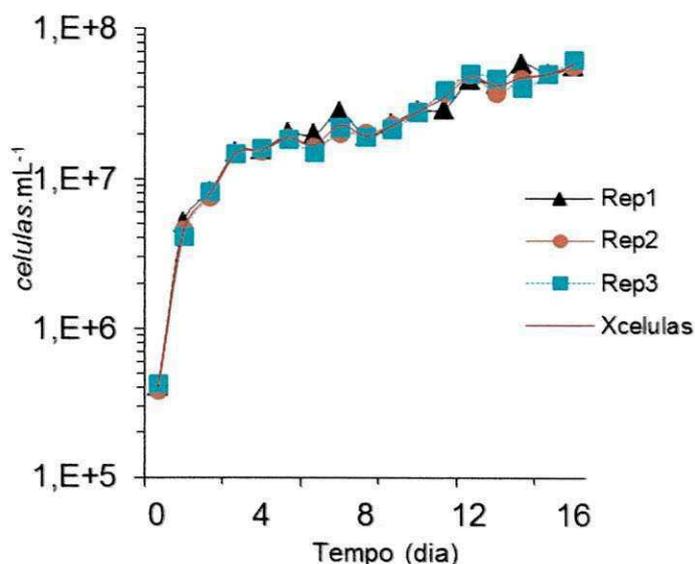
Para cada modificação química no meio de cultura com adição do concentrado foi estudado a variação na composição química e o perfil de ácido graxo da biomassa seca, como também a produtividade da mesma.

Durante este estudo também procurou-se melhorar a eficiência na separação das microalgas do meio de cultivo por meio do uso de membranas de microfiltração e osmose inversa, visando obter um maior concentrado de biomassa e com uma possível redução dos custos frente aos processos convencionais utilizados para separar as microalgas como *spray dryer* ou centrifugação. De acordo com Mata et al, (2010), os custos com separação das microalgas podem contribuir com até 30% do custo total de produção de biomassa.

### 5.1 CULTIVO EM ESCALA DE LABORATÓRIO E PILOTO

Observando o comportamento temporal do crescimento da *Chlorella vulgaris* (Cepa FURG) como ilustrado na Figura 32, foi verificado que o cultivo iniciou-se a fase estacionária quando atingiu a população  $10^7$  cel.mL<sup>-1</sup> que correspondeu a um tempo de cultivo de 4 dias, obtendo ao fim do cultivo um número máximo de células de  $5,9 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup>.

Figura 32 - Cultivo de *Chlorella vulgaris* em 100% de BBM sem adição de concentrado em reatores de 2000mL

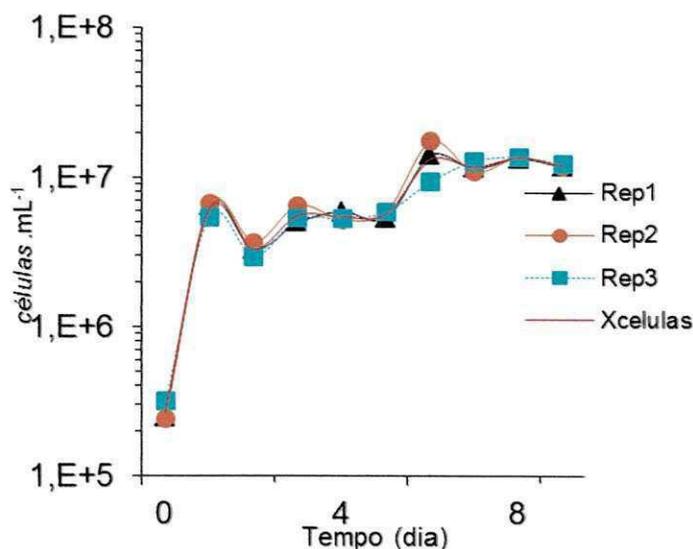


Neste experimento foi realizado o cultivo sem adição do concentrado apenas o meio de cultura BBM utilizando *Erlenmeyers* de 2000mL como fotobioreatores, mantendo as aclimações ideais conforme descrito no procedimento experimental.

Santos et al, (2010), estudaram o crescimento da *Chlorella vulgaris* em meio de cultura Conway modificado com fotoperíodo de 12 horas em fotobioreatores de vidro de 250mL com intensidade luminosa de 4000lux, obtiveram a densidade máxima celular no oitavo dia cultivo de  $2,5 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup>, analisando a Figura 32 observa-se que no oitavo dia do experimento realizado no LABDES foi obtido o número de células de  $2,0 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup> equivalente ao obtido por Santos et al,( 2010). Porém, estes autores alcançaram resultados melhores quando trabalharam com fotoperíodo integral atingindo o número máximo de células no nono dia de cultivo com um valor de  $9,43 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup>. Valor este superior a todos os valores que foram obtidos durante o presente estudo. Porém, a justificativa para não utilizar o fotoperíodo integral neste trabalho se deve ao fato que tinha que simular as mesmas condições ambientais do campo, uma vez que o intuito era efetuar o cultivo a céu aberto, impossibilitando assim impor um fotoperíodo integral.

O estudo do crescimento da *Chlorella vulgaris* em fotobiorreatores de 50L, pode ser observado na Figura 33, cultivando a *Chlorella vulgaris* com o mesmo meio de cultivo utilizado anteriormente.

Figura 33- Cultivo de *Chlorella vulgaris* em 100% de BBM sem adição de concentrado em fotobiorreatores de 50L

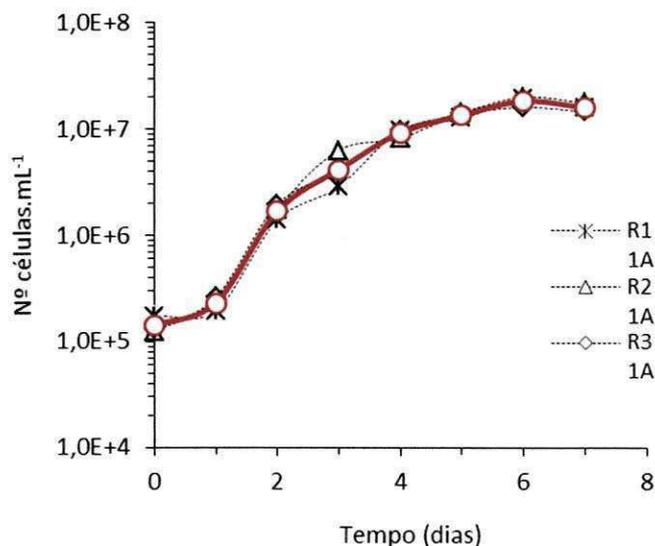


Portanto, com a Figura 33 percebe-se que o crescimento celular apresentou um pequeno decréscimo com relação ao experimento realizado em reatores de 2000mL, pois, a fase estacionária foi atingida com 5 dias de cultivo, isso pode ser explicado devido a luminosidade nos fotobiorreatores não ter a mesma intensidade, uma vez que a parede do reator confeccionado em fibra de vidro diminui a iluminação interna minimizando a realização da fotossíntese. Nesta situação o número máximo de células obtidas foi de  $2,7 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup>.

A produtividade obtida nos fotobiorreatores foi de  $0,095 \text{ gL}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$  com uma concentração média de biomassa de  $0,3792 \text{ g.L}^{-1}$ , verifica-se que estes valores foram menores que os resultados obtidos por Rodolfi et al. (2009), que obtiveram uma produtividade de  $0,17 \text{ gL}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ . Isto se deve em razão da dificuldade obtida na separação da biomassa, pois, durante a sedimentação não ocorreu total decantação das células floculadas devido sua natureza coloidal de baixa velocidade de sedimentação.

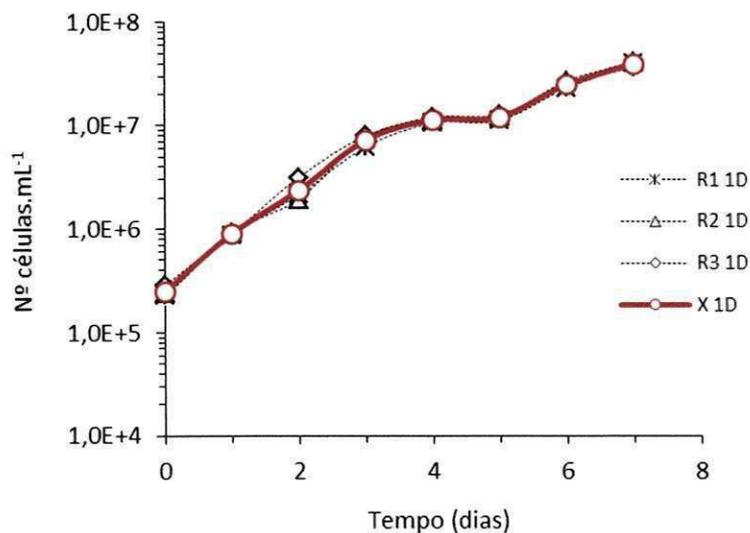
A curva de crescimento de um outro tipo de cepa a *Chlorella sp* (cepa TU1) ilustrada na Figura 34, observa-se que não apresentou um crescimento tão adequado quanto da *Chlorella vulgaris* (cepa FURG), já que o número de células obtidos no início da fase estacionária foi menor.

Figura 34 - Cultivo de *Chlorella sp* (cepa TU1) em 100% de BBM em reatores de 2000mL sem adição de concentrado



Na Figura 35 pode observar o desenvolvimento de um outro tipo de cepa de *Chlorella sp* (cepa TU3) cultivada nas mesmas aclimações químicas e físicas dos experimentos realizados anteriormente.

Figura 35 - Cultivo de *Chlorella sp* (cepa TU3) em 100% de BBM em reatores de 2000mL sem adição de concentrado

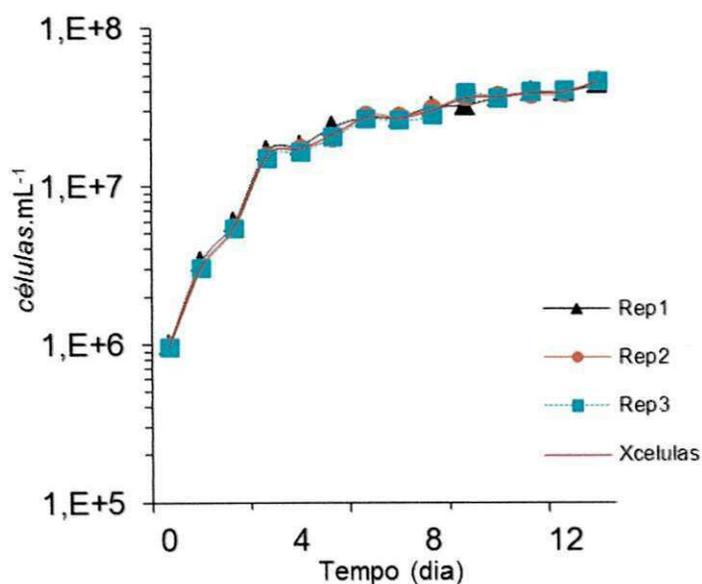


Como se pode observar que em termos de crescimento esta apresentou uma performance um pouco superior a *Chlorella sp* (cepa TU1) e uma densidade celular inferior a *Chlorella vulgaris* (cepa FURG), pois, esta última atingiu valores de aproximadamente  $6,0 \times 10^7 \text{ cel.mL}^{-1}$ . Além da melhor performance de crescimento celular, dentro das aclimações químicas e físicas impostas, a *Chlorella vulgaris* (cepa FURG) foi a que apresentou o menor tempo de cultivo para atingir a fase estacionária, ou seja, sua fase log teve uma duração de 4 dias, apresentando um crescimento mais rápido que as demais cepas analisadas.

Assim, optou-se por desenvolver todo o trabalho com a cepa da *Chlorella vulgaris* (cepa FURG) que apresentou melhor crescimento celular. Como a cepa será cultivada sob a condições de estresse devido adição de sais para provocar uma maior produção de lipídios, sendo ideal trabalhar com uma cepa com maior resistência e maior facilidade de crescimento para suportar as condições adversas do meio imposta pela alta concentração de sais.

Efetuada o cultivo com adição de 25% de concentrado ao meio de cultura em *Erlenmeyers* de 2000mL, observa-se na Figura 36 que o número máximo de células atingidas foi de  $4,7 \times 10^7 \text{ cel.mL}^{-1}$  e que a partir do quarto dia de cultivo foi atingido a população de  $10^7 \text{ cel.mL}^{-1}$ , obtendo uma fase log de duração de 4 dias, que corresponde ao máximo de crescimento das células.

Figura 36 - Cultivo de *Chlorella vulgaris* em reatores de 2000mL com meio de cultura contendo 75% de BBM e 25% de concentrado



Observando a Figura 36 verifica-se que as células se adaptaram bem com o aumento de sais proveniente da parcela adicionada do concentrado, já que nas condições de cultivo com apenas BBM o número máximo de células foi de  $5,9 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup> e com fase log com duração de quatro dias também. Percebendo assim, que houve uma pequena redução no crescimento das células com o aumento de sais o que corrobora com a hipótese de aproveitamento do rejeito proveniente do concentrado para o desenvolvimento de microalgas evitando desta forma que o mesmo seja lançado inadequadamente ao solo, conforme relatado por Jordan et al. (2009).

A seguir são apresentadas de forma sequencial as Figuras de 37 a 43, as quais representam o crescimento celular com diversos teores de concentrado nos fotobioreatores de 50L.

Figura 37 - Cultivo de *Chlorella vulgaris* em fotobioreatores com meio de cultura contendo 90% de BBM e 10% de concentrado

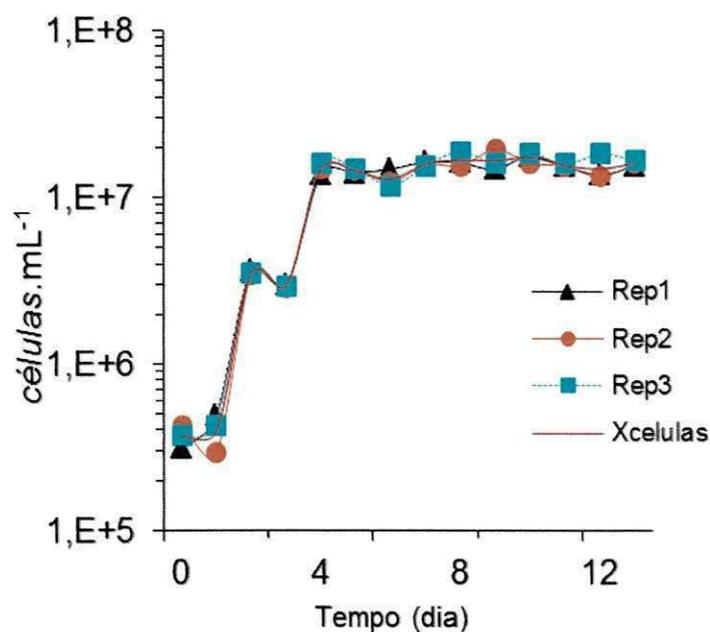


Figura 38 - Cultivo de *Chlorella vulgaris* em fotobiorreatores com meio de cultura contendo 80% de BBM e 20% de concentrado

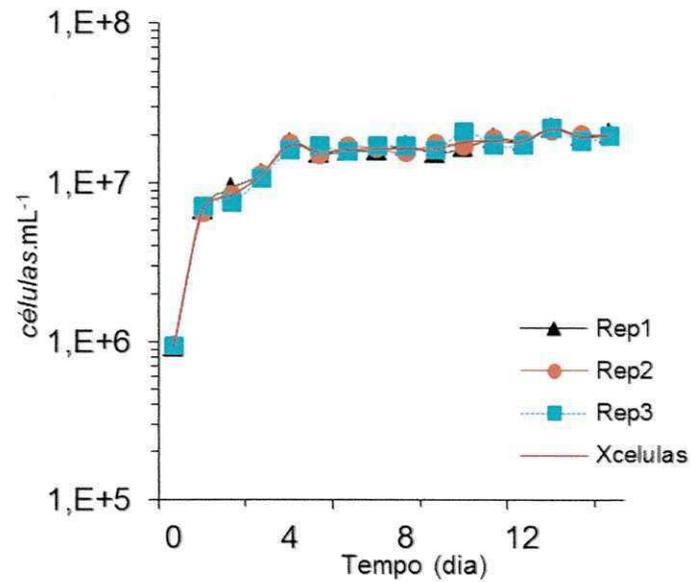


Figura 39 - Cultivo de *Chlorella vulgaris* em fotobiorreatores com meio de cultura contendo 75% de BBM e 25% de concentrado

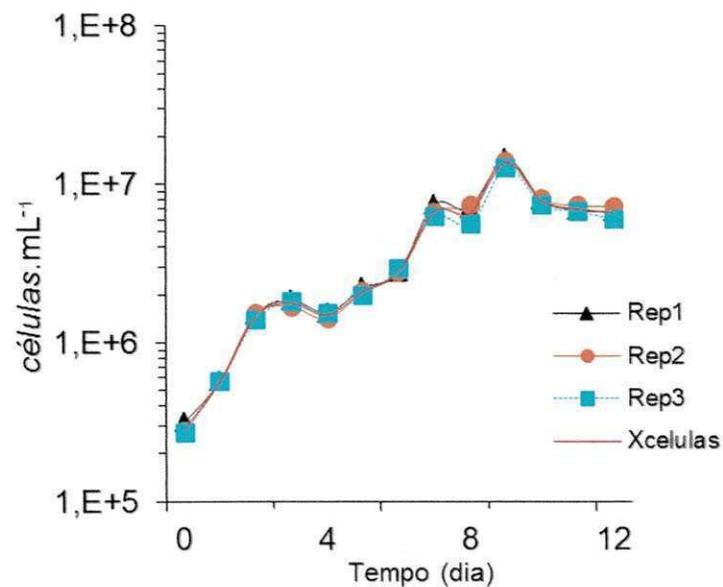


Figura 40 - Cultivo de *Chlorella vulgaris* em fotobiorreatores com meio de cultura contendo 70% de BBM e 30% de concentrado

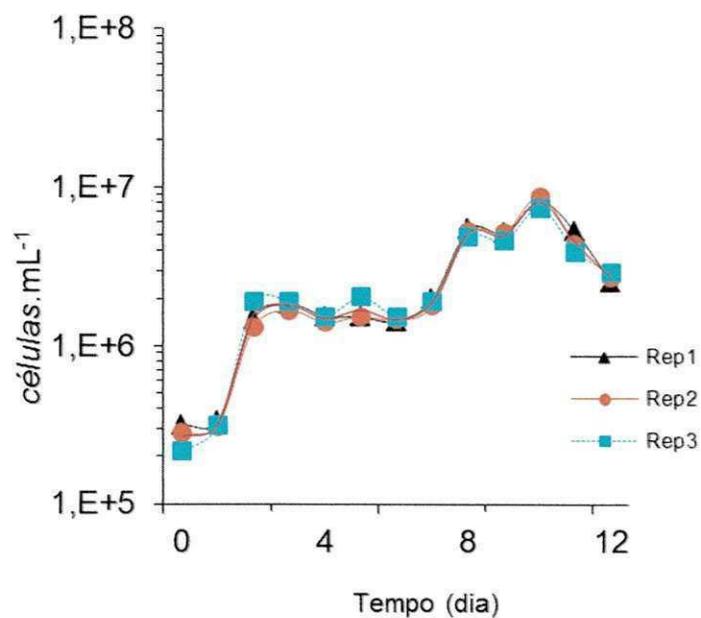


Figura 41 - Cultivo de *Chlorella vulgaris* em fotobiorreatores com meio de cultura contendo 65% de BBM e 35% de concentrado

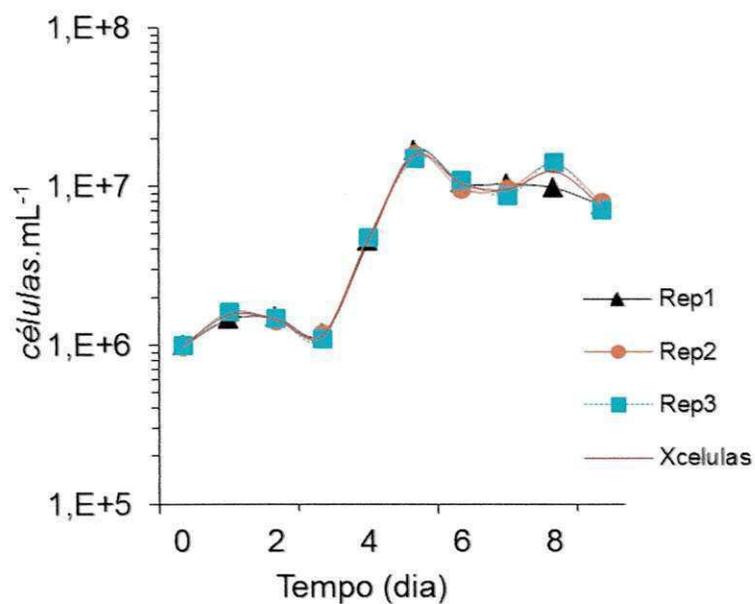


Figura 42 - Cultivo de *Chlorella vulgaris* em fotobioreatores com meio de cultura contendo 60% de BBM e 40% de concentrado

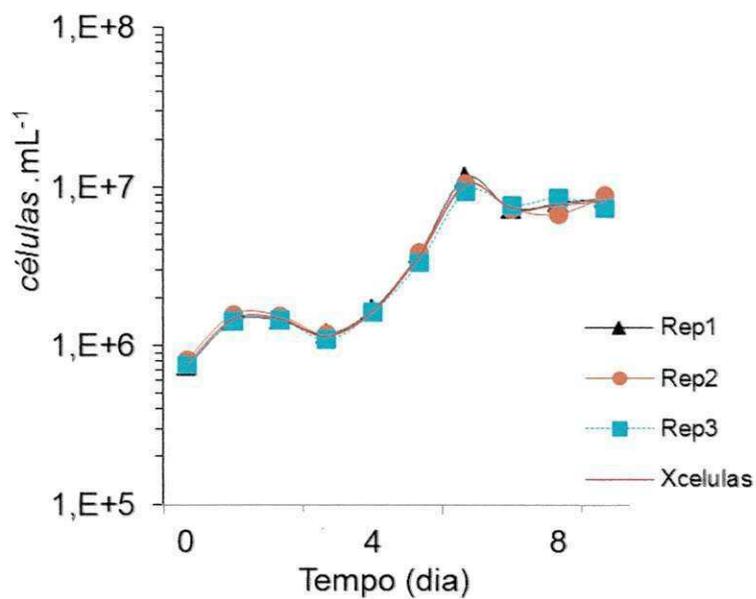
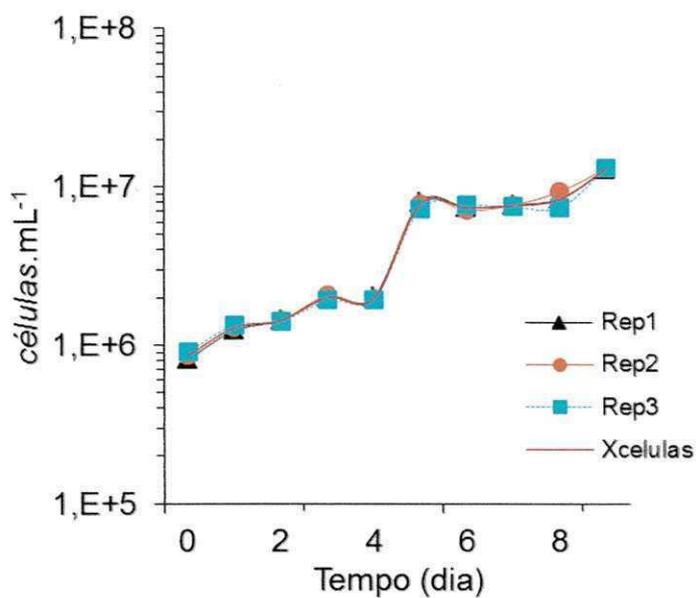


Figura 43 - Cultivo de *Chlorella vulgaris* em fotobioreatores com meio de cultura contendo 55% de BBM e 45% de concentrado



Portanto, observando-se as Figuras 37,38,39, 40, 41, 42, 43, verifica-se que a medida que aumenta a concentração de sais o cultivo apresenta dificuldade em atingir a população de  $10^7$  cel.mL<sup>-1</sup>, iniciando a fase de declínio mais rapidamente, permanecendo pouco tempo na fase log, este fato é observado mais claramente na Figura 40 que representa um teor de 30% de concentrado e 70% de BBM, na qual não atingiu o número de células de  $10^7$  cel.mL<sup>-1</sup>, outro fato que pode ter contribuído para esta dificuldade de crescimento pode ser explicado em razão de ter iniciado o inóculo com uma população baixa de  $2,7 \times 10^5$ .mL<sup>-1</sup>, provocando um maior estresse as células que pode ter dificultado na adaptação das células ao meio.

A partir do estudo com teor de 30% de concentrado foi iniciado o inóculo com uma população superior aos procedimentos realizados com teores de concentrao de 10, 20, 25 e 30% com intuito de não provocar um estresse alto no início da fase lag e favorecer uma melhor adaptação das células ao meio, com a finalidade de obter um crescimento maior de células.

No entanto, observou-se que mesmo nessas condições de maior número de células na inoculação, ainda houve uma dificuldade no crescimento, devido ao aumento no teor de sais, pois, o número máximo de células que se obteve foi de  $1,6 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup> e se atingiu a partir do sexto dia de cultivo, que indicou o início da fase estacionária, mostrando assim a dificuldade que as células possuem em se adaptarem ao meio com alta salidade (Figura 40).

Para o estudo com 40% e 45% de concentrado adicionado ao meio de cultura, o número máximo de células obtido foi de  $1,1 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup> e  $1,3 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup> respectivamente após nove dias de cultivo, corroborando com a assertiva que quanto maior o teor de sais maior é a dificuldade de adaptação das células, conseqüentemente o tempo de cultivo aumenta para atingir o ponto máximo de crescimento das células (Figuras 42 a 43), como a população do inóculo do estudo com 45% de concentrado foi um pouco maior na ordem de  $8,6 \times 10^5$  cel.mL<sup>-1</sup> enquanto que a com 40 % de concentrado foi de  $7,7 \times 10^5$  cel.mL<sup>-1</sup>, isto pode explicar o maior número de células obtido na concentração com 45% de concentrado.

Através deste estudo, foi verificado que o teor de concentrado em relação ao crescimento de células que apresentaram melhores resultados está entre o intervalo de 10% a 25%, conforme observa-se o crescimento celular nas Figuras 37,38 e 39. Porém, para que ocorra um maior aproveitamento do concentrado gerado nos sistemas de dessalização por osmose inversa e uma maior redução no custo do cultivo da *Chlorella vulgaris*, em razão da possível substituição de sais essenciais para o crescimento das microalgas em estudo, diminuído assim as concentrações . dos sais presentes no meio básico de cultivo da *Chlorella vulgaris* e *Chlorella sp.* Logo, para atender estas condições, as concentrações entre 20 a 25% são as mais adequadas para serem implantadas nos tanques de *raceway*.

De acordo com Richter (2009) a condutividade depende da quantidade de matéria ionizável presente na água e, assim, é aproximadamente proporcional à quantidade de sólidos dissolvidos totais (SDT), podendo utilizar a condutividade como estimativa preliminar para determinar os SDT fazendo a multiplicação da condutividade por um valor constante de 0,65, obtendo desta forma os SDT, expresso em  $\text{mg.L}^{-1}$ . Assim, foram obtidos os SDT que estão apresentados na Tabela 09.

A seguir a Tabela 09 apresenta também a concentração da biomassa seca, a produtividade média da biomassa em base seca, como também a condutividade do meio do cultivo após ter realizado as aclimações químicas com adição de concentrado, bem como o valor estimado do SDT.

Tabela 09 – Produtividade da biomassa da *Chlorella vulgaris* em peso seco com variação na concentração de sais

Meio de cultura	Concentração média da biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Média da Produtividade, em peso seco ( $\text{g.L}^{-1}.\text{dia}$ )*	Condutividade ( $\mu\text{S.cm}^{-1}$ )	SDT ( $\text{mg.L}^{-1}$ )
100% BBM	0,3792	0,095	995	646,75
75% BBM + 25% concentrado	0,3790	0,095	1622	1054,30
70% BBM + 30% concentrado	0,40	0,08	1740	1131,00
65% BBM + 35% concentrado	0,2730	0,0455	2005	1303,25
60% BBM + 40% concentrado	0,2546	0,037	2100	1365,00
55% BBM + 45% concentrado	0,2504	0,041	2520	1638,00
50% BBM + 50% concentrado	0,1898	0,027	2570	1670,50
45% BBM + 55% concentrado	0,1362	0,019	2880	1872,00

\*A produtividade foi efetuada com a média de 3 pontos.

Dessa forma, foi verificado que os valores de produtividade e concentração de biomassa estão abaixo da literatura, pois de acordo com Gouveia e Oliveira, 2009, a concentração média da *Chlorella vulgaris* é de  $1,5\text{g.L}^{-1}$  e a produtividade de  $0,18\text{g.L}^{-1}$ , este fato pode ser explicado devido

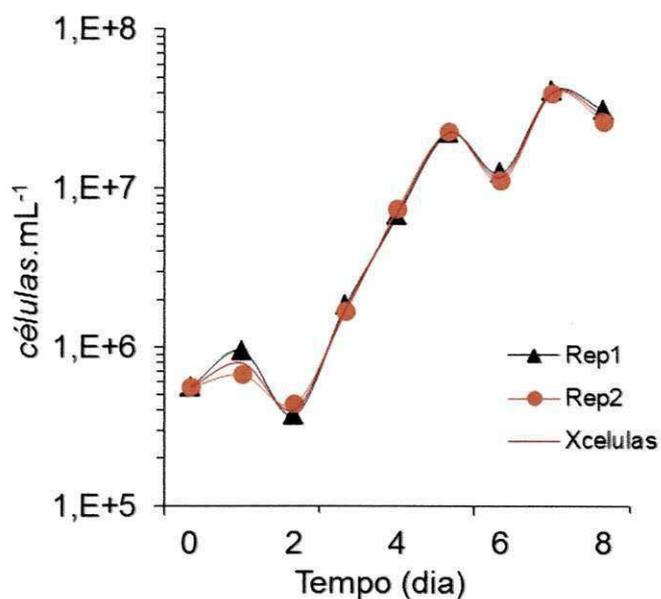
a dificuldade encontrada em separar a biomassa do meio de cultivo, pois durante a mesma, havia uma enorme perda, neste caso a separação foi efetuada por meio da floculação adicionando hidróxido de alumínio na dosagem de  $8\text{mg.L}^{-1}$  e em seguida aguardava um período de 2 horas para promover a sedimentação dos flocos, que mesmo com a adição de floculante, não se obtia um floco denso de alta velocidade de sedimentação capaz de separar eficientemente as células floculadas do meio líquido. Mas, é importante observar que o rendimento celular passa a sofrer um decaimento significativo, após adição de 30% de concentrado, assim a concentração até 25% não compromete a produtividade da microalga *Chlorella vulgaris* (cepa FURG).

Cabe ressaltar que, todos os experimentos foram finalizados quando se atingia o início da fase estacionária que neste caso correspondia a população máxima que a cepa era capaz de atingir de  $10^7 \text{ cel.mL}^{-1}$ .

Verifica-se que quando utiliza o teor de 25% de concentrado ao meio de cultura que corresponde a um STD de  $1054,30\text{mg.L}^{-1}$ , observa-se que a condutividade do meio de cultura aumenta aproximadamente em 47% em relação ao meio com apenas BBM, o que significa que a quantidade de sais eleva-se quase que 50% ao meio de cultivo, mostrando o elevado estresse que as células ficam submetidas. Por esta razão, é bastante difícil uma boa adaptação das células com teores de concentrado acima de 25% ao meio de cultura que possivelmente modifica o seu metabolismo com a diminuição na taxa de crescimento e justificando o baixo crescimento celular para teores superior a 25% de concentrado.

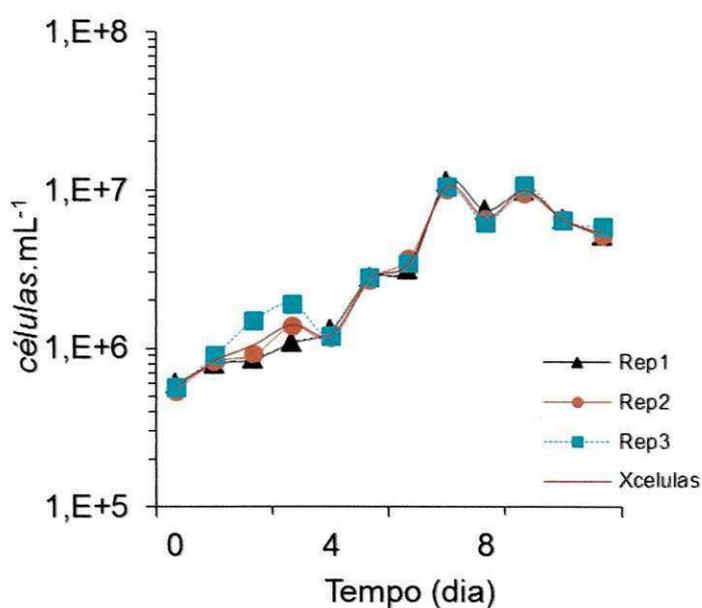
Durante o cultivo da *Chlorella vulgaris* (cepa FURG), uma das maiores dificuldades encontradas foi em manter o cultivo em desenvolvimento em razão da facilidade com que a microalga em estudo apresenta em se contaminar em razão de se desenvolver em um meio rico em nutrientes e se desenvolver em pH próximo a neutralidade, características estas comuns para muitos micro-organismos, por isso, foram perdidos vários cultivos. Na Figura 44 pode-se observar através das curvas de crescimento a dificuldade que a *Chlorella vulgaris* (cepa FURG) teve em se desenvolver, devido a competição entre as diversas espécies, como por exemplo a cianobactéria *Anabena sp* presentes no meio de cultivo que foi contaminado. Percebe-se também nesta Figura 44 que a população máxima não chegou a alcançar o seu crescimento máximo e atingir a densidade celular de  $10^7 \text{ cel.mL}^{-1}$ . Durante este estudo verificou-se que as principais contaminações foram por espécies de microalgas como a *Anabena sp* e *Scenedemus sp*.

Figura 44 – Cultivo *Chlorella vulgaris* em 100% BBM com contaminação



Outra contaminação muito comum que ocorria era pelo protozoário *Paramecium*, o qual estabelece relações de simbiose com a *Chlorella vulgaris*. A Figura 45 mostra o cultivo com contaminação por *Paramecium* em meio contendo apenas BBM sem adição de concentrado.

Figura 45– Cultivo *Chlorella vulgaris* em 100% BBM com contaminação

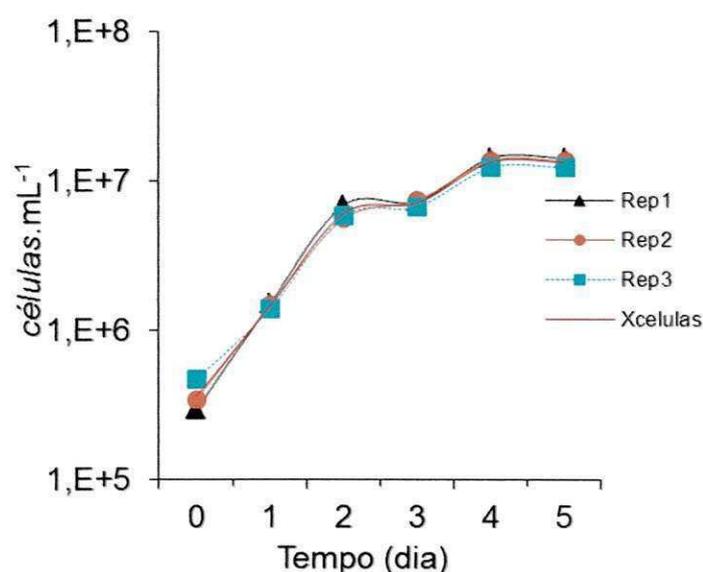


Observa-se que existe uma dificuldade no crescimento das células, já que a população apresentou uma dificuldade em atingir  $10^7$  cel.mL<sup>-1</sup> e o número máximo de células obtido foi de  $2,2 \times 10^7$ .

$\times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup> após o sexto dia de cultivo como ilustrado na Figura 45, este fato pode ser explicado pela competição dos micro-organismos presentes juntamente com a *Chlorella vulgaris*, tornando o meio com maior deficiência de nutrientes, impedindo assim um crescimento rápido da *Chlorella vulgaris*, que necessita de um meio rico em nutrientes para o seu desenvolvimento.

Na Figura 46 está apresentando o estudo com o aumento de 50% da concentração de Fe ao meio de cultura.

Figura 46– Cultivo da *Chlorella vulgaris* com aumento em 50% da concentração de Fe ao meio de cultura

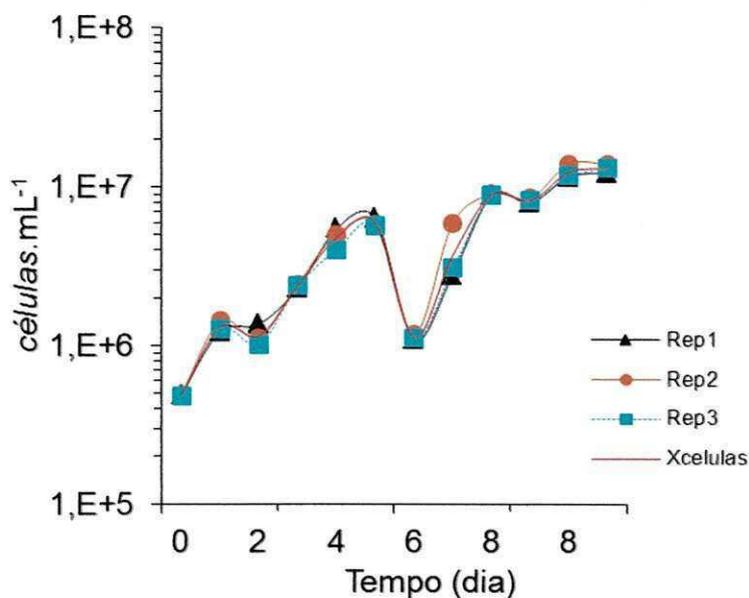


Observa-se que o cultivo obteve um rápido crescimento atingindo a população de  $10^7$  cel.mL<sup>-1</sup> em quatro dias de cultivo, o propósito desse estudo foi verificar se o aumento do Fe proporciona uma maior produtividade e juntamente com um maior teor de lipídios, pois conforme a literatura a carência de ferro é um dos principais fatores limitantes da produtividade da biomassa de algas e em alguns componentes bioquímicos, tais como lipídio.

O estudo do Ferro se baseou na pesquisa realizada por Behrenfeld et al. (2006) que demonstraram que o cultivo de microalgas com aumento o ferro tem uma função chave na regulação da biomassa do fitoplâncton e que a deficiência do ferro é um dos principais fatores limitantes da produtividade da biomassa de algas e em alguns componentes bioquímicos, tais como lipídio e de fato foi comprovado que o acréscimo de ferro melhora no desenvolvimento da microalga especificamente da *Chlorella vulgaris*.

A Figura 47 mostra o estudo de estresse imposto a célula por meio da redução de nitrato no meio de cultivo das microalgas.

Figura 47 – Cultivo da *Chlorella vulgaris* com redução de 50% na concentração de nitrato ao meio de cultura BBM

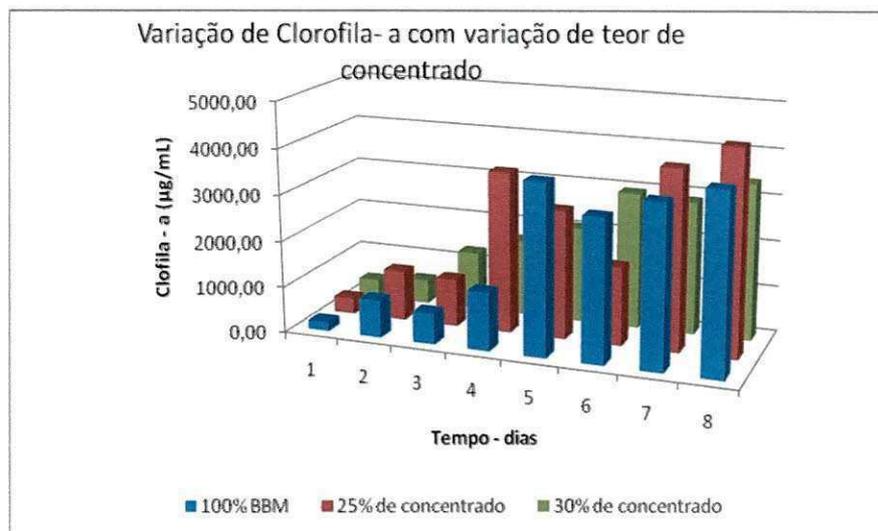


Este estudo objetivou obter uma maior concentração de lipídios pois de acordo com ALLMAN, 2000; SPOLAORE et al., 2006, o estresse com diminuição de nitrato favorece um aumento de lipídios na biomassa.

No entanto, essa condição adversa ao meio de cultivo proveniente da redução do nitrato altera o metabolismo microalgal, direcionando os processos metabólicos para a produção de lipídios de reserva para preparar a célula para um período de carência nutricional. Porém, a produtividade obtida por meio dessa limitação de nitrato foi extremamente baixa, além de proporcionar uma difícil adaptação das células ao meio, pois o referido cultivo só atingiu o máximo de células na fase exponencial com 12 dias de cultivo.

A Figura 48 mostra o estudo de clorofila-a com diversas aclimações químicas, desde o cultivo com 100% de BBM, como também com adição do concentrado, nas proporções de 25% e 30% de concentrado.

Figura 48– Variação clorofila-a para o cultivo de *Chlorella vulgaris* com diferentes teores de concentrado



Verifica-se que com 25% de concentrado e 75% de BBM foi obtido o maior valor de clorofila-a que foi de  $4431,17\mu\text{m.L}^{-1}$ . Este fato pode ser justificado devido o aumento de determinados sais presentes no concentrado, principalmente os sais de magnésio, que favorecem na realização da fotossíntese sem inibir o crescimento da microalga pelo excesso de magnésio.

Conforme afirma Lourenço (2006) que o magnésio é o elemento essencial para as microalgas por ser constituinte da molécula da clorofila. Além do magnésio ser um cofator de várias enzimas que participa na ativação das enzimas glicolíticas, estimulando a síntese de ácidos graxos essenciais e ainda regula os níveis iônicos celulares.

Em concentração acima de 25% de concentrado como percebido em estudos anteriores inicia-se uma redução no crescimento das células e este fato pode também ser comprovado pela diminuição do teor de clorofila-a durante o cultivo com 30% de concentrado como se pode observar na Figura 40.

A Tabela 10 apresenta os estudos com diversas aclimações químicas com a finalidade de se obter uma maior concentração de biomassa e produtividade associado a um melhor perfil de lipídios.

Tabela 10 – Avaliação do desenvolvimento das microalgas para diferentes aclimações

Aclimatização	Concentração Média da biomassa seca (g.L <sup>-1</sup> )*	Produtividade (g.L <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	Tempo de cultivo até atingir a fase estacionária (Dias)	Clorofila (µg.L <sup>-1</sup> )	
				Início	Final
100% BBM, 25°C	0,3792	0,0945	5	800	5861
-50% de Nitrato, 25°C	0,202	0,016	12	677	1967
+ 50% de Fe <sup>+2</sup> , 25°C	0,344	0,09	4	1300	7028
100%BBM, 17°C	0,227	0,038	6	678	5276
100% BBM, 30°C	0,182	0,0364	5	453	6109

Porém, verifica-se que apesar do estresse que o nitrato pode provocar na célula para favorecer uma maior produção de lipídios, esta redução limita bastante o crescimento celular podendo inviabilizar o processo de obtenção de biodiesel pois, a produtividade alcançada foi de apenas 0,016g.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>.

Com adição de Fe<sup>+2</sup>, observa-se que o tempo de cultivo foi menor e obtendo uma produtividade similar ao meio básico sem alteração química. Este resultado pode ser melhor observado pelo o aumento da clorofila-a ao final do cultivo.

Também pode ser verificado o efeito da temperatura no cultivo pois, modificando apenas o parâmetro da temperatura ocorreu uma redução na produtividade da biomassa. Desta forma, a temperatura ideal para o cultivo é de ±26°C, temperatura esta que foi utilizada em todos os experimentos, excetos estes, os quais foram efetuados os estudos de efeito da temperatura sob o crescimento celular da *Chlorella vulgaris*.

Assim sendo, caso confirme que o aumento da concentração de Fe<sup>+2</sup> favorece a maior produção de lipídios, essa pode ser uma condição favorável para obter uma maior geração de biocombustível.

A Tabela 11 apresenta a composição química da biomassa em base úmida dos estudos efetuados nos fotobioreatores de 50L.

Tabela 11– Composição química da biomassa seca de *Chlorella vulgaris* para diversas condições de cultivo com adição de concentrado ao BBM

<b>Percentual Concentrado adicionado</b>	<b>Lipídios g/100g</b>	<b>Carboidratos g/100g</b>	<b>Proteínas N(total )g /100g f=6,25</b>	<b>Resíduos minerais g/100g</b>	<b>Umidade g/100g</b>
0%	8,56	-----	51,65	-----	-----
25%	9,76	-----	51,36	-----	-----
30%	4,06	21,79	49,94	AI*	AI*
35%	4,32	21,65	27,64	37,85	8,54
40%	2,0	21,13	18,87	47,22	10,78
45%	3,47	18,98	20,31	47,37	9,87
50%	2,38	18,74	15,72	55,78	7,38
55%	3,16	-----	20,46	48,99	AI*
60%	2,75	22,46	17,77	45,99	11,03

\*AI – Amostra insuficiente

De acordo com os mesmos foi verificado um valor de lipídios de 8,56% da biomassa seca quando o cultivo é efetuado em meio BBM, quando foi efetuado o estresse pelo aumento da salinidade através da adição de 25% de concentrado que corresponde a condutividade do meio de 1655 $\mu$ S e sólidos dissolvidos totais de 1054,30 mg.L<sup>-1</sup>, percebe-se um pequeno incremento no teor de total de lipídios que foi de 9,76%.

A medida que aumenta a concentração de sais oriundos da adição de maior volume de concentrado ao meio de cultivo não foi obtido resultados satisfatórios em termos de teor de lipídios, pois houve uma redução considerável do teor de óleos, caracterizando desta forma que a cepa em estudo apresenta um limite de tolerância para suportar o estresse provocado por uma maior concentração de sais com a finalidade de gerar mais lipídios na composição química da biomassa em estudo.

Costa et al (2006) em seus estudos obtiveram valores de lipídios inferiores alcançando 6,96% e 7,98% para *Chlorella vulgaris* e *Chlorella munitissima* respectivamente, cultivadas em meio Bristol's modificado (MBM). No entanto, Borghetti (2009) utilizando meio de cultura com 15% do resíduo líquido manupeira e 85% de água para o cultivo de *Chlorella munitissima* obteve um valor de lipídios superior atingindo um valor máximo de 11,08%, este cultivo foi realizado em fotobioreatores de vidro de 2L com agitação constante, iluminância de 2500lux, a temperatura constante de 30°C com fotoperíodo de 12h. De acordo com o autor, este aumento foi superior ao

obtido por Costa et al (2006) em meio MBM, devido a redução de nitrogênio no meio com manupeira.

No entanto, mesmo com o discreto aumento de lipídios na espécie em estudo, verifica-se que os valores ainda são extremamente baixos para produção de biodiesel, pois de acordo com a literatura para que ocorra viabilidade econômica para produção de biodiesel a biomassa seca da microalga deve ter elevado teor de lipídios superior a 50%. (Chisti, 2007). Todavia, a viabilidade econômica da produção de microalgas não se deve concentrar apenas na produção biodiesel, pois, com a biomassa pode-se obter outra fonte de energia proveniente da fermentação dos carboidratos presente na composição celular da *Chlorella sp* que pode ser o bioetanol. Também não se pode menosprezar o potencial da *Chlorella vulgaris* para indústrias alimentícias em razão do seu alto teor de proteínas que ainda se mantém em valores elevados mesmo com o acréscimo de sais do concentrado no seu cultivo.

Portanto, a importância do cultivo da *Chlorella sp* e *Chlorella vulgaris* não se restringe apenas ao seu valor comercial, mas também deve-se considerar o benefício ambiental que o cultivo das microalgas acarretam em função do importante papel no sequestro de CO<sub>2</sub>, favorecendo para reduzir os efeitos provocados pelo aquecimento global, pois de acordo com Carvalho,(2010) a *Chlorella sp* é uma das microalgas com maior capacidade de sequestrar CO<sub>2</sub>, chegando a obter sequestro de 667,94 t.ha<sup>-1</sup>ano<sup>-1</sup>, enquanto algumas plantas superiores não ultrapassam a 50 t.ha<sup>-1</sup>ano<sup>-1</sup>.

A Tabela 12 apresenta o perfil de ácidos graxos de *Chlorella vulgaris* cultivado em meio básico BBM sem adição de concentrado com as mesmas aclimatizações.

Tabela 12 - Perfil de ácido graxo determinado por cromatografia gasosa da espécie *Chlorella vulgaris* em meio básico BBM sem adição de concentrado

Ácido Graxo	Designação Estenográfica	Peso Seco (%)
Láurico	C12:0	1,26
Tridecnóico	C13:0	1,08
Mirístico	C14:0	0,51
Ci-10-pentadecanóico	C15:1	4,22
Palmítico	C16:0	16,56
Palmitoléico	C16:1	1,83

(continua...)

(Conclusão)

Ácido Graxo	Designação Estenográfica	Peso Seco (%)
Heptadecanóico	C17:0	0,13
Cis-10-heptadecenóico	C17:1	0,92
Esteárico	C18:0	0,54
Octadecenóico	C18:1	0,63
Eláídico	C18:1n9t	0,16
Oléico	C18:1n9c	6,84
Linoléico	C18:2n6c	11,25
$\gamma$ -linolênico	C18:3n6	21,04
Behênico	C22:4	0,65
DHA (docosahexaenóico)	C22:6n3	0,60

Verifica-se que o teor total de lipídios na biomassa foi de 8,56% em base úmida, desde 34,68% representa os ácidos graxos saturados e monoinsaturados com até 18 átomos de carbono, que são os mais adequados para produção de biodiesel.

No entanto, um alto conteúdo de ácidos graxos de cadeia longa é indesejável para produção de biodiesel, assim, algas que apresentam alto valor em ácidos graxos de cadeia longa superior a 18 carbonos não devem ser selecionadas quando a finalidade do cultivo seja a produção de biodiesel. Normalmente, as cadeias curtas de ácidos graxos (C<sub>14</sub>- C<sub>18</sub>) são mais apropriadas para produção de microalgas, a microalga *Chorella sp*, apresenta a maioria de seus ácidos graxos com cadeias curtas, sendo assim uma espécie adequada na produção de biodiesel (HUANG et al., 2010).

A Tabela 13 apresenta o perfil de ácidos graxos de *Chlorella vulgaris* cultivado em meio básico BBM com adição de 25% de concentrado, com a obtenção de 9,76% do teor total de lipídios na biomassa e 40,57% representa os ácidos graxos saturados e monoinsaturados com até 18 átomos de carbono.

Tabela 13- Perfil de ácido graxo determinado por cromatografia gasosa da espécie *Chlorella vulgaris* em meio básico BBM com adição de 25% concentrado

<b>Ácido Graxo</b>	<b>Designação Estenográfica</b>	<b>Peso Seco (%)</b>
Láurico	C12:0	0,34
Tridecnóico	C13:0	0,56
Mirístico	C14:0	1,15
Pentadecanóico	C15:0	0,91
Palmítico	C16:0	16,63
Palmitoléico	C16:1	2,88
Heptadecanóico	C17:0	0,41
Cis-10-heptadecenóico	C17:1	2,32
Estearico	C18:0	3,52
Octadecenóico	C18:1	0,63
Elaídico	C18:1n9t	0,60
Oléico	C18:1n9c	10,62
Linolelaídico	C18:2n6t	0,27
Linoléico	C18:2n6c	10,41
$\alpha$ -linolênico	C18:3n6	18,56
Lignocérico	C24:0	0,37
Behênico	C22:4	0,25
DHA (docosahexaenóico)	C22:6n3	0,28

A seguir as Figuras 49 e 50 mostram a performance de desenvolvimento de cultivo das cepas da *Chlorella sp* (cepa TU1) e *Chlorella sp* (cepa TU3) respectivamente, com adição de 25% de concentrado e 75% de BBM em termos de densidade celular em função do tempo de cultivo.

Figura 49 – Cultivo da *Chlorella sp.* (cepaTU1) com adição de 25% de concentrado ao meio de cultura e 75% de BBM

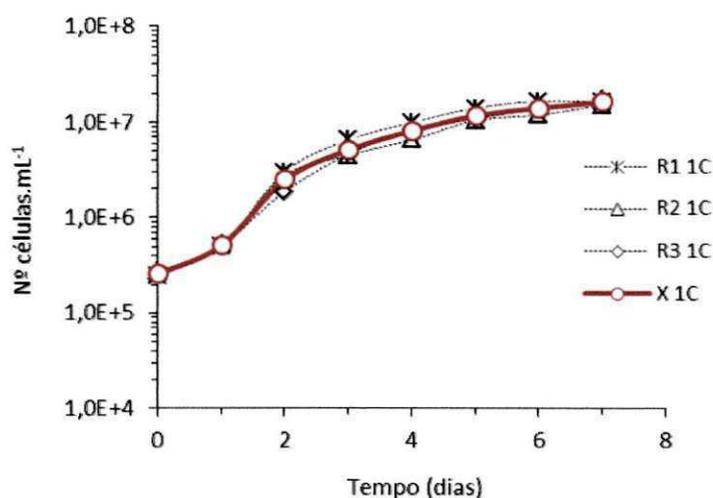
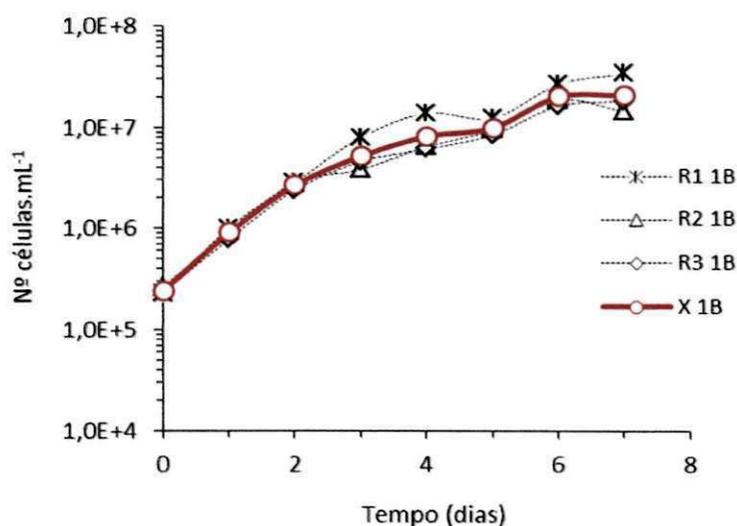


Figura 50 – Cultivo da *Chlorella sp* (cepa- TU3) com adição de 25% de concentrado ao meio de cultura e 75% de BBM



Observa-se que a fase exponencial finaliza-se após 5 dias de cultivo e que o número máximo de células obtido foi de  $1,2 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup> (Figura 49), com o teor de lipídios determinado para estas condições de 8,06% para a *Chlorella sp*(cepa TU1).

Já para a *Chlorella sp* (cepa TU3) o crescimento das células com adição de 25% de concentrado representou um crescimento acima do obtido com a cepa *Chlorella sp* (cepa TU1) alcançando o número máximo de células de  $4,0 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup> (Figura 50). Comparando-se com a

cepa *Chlorella vulgaris* (cepa FURG) verifica-se que nas mesmas condições de cultivo esta é a que representa melhores resultados pois, foi obtido maior densidade celular no início da fase estacionária de  $5,9 \cdot 10^7 \text{ cel.mL}^{-1}$  e maior teor de lipídios 9,76%. A concentração de lipídios determinada com a cepa *Chlorella sp* (cepa TU3) foi de 9,34% nas condições de cultivo com 25% de concentrado e 75% de BBM, apresentando assim valor superior que a cepa *Chlorella sp* (cepa TU1) que obteve apenas 8,06%. Porém, a cepa *Chlorella sp* (cepa TU3) apresentou um teor de lipídios pouco abaixo ao obtido com a cepa *Chlorella vulgaris* (cepa FURG).

Desta forma, confirma mais uma vez que a cepa ideal para o estudo com maior produção de lipídios e a maior produtividade de biomassa é a cepa *Chlorella vulgaris* (cepa FURG).

Apesar do rendimento de óleo ter sido baixo para as cepas estudadas, são resultados superiores ao encontrado por Vascoceles et al. (2010) que obtiveram 7,1% de lipídio em base seca, já Gouveia e Oliveira (2009) encontraram 5,1%, todos utilizando a espécie *Chlorella sp* em meio de cultura básico.

## 5.2 SEPARAÇÃO DAS MICROALGAS POR MEMBRANA DE MICROFILTRAÇÃO

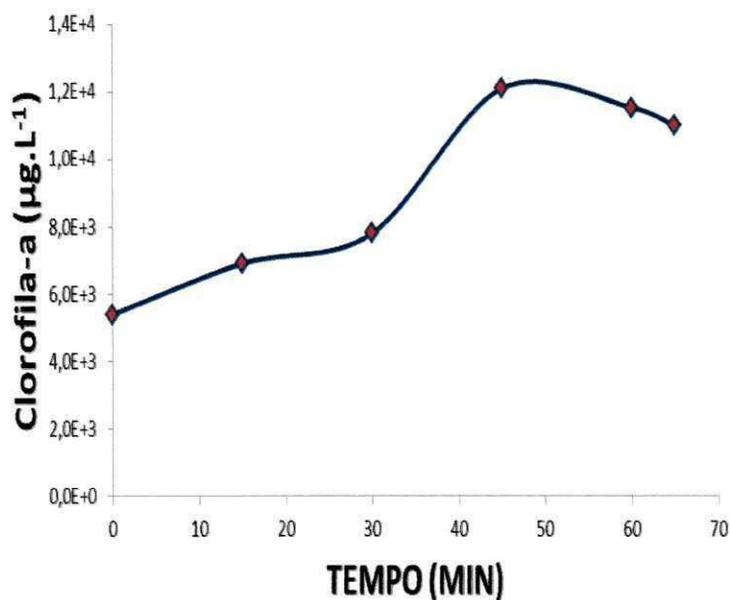
A separação da biomassa por meio de membranas de microfiltração mostrou-se bastante eficiente, principalmente no que se refere a produtividade, pois através deste processo obteve uma concentração de biomassa de  $0,955 \text{ g.L}^{-1}$  e produtividade de  $0,23 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{dia}$  valores este bem superior aos obtidos por meio de separação por flotação e com produtividade superior a literatura que de acordo com Gouveia e Oliveira (2009) a produtividade máxima é de  $0,18 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{dia}$  para *Chlorella vulgaris*.

Além da vantagem de obter um maior volume de biomassa, também tem-se o fato que não utiliza-se produto químico para separação, permitindo obter o permeado nas condições de reutilizá-lo para novos cultivos possibilitando desta maneira uma redução nos custos de cultivo e sem provocar efeitos indesejáveis ao meio ambiente pela não geração de resíduos líquidos impactante aos corpos hídricos ou ao solo.

O tempo de separação para atingir o máximo de retenção das microalgas foi de 65 (sessenta e cinco) minutos.

A Figura 51 mostra a eficiência da separação em função do tempo em termos de concentração de clorofila-a.

Figura 51 - Concentração de clorofila-a em função do tempo de processamento por membranas de microfiltração para separação da *Chlorella vulgaris*



Observando que a medida que ocorre a permeação maior é o valor de clorofila-a no concentrado da membrana o que significa o aumento na separação da biomassa do meio de cultivo.. Assim, foi verificado que para a separação das microalgas de pequenas de dimensões menor que 30 µm de comprimento, como é o caso da *Chlorella sp* que mede entre 2 µm a 10 µm, a técnica mais viável em termos de obter um maior concentrado de células conferindo com isso maior produtividade e menor perda de biomassa é o processo por separação de membranas. Vale ressaltar, que o custo energético para este processo foi extremamente baixo, pois o motor bomba que alimentava o sistema era de baixa potência no valor de ¼ cv.

### 5.3 CULTIVO EM TANQUES RACEWAY

Inicialmente os experimentos em tanques *raceway* (Figura 52) com *Chlorella vulgaris* foi realizado com cultivo em 100% de BBM para que obtivesse uma avaliação mais apurada em relação as variáveis: óleo, crescimento e produtividade . Além, de se obter uma comparação com os dados obtidos em laboratório.

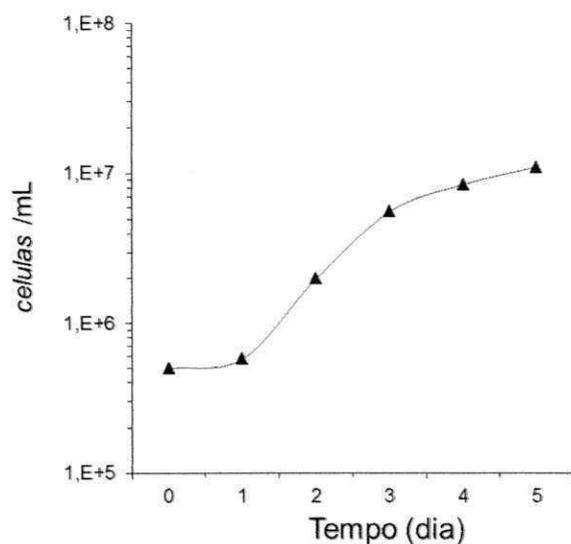
Figura 52 – Tanques *raceway* com desenvolvimento de *Chlorella vulgaris*



Fonte: LABDES(2011)

Os primeiros cultivos apresentaram ótima adaptação em tanques abertos não ocorrendo contaminação mesmo com os tanques expostos, como também obteve um rápido crescimento, em 5 dias de cultivo já atingia-se a população de  $10^7 \text{ cel. mL}^{-1}$  como ilustra a Figura 53 , efetuando a coleta no momento que iniciava a fase estacionária, para posterior separação e secagem. Durante este cultivo o pH do meio inicial foi 7,0 e ao final do cultivo atingiu 8,40. O lux variou de 8kluz a 10kluz durante o cultivo, a temperatura do meio de cultivo variou de 24°C a 32°C, atingindo a temperatura máxima de 32°C no segundo dia de cultivo.

Figura 53- Cultivo de *Chlorella vulgaris* em tanque *raceway* com 100% de BBM



A Figura 54 ilustra o tanque no ponto de coleta que corresponde o quinto dia de cultivo onde saiu da fase log atingindo a população de  $10^7$  cel.mL<sup>-1</sup>

Figura 54 – Cultivo no início da fase estacionária



É importante verificar que neste cultivo quando atingiu o início da fase estacionária devido a maior concentração de células percebe uma coloração esverdeada mais intensa. No entanto, apesar de ter obtido ótimo crescimento, houve um rendimento celular de  $0,143\text{g.L}^{-1}$  de cultivo inoculado isso se deve em razão da ineficiência da separação por sedimentação, pois muitas células não conseguiram se depositar no fundo do sedimentador.

Em razão do cultivo ter sido efetuado a céu aberto poderia-se esperar que ocorresse uma eventual contaminação. Mas, com intuito de impedir a presença de outras espécies no cultivo e apenas o domínio da espécie *Chlorella vulgaris* a inoculação nos tanques *raceway* era sempre realizada com população próxima de  $10^6$  cel.mL<sup>-1</sup>, tornando o cultivo mais resistentes evitando possíveis competições com outros micro-organismos.

Na comunidade de Uruçu, local que estava sendo realizado o cultivo em tanques *raceway*, no período de verão ocorre fortes insolação, o que dificultava o desenvolvimento da *Chlorella vulgaris*, pois quando iniciava o cultivo, nos dias subsequentes ocorriam fortes insolação perdendo todo o cultivo, neste período a luminância estava atingindo valores de até 14 klux.

A Figura 55 mostra o cultivo sem desenvolvimento e pode-se perceber pela coloração marrom, como também na realização da contagem das células não foi identificado a presença da *Chlorella vulgaris*.

Figura 55 – Tanque *raceway* com cultivo de *C. vulgaris* sem desenvolvimento



De acordo com Morist et al., (2001), é devido à luminosidade que a fotossíntese ocorre, mas ela se processa até um limite denominado ponto de saturação luminosa, que é da ordem 5 a 10 klux para cionobactérias. O cultivo sob altas intensidades luminosas é responsável por dois fenômenos prejudiciais: a foto-oxidação, que tem efeitos letais para as células, podendo levar à perda total da cultura e a fotoinibição, provocando um decréscimo no rendimento máximo do

crescimento, esta também pode ocorrer sob intensidades luminosas moderadas se a taxa fotossintética estiver limitada por fatores estressantes, como baixas temperaturas (JENSEN; KNUTSEN, 1993; SAMUELSSON et al., 1985).

O excesso de luz também pode provocar um efeito letal nas células, pois na presença de oxigênio, pode formar peróxido de hidrogênio (substância tóxica para as microalgas), essa reação é denominada foto-oxidação ou morte foto-oxidativa (UEDA et al., 1998).

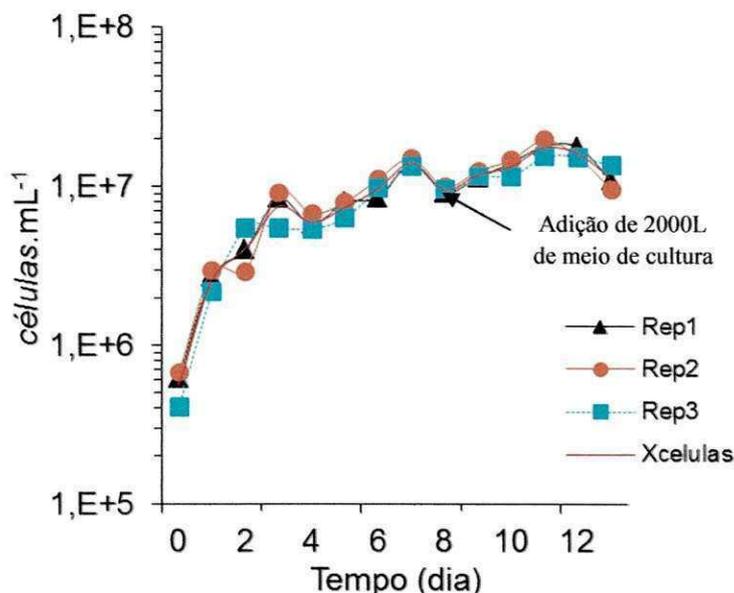
Outro ponto que deve enfatizar com relação à temperatura do meio, é referente às lâminas muito pequenas a temperatura pode exercer um prejuízo no cultivo, pois de acordo com Converti et al. (2009), o crescimento da *Chlorella vulgaris* foi afetada por temperaturas acima de 30°C e aos 35°C, estas microalgas, de fato, exibem uma redução de 17% em sua taxa de crescimento, quando comparado a uma temperatura de 30°C, no momento que aumentou para (38°C) ocorreu uma interrupção abrupta do crescimento de microalgas e, posteriormente, as células mortas. Esse resultado era facilmente visível por causa da mudança da cor das células de verde para marrom. Assim, acredita-se que o mesmo ocorreu no experimento efetuado nos tanques *raceway* em Uruçu.

Os efeitos de temperatura em muitas espécies de microalgas em laboratórios são bem documentados, mas os de efeitos de temperatura na produção de biomassa ao ar livre ainda não é bem conhecida. Muitas microalgas podem tolerar facilmente temperatura de 8° a 15°C mais baixo que a temperatura ótima de crescimento, mas em temperaturas elevadas, aproximadamente 4°C acima do ponto ótimo de crescimento pode resultar na perda total da cultura (MATA et al., 2010).

A Figura 56 apresenta o estudo de adição de 25% de concentrado, atingindo a fase estacionária com cinco dias de cultivo.

Com intuito de aumentar a biomassa de cultivo foi adicionado mais 2000L de meio de cultura, no qual era preparado com 75% de meio BBM e 25% de concentrado. Apesar do aumento da densidade celular era difícil a separação da biomassa por sedimentação mesmo com adição de coagulante, pois era perdida muita célula e o tempo excessivo no sedimentador superior a dezoito horas de sedimentação a biomassa começava a degradar perdendo assim toda a biomassa.

Figura 56 – Cultivo de *Chlorella vulgaris* em tanques *raceway* em 25% de concentrado e 75%BBM



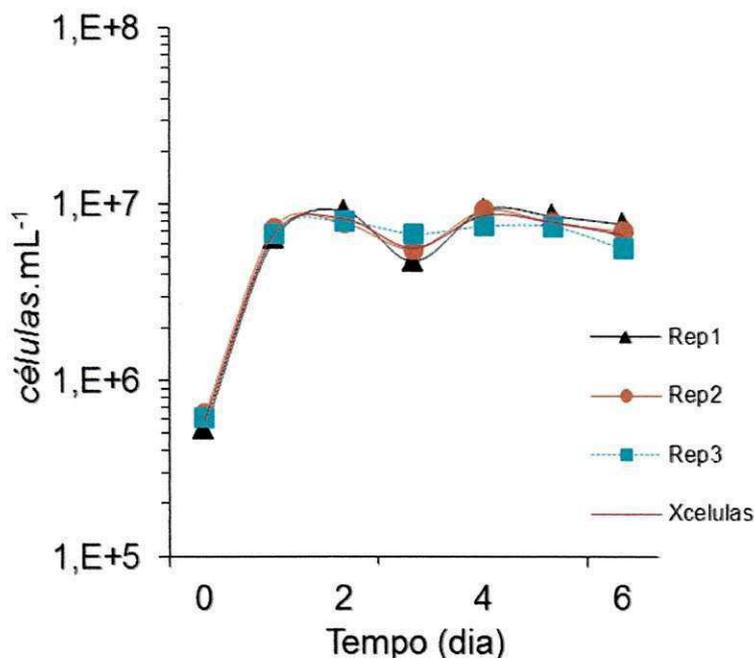
No entanto, o rendimento celular atingiu para estas condições o valor de  $0,084 \text{ g.L}^{-1}$ , valor abaixo aos obtidos em fotobioreatores, isto devido a falta de controle da temperatura e da iluminação que afetava no desenvolvimento celular e muitas células não suportavam toda esta variação, isto era perceptível no momento da contagem que foi detectado vários fragmentos celular. Neste cultivo, obteve a variação da temperatura de  $33^{\circ}\text{C}$  a  $25^{\circ}$  no meio do cultivo, mantendo a média de temperatura de  $29,4^{\circ}\text{C}$ .

De acordo com Lourenço, (2006), as temperaturas constantes são o que se busca no cultivo de microalgas, pois permite maior estabilidade em experimentos, maior reprodutibilidade e previsibilidade das respostas das espécies. Em cultivos de larga escala, o controle de temperatura é extremamente difícil, pois nem sempre é possível manter a temperatura, devido às flutuações sazonais durante o dia, a temperatura representa uma das principais limitações biológicas para a produção de biomassa de microalgas, principalmente quando o cultivo é realizado em tanques abertos que sofrem em função da redução da produtividade da biomassa.

Durante o inverno foi efetuado inoculação com adição de 25% de concentrado durante a temperatura máxima atingida foi de  $24^{\circ}\text{C}$  e a mínima de  $15^{\circ}\text{C}$ , fato este que pode explicar que a temperatura passou a ser o fator limitante para o baixo desenvolvimento das microalgas, pois não foi obtido o mesmo crescimento celular com relação ao experimento anterior que se mantinha as mesmas as aclimações químicas e temperatura maior.

A Figura 57 mostra a curva de crescimento e verifica-se que não foi alcançado a população máxima de crescimento  $10^7 \text{ cel.L}^{-1}$  para a espécie em estudo.

Figura 57 – Cultivo de *Chlorella vulgaris* em tanques *raceway* em 25% de concentrado e 75%BBM no período de inverno



Assim, percebe-se a dificuldade em realizar o cultivo a céu aberto, pois é extremamente complexo manter uma constância no crescimento celular em razão da sazonalidade influenciando diretamente em obter um equilíbrio na produtividade da espécie.

A Tabela 14 apresenta a composição química da *Chlorella vulgaris* cultivada em tanques *raceway*, para diversas aclimações químicas (100%BBM; 25% de concentrado e 75%de BBM) com a influência de temperatura nas mesmas condições de cultivo e apresenta também o tipo de processo utilizado para a separação da biomassa.

Tabela 14 – Composição química do cultivo de *Chlorella vulgaris* em tanques *raceway*

Percentual Concentrado adicionado	Lípidios g/100g	Carboidratos g/100g	Proteínas N(total)g /100g f=6,25	Resíduos minerais g/100g	Umidade g/100g	Tipo de separação
0%	5,86	27,32	37,58	14,52	15,29	Sedimentação gravitacional
25% período de inverno	3,73	14,67	19,91	42,85	18,84	Sedimentação gravitacional
25% verão	2,88	14,1	17,31	46,23	19,48	Sedimentação gravitacional
0%	2,38	13,92	20,32	55,38	6,10	Separação por membranas de osmose inversa

Foi verificado que para todas as aclimações químicas ocorrem uma redução no teor principalmente de lípidios, obtendo valores extremamente mais baixos quando foi efetuado adição de concentrado ao meio de cultura. Assim, percebe que em sistemas abertos ocorrem uma modificação metabólica na célula, que dificulta a produção de lípidios, bem como de outros componentes químicos na célula como é o caso dos carboidratos e proteínas, provavelmente devido, as elevadas temperaturas e as suas bruscas variações ocorridas durante o cultivo. Assim como, a forte insolação sobre o desenvolvimento das células cultivadas.

Logo, estas variações ambientais existentes na comunidade de Uruçú, as quais fogem dos controles operacionais efetuados em um cultivo a céu aberto, não favoreceram para as melhores condições de crescimento da *Chlorella vulgaris* em razão da alta variação de temperatura e luminância que ocorreram durante o cultivo da microalga em questão, como comentado anteriormente.

O aumento da temperatura da cultura microalgal causa um aumento no teor de proteínas e uma diminuição nos teores de carboidratos e lípidios das células microalgais (RAVEN; GEIDER, 1988; JAMES; AL-HINTY; SALMAN, 1989).

Na Tabela 14 apresenta a composição química da biomassa quando separada por meio de membranas via osmose inversa verifica-se que as características químicas em termos de lípidios, carboidratos e proteínas foram inferiores em relação ao processo com separação por

sedimentação, pois com separação de membranas via osmose inversa e sedimentação gravitacional foi de 2,88% e 5,86% respectivamente, o mesmo ocorreu para carboidratos e proteínas.

Isto pode ter ocorrido devido uma maior retenção de sais durante o processo de separação por membranas de osmose inversa, a qual possui uma baixa porosidade impedindo a passagem dos sais, de fato esta assertiva pode ser comprovada pelo elevado teor de resíduos minerais que foi obtido de 55,38 maior em todos os experimentos realizados nesta pesquisa.

A concentração de biomassa obtida por membrana via osmose inversa foi de  $0,1\text{g.L}^{-1}$ . Porém, esse valor baixo se deve a baixa densidade celular que se obtém em tanques *raceway*.

Assim, o processo para separação por microfiltração parece ser mais eficiente que o processo via osmose inversa, uma vez que foram obtidos valores maiores de lipídios, carboidratos e proteínas. No entanto, é interessante que se faça um estudo mais apurado para se obter uma conclusão mais precisa sobre qual tipo de membrana é mais eficiente na separação de microalgas de dimensões menores que  $30\mu\text{m}$ , utilizando outros tipos de membranas com porosidade entre a microfiltração e a osmose inversa, como por exemplo, a ultrafiltração e a nanofiltração.

## 6 PERSPECTIVAS

De acordo com os resultados apresentados a *Chlorella vulgaris* foi a cepa que melhor se adaptou as condições estudadas, sendo assim para dar continuidade a esta pesquisa de caráter inédito e em razão da sua excelente contribuição científica, é extremamente relevante a continuidade deste estudo. Assim, proponhe-se as seguintes perspectivas:

- Estudar a performance da *Chlorella sp* e *Chlorella vulgaris* em fotobioreatores de escala piloto, com intuito de obter melhores condições de separação e maior produção de ácidos graxos saturados;
- Estudar a viabilidade de produção do bioetanol ou outros biocombustíveis a partir da *Chlorella vulgaris*;
- Avaliar o cultivo heterotrófico e mixotrófico no desenvolvimento de *Chlorella sp* e *Chlorella vulgaris*;
- Estudar os processos de separação de *Chlorella vulgaris* por meio de membranas de ultrafiltração e nanofiltração;
- Levantar a viabilidade econômica com a produção de *Chlorella vulgaris* com aproveitamento do concentrado;
- Estudar a reciclagem do meio de cultivo com uso do mesmo após separação da biomassa com o intuito de reduzir os custos com o cultivo;
- Avaliar o cultivo da *Chlorella vulgaris* com aproveitamento de águas residuárias domésticas e industriais;
- Estudar a implantação de um sistema térmico nos tanques *raceway* de forma a ter mais controle na temperatura do meio de cultivo diminuindo a sazonalidade climática durante o dia e as estações do ano;
- Estudar outras espécies de microalgas com maior conteúdo lipídico e maior produtividade de biomassa, como a *Nannochloopsis sp*, *Neochloris sp* e *Nitzschia sp.*;
- Estudar o controle do sistema de cultivo piloto verificando o consumo de macro e micro nutrientes objetivando a rentabilidade e economia do processo;

## 7 CONCLUSÕES

1. Das cepas *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sp* (TU1) e *Chlorella sp* (TU3) foi verificado que a microalga que apresentou a maior densidade celular, mais rápido crescimento com o menor tempo de cultivo na fase log foi a cepa *Chlorella vulgaris* (cepa FURG), atingindo uma densidade celular de  $5,9 \times 10^7$  cél.mL<sup>-1</sup> em quatro dias, que corresponde ao seu ponto máximo de crescimento.
2. Os teores de concentrado que melhor se adaptam ao cultivo da *Chlorella vulgaris* (cepa FURG) nos fotobioreatores foram os que estavam compreendidos entre o intervalo de 10% a 25% de concentrado adicionado ao meio de cultivo;
3. A produtividade da *Chlorella vulgaris* (cepa FURG) com cultivo em fotobioreatores utilizando apenas o meio de cultura BBM foi de 0,095g.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>.
4. A produtividade da *Chlorella vulgaris* (cepa FURG) em cultivo em fotobioreatores com adição de 25% de concentrado e 75% do meio de cultura BBM foi de 0,095g.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>, e com maior concentração de lipídios.
5. A baixa produtividade obtida foi devido a deficiência na separação da biomassa do meio de cultivo através da floculação, pois não foi possível favorecer uma boa sedimentação em razão do caráter coloidal das células da *Chlorella vulgaris* (cepa FURG) favorecendo desta forma uma grande perda de biomassa na separação do material floculado e sobrenadante.
6. Na separação com membranas de microfiltração a perda de biomassa foi mínima, obtendo desta forma uma maior quantidade de biomassa comparado aos processos convencionais de coagulação/floculação, alcançando assim uma produtividade bem superior de 0,23g.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> que corresponde a uma concentração de biomassa de 0,955g.L<sup>-1</sup>.
7. O teor de lipídios obtidos no cultivo da *Chlorella vulgaris* (cepa FURG) com meio de cultura BBM sem adição de concentrado em fotobioreatores foi de 8,56% em base úmida.
8. O teor de lipídios obtidos no cultivo da *Chlorella vulgaris* (cepa FURG) com adição de 25% de concentrado e 75% em fotobioreatores obteve um pequeno incremento, pois, a concentração de lipídios alcançado foi de 9,26% em base úmida. Comprovando assim que, adição de concentrado ao meio de cultivo provoca o estresse na célula que favorece a produção de lipídios para a cepa em estudo.

9. A depleção de nitrogênio no meio de cultivo compromete o crescimento das células da *Chlorella vulgaris* (cepa FURG). Pois, provoca um aumento do tempo de cultivo 3 vezes maior que nos experimentos com a concentração ideal de nitrogênio.
10. O aumento da concentração de Fe no meio de cultura para o cultivo da *Chlorella vulgaris* (cepa FURG) favorece um maior crescimento celular.
11. O perfil de ácidos graxos no cultivo da *Chlorella vulgaris* (cepa FURG) em meio de cultura utilizando apenas BBM apresenta maior percentual de ácidos graxos saturados, os quais são utilizados para produção de biodiesel.
12. O perfil de ácidos graxos no cultivo da *Chlorella vulgaris* (cepa FURG) em meio de cultura utilizando 25% de concentrado e 75% de BBM aumenta o percentual de ácidos graxos saturados.
13. O cultivo em tanques *raceway* sofre bastante interferência no crescimento celular em função da sazonalidade de temperatura durante o dia e durante as mudanças de estação do ano.
14. A forte iluminação solar da localidade pode ter provocado a foto-oxidação celular, motivo pelo qual foi perdido diversos cultivos durante o desenvolvimento da *Chlorella vulgaris* em tanques *raceway*.
15. Em sistemas abertos o teor de lipídios diminui em função da possível mudança metabólica provocada principalmente pelas elevadas temperaturas.
16. A sedimentação da *Chlorella vulgaris* por meio de coagulação/floculação é ineficiente para grandes volumes.
17. O sistema de separação da biomassa via osmose inversa é mais eficiente para separação das células. No entanto, a mesma retém elevado teor de resíduos minerais possivelmente os sais dissolvidos contidos no meio de cultura, em razão da baixa porosidade da membrana em questão.
18. A produção de carboidratos e proteínas diminuem com cultivo em tanques *raceway*, em razão das mudanças bruscas de temperaturas e luminância.

Assim sendo, conclui-se que o aproveitamento do concentrado para o desenvolvimento da *Chlorella vulgaris* é possível. Porém, o aumento do teor de lipídios é relativamente baixo. Mostrando que, a melhor viabilidade é a exploração de outros constituintes químicos presentes na biomassa da *Chlorella vulgaris* de alto valor comercial e que para as condições estudadas o teor de lipídios obtidos inviabiliza a produção de biodiesel. Mas, a mesma possui enorme potencialidade de gerar outros biocombustíveis.

Logo, conclui-se que o cultivo das microalgas tem um ganho ambiental superior a outras fontes de biocombustíveis, daí a vital importância em se aprofundar nos estudos das microalgas para produção de biocombustíveis.

BECKER, E. W.; VENKATARAMAN, L. V. **Biotechnology and Exploration of algae – The Índia Approach**. IGC/AICPA. Mangalore: Sharada, 1981. p.24-79.

BERTOLDI, F.; OLIVEIRA, J.L.B.; SANT'ANNA, E.S. Revisão: Biotecnologia de microalgas. **Boletim do CEPPA**. v.26, n.1, p.9-20. 2008.

BERTOLDI, F.; SANT'ANNA, E.S.; OLIVEIRA, J.L.B.- Teor de clorofila e perfil de sais minerais de *Chlorella vulgaris* Cultivada em solução hidropônica residual. **Ciência Rural**. v.38, n.1, p.54-58, 2008.

BERTOLDI, F. et al. Lipids, fatty acids composition and carotenoids of *Chlorella vulgaris* cultivated in hydroponic wastewater. **Grasas y aceites** (Sevilha). v. 57, n. 3, p.270-274. 2006.

BORGES, F.C., **Proposta de um modelo conceitual de biorrefinaria com estrutura descentralizada**. Dissertação, UFRS, Porto Alegre, 2010.

BORGHETTI, N.R.B., BORGHETTI, J.R., ROSA FILHO, E.F., **Aquífero Guarani – A verdadeira integração dos Países da América do sul**. Curitiba, 2004.

BORGHETTI, I.V., **Avaliação do crescimento da Microalga *Chlorella minutissima* em meio de cultura com diferentes concentrações de manipueira**. 2010. 202 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

BOROWITZKA, M.A.; BOROWITZKA, L.J. **Micro-algal biotechnology**. Cambridge: Cambridge University, 1988. 477p.

BOROWITZKA, M.A. Pharmaceuticals and agrochemicals from microalgae. In: \_\_\_\_\_. **Chemicals from algae**. Washington DC: Cohen, Z., 1999. p.313-352.

BOROWITZKA, M.A. Products from microalgae. **Infofish International**, v.5, p. 21-26, 1993.

BRASIL, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária EMBRAPA, Informação tecnológica plano nacional de agroenergia -2006-2011, 114p, 2010.

BRASIL, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA N° 357, Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Ministério do Meio Ambiente, 17 de março de 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Recursos genéticos e melhoramento: Micro-organismos**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2002. 743p.

BRASIL, Ministério da Saúde , **Padrão de Potabilidade**. Brasil, Portaria n° 2914, de 14 de dezembro de 2011

BRENNAM, 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, p. 557-577, 2010.

CAMPOS, R.T. Avaliação benefício-custo de sistema de dessalinização de água em comunidades rurais, **Revista de Economia e Sociologia Rural**, p.22, 2007.

CARBON utilization, and oxygen accumulation. **Biotechnol bioeng**, v. 31, p 44-336, 1988.

CARLOZZI, P.; SACCHI, A. Biomass production and studies on *Rhodospseudomonas palustris* grown in an outdoor, temperature controlled, underwater tubular photobioreactor. **Journal of Biotechnology**, v.88 n. 3, p.239–249, 2001.

- CARVALHO, R.M.J., **Desenvolvimento e análise energética do processo de obtenção do biodiesel de microalga por metanólise *in situ*** (Dissertação de mestrado), 2010, 99p, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- CERON GARCÍA, M.C. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum*, on glycerol: growth rate and fatty acid profile. **Journal of Applied Phycology**, v.12, p 239-248, 2000.
- CHEN, F. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. **Trends in Biotechnology**, v.14, p.421-426, 1997.
- CHISTI, Y. , Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnol.** v.26, n. 3, p. 126-131, 2007a.
- CHISTI, Y., Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 294– 306, 2007b.
- CHOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F. J. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. **Biotechnology**, v.1, n.3, p.21-34, 2004.
- CHOJNACKA, K.; NOWORYTA, A. Evaluation of *Spirulina* sp. Growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v.5, p. 34- 46, 2004.
- CONVERTI, A. et al. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel. **Chemical Engineering and Processing: Process intensification**, v.48, p. 1146-1151, 2009.
- CORNET, J. F.; DUSSAP, C. G.; GROS, J. B. Kinetics and energetics of photosynthetic microorganisms in photobioreactors. Application to *Spirulina* growth. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.59, p.155-223, 1998.
- COZZA, K. L. ***Spirulina platensis* em meios naturais e sintéticos: fatores nutricionais e custos experimentais.** 1999. 204p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 1999.
- DAY, J. G.; EDWARDS, A. P.; RODGERS, G. A. Development of an industrial scale process for the heterotrophic production of a micro-algae mollusc feed. **Bioresource Technology**, v.38, p. 245-249, 1991.
- DERNER, R.B. et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v.36, p. 1959-1967, 2006.
- DI BERNARDO, L; PAZ, S.P.L. **Seleção de Tecnologias de Tratamento de Água.** São Carlos - SP: LDiBe, 2008. p-1-111.
- DUARTE, I. C. S. **Influência do meio nutricional no crescimento e composição centesimal de *Chlorella* sp (Chlorophyta, Chlorococcales).** 2001. 148p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.
- FERREIRA, W. B. et al. Pré-tratamento com membranas de microfiltração na dessalinização. In: CONGRESSO IBERO-AMERICANO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE MEMBRANA, 6., 2007, Campina Grande. **Anais...** Campina Grande: UFCG, 2007
- FERREIRA, W. B.; **Solução Alternativa de Abastecimento de Água para consumo humano em Comunidade difusas: Monitoramento e Controle da Qualidade da Água.**

2008. 124 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – UFCG, Campina Grande – PB, 2008
- FERRI, M. G. **Fisiologia Vegetal I**. 2.ed. São Paulo: Pedagógica e Universitária Ltda, 1979.
- FRANÇA, D. O planeta água esta secando. **Globo Ciência**, v. 85, p.54-61, 1998.
- FRANÇA, K.B. **Aplicação da Osmose Inversa em Dessalinização**. In: Escola Latino América de Membranas e Processos com Membranas, 2, **Anais...** Campina Grande-PB, Julho 2007.
- GLAUDE, R. M.; MAXEY, J. E. Microalgal feeds for aquaculture. **Journal of Applied Phycology**, v.6, p.131-141, 1994.
- GOUVEIA, L.; OLIVEIRA, A.C. Microalgae as a raw material for biofuels production, **J. Ind Microbiol Biotechnol**, v.36, p. 269-274, 2009.
- GREENE, R. M.; GEIDER, R. J.; FALKOWSKI, P. G. Effect of iron limitation on photosynthesis in a marine diatom. **Limnology and Oceanography**, v.36, n.8, p.1772-1782, 1991.
- GRIMA, E. M. et al. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 231-248, 1999.
- GU, S; SINGH, J. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 2596-2610, 2010.
- GUIRY, M. D. **AlgaeBase version 4.1**. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway, 2006. Disponível em: <<http://www.algaebase.org>>. Acesso em: 30 ago. 2006.
- GURBUZ, F.; CIFTCI, H.; AKCIL, A. Biodegradation of cyanide containing effluents by *Scenedesmus obliquus*. **Journal of Hazardous**, v.9, p. 74-162, 2009.
- HARUN, R.; DAVIDSON, M.; DOYLE, M.; GOPIRAJ, R.; Technoeconomic analysis of an integrated microalgae photobioreactor, biodiesel and biogas production facility. **Biomass & Bioenergy**, v. 35, p. 741- 747, 2011.
- HARUN, R.; SINGH, M.; FORDE, M.G.; DANQUAH, K.M. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 1037-1047, 2010.
- HIRAYAMA, S.; UEDA, R.; SUGATA, K. Evaluation of active oxygen effect on photosynthesis of *Chlorella vulgaris*. **Free Radical Research**, v.25, n.3, p.247-257, 1996.
- HU, Q. et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The plant journal**, v. 54, p. 621-639, 2008.
- HUANG, G. et al. Biodiesel production by microalgal biotechnology, **Applied Energy**, v. 87, p. 38-46, 2010.
- HUSSAIN, I. et al. Wastewater use in agriculture: Review of impacts and methodological issues in valuing impacts. (With an extended list of bibliographical references). Working Paper 37. Colombo, Sri Lanka: **International Water Management Institute**, 2002.

- ILLMAN, A.M.; SCRAGG, A.H.; SHALES, S.W. Increase in chlorella strains calorific valvues when grown in low nitrogen medium. **Enzyme microb. Thecnol**, v.27, 631-635, 2000.
- JENSEN,S.; KNUTSEN, G. Influence of light and temperature on photoinhibition of photosynthesis in *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, p. 495- 504, 1993.
- JOHN, E. H.; FLYNN, K. J. Modelling phosphate transport and assimilation in microalgae, how much complexity is warranted? **Ecological Modelling**, v.125, p.145–157, 2000.
- JONES, G.J. A guide to methods for estimating microbial numbers and biomass in fresh water. Ambleside: Freshwater Biological Association – Scientific Publication v. 39, p. 1154-1954, 1979.
- JORDAN, F.L; YORLIC, M.;MARINO,K.;BROWN,P.;SEAMAN,R.;GLENN,E.P. Consumptive water use and stomatal conductance of Atriplex lentiformes irrigated with industrial brine in a desert irrigation distric. **Agricultural and Forest Meteorology**, v.149, n. 5, p.899-912, 2009.
- JUSSIAK, M. P.; DUSZOTA, K.; MYCIELSKI, R. Intensive culture of *Chlorella vulgaris* as the second stage on biological purification of nitrogen industry wastewater. **Water Research**, v.18, p.1-7, 1984.
- KAYOMBO, S. et al.Effect of substrate concentration on the growth of heterotrophic bacteria and algae in secondary facultative ponds. **Water Research**, v.37, p. 2937–2943, 2003.
- KHAN, S.A. et al. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, p. 686-698, 2009.
- KHOZIN – GOLDEBERG.; COHEN, Z. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid compositium of the fresh water eustigmatophyte *monodus subterraneus*. **Phytochemistry**, v. 67, p.696- 701, 2006.
- KNOTHE,G.; Produção de Biodiesel. in: **Manual de Biodiesel**, Ed. Knothe, G. , Gerpen, J. V. , Krahl, J. e Ramos, L. P. São Paulo, p. 29-46, 2006.
- KOLBER, Z.; ZENH, J.; FALKOWSKI, P. G. Effects of growth irradiance and nitrogen limitation on photosynthetic energy conversion in photosystem II. **Plant Physiology**, v.88, p.923-929, 1988.
- KRIENITZ, L.; HEGEWALD, E. H.; HEPERLE, D.; HUSS, V. A. R. Phylogenetic relationship of Chlorella and Parachlorella gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae), **Phycologia**, sep 2004. Disponível em:<[http://www.findarticles.com/p/articles/mi\\_qa3850/is\\_200409/ai\\_n9458565/pg\\_8](http://www.findarticles.com/p/articles/mi_qa3850/is_200409/ai_n9458565/pg_8)>. Acesso em : 30 ago. 2006.
- LACAZ-RUIZ, R. Utilização de meios de cultura a base de solução de cinzas, efluente da indústria cítrica e meios de cultura alternativos formulados através de programa específico de computação para cultivo de *Spirulina platensis* (Norst.) 1996. 133p. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1996.
- LEE, Y. K. Commercial production of microalgae in the Asia-pacific rim. **Journal of Applied Phycology**, v.9, p.403-411, 1997.

- LEE, Y. K.; LOW, C. S. Productivity of Outdoor Algal Cultures in Unstable Weather Conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v.41, p.1003-1006, 1993.
- LINS, N.E., PINHO, J.H.O., Programa de dessalinizadores de águas para pequenas comunidades – Ponto de Atendimento eletrônico. **19º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, Foz do Iguaçu. Anais eletrônico II-017, 1997.
- LIU, Z.Y.; WANG, G.C.; ZHOU, B.C. Effect of iron on grown and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. **Bioresour. Technol**, v.99, p. 4717-4722, 2008.
- LOMBARDI, A.T.; WANGERSKY, P.J. Influence of phosphorus and silicone on lipid class production by the marine diatom *Chaetoceros gracilis* grown in turbidostat cage cultures. **Marine Ecology Progress Series**, v. 77, p. 4717-4722, 2008.
- LOURENÇO, S. O. Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações. 1ed. São Paulo: Rima, 606p, 2006.
- MAHASNEH, I. A. production of single cell protein from five strains of the microalga *Chlorella sp* (Chlorophyta). **Cytobios**, v.90, p.153-161, 1997.
- MALCATA, X.F.; GUEDES, A.C.; AMARO, H.M. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel, **Applied Energy**, v. 88, p. 3402-3410, 2011.
- MALIS-ARAD, S.; FRIEDLANDER, M.; BEN-ARIE R.; RICHMOND, A. E. Alkalinity-induced aggregation in *Chlorella vulgaris* I. Changes in cell volume and cell-wall structure. **Plant and Cell Physiology**, v.21, n.1, p.27-35, 1980.
- MANDALAM, R. K.; PALSSON, B. O. Elemental balancing of biomass and medium composition enhances growth capacity in high density *Chlorella vulgaris*. **Biotechnology Letters**, v.17, p.225-228, 1995.
- MATA, T.M.; MARTINS, A.A. CAETANO, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, p. 217-232, 2010.
- MENG, XIN, et al.; Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, v. 23, p. 1537-1546, 2001.
- MIAO, X.; WU, QY. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. **Journal of Biotechnology**, v.110, p.85-93, 2004.
- MIAO, XL.; WU, QY. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresour Technol**, v. 6, p.97 – 841, 2006.
- MOHAMED, A.M.; MARAQA, M.; AL HANDHALY, J. Impact of land disposal of reject brine from desalination plants on soil and groundwater. **Desalination**, v. 182,p-411-433, 2005.
- MORIST, A.; MONTESINOS, J.L.; CUSIDÓ, J.A.; GÓDIA, F. Recovery and treatment of *Spirulina platensis* cells cultured in a continuous photobioreactor to be used as food. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 535-547, 2001.
- OGBONNA, J. C.; TANAKA, H. Night biomass loss and changes in biochemical composition of cells during light/dark cyclic culture of *Chlorella pyrenoidosa*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.82, n.6, p.558-564, 1996.

- OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v.20, p.459-466, 2003.
- OLIVEIRA, E.M.; BARROS, S.L. Unidades de dessalinização d'água – Experiência Pioneira no Semi-árido Nordeste do Estado do Rio Grande do Norte, 20º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Rio de Janeiro, Anais Eletrônico II-046, 1999.
- OLIVEIRA, H. T. **Utilização de vinhaça como meio de cultura para *Chlorella vulgaris***. 1988. 146 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1988.
- PENTEADO, D.M.R.; Estudos de otimização do meio de cultura para microalga *phaeodactylum tricornutum* para produção de lipídios, **Dissertação** (mestrado em Bioquímica), p 114, UFPR, Curitiba, 2010.
- PEQUENO, M.A.G.; Avaliação do potencial produtivo de óleos obtidos a partir de microalgas por cromatografia gasosa, **Dissertação** (mestrado em Química), p. 54 UFPPB, João Pessoa, PB, 2010.
- PHUKAN, M.M.; CHUTIA, S.R.; KONWAR, K.B.; KATAKI, R. Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock, **Applied Energy**, 2011.
- PILAT B. Practice of water desalination by electro dialysis. **Desalination**, v. 139, p. 385-392, September 2001.
- PINHO, M. A. Meio de Cultivo a base de concentrado de dessalinização obtido por osmose inversa para *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensi*. **Dissertação** (Mestrado em Ciências do Alimento) 84p, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.
- PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, V. 65, p.635 -648, 2004.
- RAVEN, J. A. Sensing pH? **Plant, Cell and Environment**, v.13, p.721-729, 1990.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1992.
- RENAUD, S.M.; ZHOU, H.C.; PARRY, D.L.; THINH, L.V.; WOO, K.C. Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis sp.*, *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea*, and commercial species *Isochrysis sp.* (clone T, ISO). **Journal of applied Phycology**, v.7, p. 595-602, 2004.
- RICHMOND, A. **CRC Handbook of microalgal mass culture**. Flórida, 528p, 1990.
- RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004. 566p.
- RICHTER, C.A. Água métodos e tecnologia de tratamento. Editora Blucher. São Paulo. 337p, 2009.
- RIGANO, V. D. M.; VONA, V.; ESPORITO, S.; CARILLO, P.; CARFAGNA, S.; RIGANO, C. The physiological significance of light and dark NH<sub>4</sub><sup>+</sup> metabolism in *Chlorella sorokiniana*. **Phytochemistry**, v.47, p.177-181, 1998.
- ROCHE, J. L.; GLEIDER, R. J.; GRAZIANO, L. M.; MURRAY, H.; LEWIS, K. Introduction of specific protein in eukaryotic algae grown under iron-phosphorus or nitrogen-deficient conditions. **Journal of Phycology**, v.29, p.767-777, 1993.

- RODOLFI, I.; ZITTELLI, C.G.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BIONDI, C. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low cost photobioreactor. **Biotechnol Bioeng**, v 12, p100-102, 2009.
- RODRIGUES, J. B. R. Eficiência do crescimento da microalga *Chlorella minutissima* e sua aplicação em resíduos de suinocultura – Valorização e tratamento, 2000. 118p. **Tese** (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2000.
- RODULFO, B. R.; MARMOL, N. H. R.; EMRALINO, G. A. Production of *Chlorella* in clarified effluent from hog manure biogas digester. **Phillipp Journal Science**, v.109, p.51-58, 1980.
- ROUND, F. E. **Biologia das Algas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1983.
- RUYTERS, G. **Effects of blue light on enzymes**. In: Blue light effects in biological, Systems. Berlin, Springer-Verlag, p.283-301,1984.
- SALINAS, D. H. L.; MICHEL, J. P.; RAMINEZ, L. F.B.; MACHUCA, C. G. **Manual de metodologia y alternativas para el cultivo de microalgas** – Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Enseada Universidade Autónoma de Baja California, Faculdade de Ciências Marinhas Enseada, B. C., 1986.
- SAMUELSSON, G.; LONNEBORG, A.; ROSENQVIST, E.; GUSTAFSSON, P.; OQUIST, G. Photoinhibition and reactivation of photosynthesis in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. **Plant Physiology**, v.79, p. 992-995, 1985.
- SÁNCHEZ, S.; MARTÍNEZ, M. E.; ESPEJO, M. T. PACHECO, R.; ESPINOLA, F.; HODAIFA, G. Mixotrophic culture of *Chlorella pyrenoidosa* with olive-mill wastewater as the nutrient medium. **Journal of Applied Phycology**, v. 13, p.443–449, 2001.
- SANTOS, L.B.G.; CALAZANS, N.K.F.; MARINHO, Y.F.; SANTOS, A.P.F.; NASCIMENTO, R.D.M.; VASCONCELOS, R.F.L.; MACÊDO, D.M.; GALVEZ, A.O. Influência do fotoperíodo no crescimento da *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae) visando produção de biodiesel. p.3, 2010.
- SANTOS, G.M.; MACEDO, R.V.T.; ALEGRE, R.M. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina máxima* em duas temperaturas – Parte – I: Alteração da composição da biomassa. *Ciência e tecnologia em alimentos*, v. 23, p 17-21, Campinas, 2003.
- SCHENK, P.M.; STEPHENS, E.; MARX, U.C.; MUSSGNUM, J.H.; POSTEN, C. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. **Bioenerg**, v 1, p-20-43, 2008.
- SHELEF, G.; SOEDER, C. J **Algae Biomass: production and use**. Amsterdam: Elsevier-North Holland Biomedical, 852.p 1980
- SILVA, S.K; Sistema de dessalinização da comunidade de Uruçu – São João do Cariri – PB: Análises, Monitoramento e Avaliação de um misturador para o uso do concentrado. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Química), UFCG, Campina Grande – PB, 2008.
- SIPAÚBA-TAVARES, L. H. **Limnologia aplicada à aquicultura**. Boletim Técnico, n.1, Jaboticabal: FUNEP, 1995.

- SIRON, R.; GIUSTI, G.; BERLAND, B. Changes in the fatty acid composition of *Phaeodactylum tricorutum* and *Dunaliella tertiolecta* during growth and under phosphorus deficiency. **Marine Ecology Progress Series**, v. 55, p. 95-100, 1989.
- SOARES, D.; Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídios de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo, **Dissertação** (mestrado em bioquímica), UFPR, Curitiba, p 107, 2010.
- SOUZA, W. Artigo originalmente publicado no Monitor Mercantil, 25/08/2008. Disponível em: <http://www.ecodebate.com.br/index.php/2008/08/28/microalgas-e-a-producao-de-biodiesel-artigo-de-wanderley-de-souza/>. Acesso em 08 set.2008.
- SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.101, p. 87-96, 2006.
- SRIHARAN, S.; BAGGA D.; SRIHARAN, T.P. Effects of nutrients and temperature on Lipid and Fatty Acid Production in the Diatom *Hantzshia* DI – 60. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 24, p. 309-316, 1990.
- SUASSUNA, J. Potencialidades hídricas do nordeste brasileiro. **Parcerias Estratégicas**, n.20, p. 119-144, 2005.
- TEIXEIRA, C. M.; MORALES, M. E., Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel p.91 – 96 disponível em [www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2006/agricultura/MicroalgaComo.pdf](http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2006/agricultura/MicroalgaComo.pdf), Acesso em: 08 set. 2008.
- THOMPSON, P.A.; GUO, MING-XIN.; HARRISON, P.J. Effects of variation in temperature: On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton. **Journal of Phycology**, v.28, p. 481-488, 1992.
- TRAVIESO, L.; BENÍTEZ, F.; SÁNCHEZ, E.; BORJA, R.; MARTÍN, A.; COLMENAREJO, M. F. Batch mixed culture of *Chlorella vulgaris* using settled and diluted piggery waste. **Ecological Engineering**, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em : 30 ago. 2006.
- TUKAJ, Z., MATUSIAK-MIKULIN, K., LEWANDOWSKA, J., SZURKOWSKI, J. Changes in the pigment patterns and the photosynthetic activity during a light-induced cell cycle of the green algae *Scenedesmus armatus*. **Plant Physiology and Biochemistry**. v.41, p.337–344, 2003.
- UEDA, R.; HIRAYAMA S.; SUGATAK.; NAKAYAMA H. Process for the production of ethanol from microalgae. U.S. patent, 1998.
- UMINO, Y.; SATOH, A.; SHIRAIWA, Y. Factors controlling induction of external carbonic anhydrase and change in  $K_{1/2}$  ( $\text{CO}_2$ ) of photosynthesis in *C. vulgaris*. **Plant and Cell Physiology**, v. 32, p.379-384, 1991.
- VASCONCELOS, R.F.L.; SANTOS, A.P.F.; MARINHO, Y.F.; GÁLVEZ, A.O.; Avaliação do crescimento de três microalgas: *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans* e *Chlorella sp.*, visando à utilização como biocombustíveis, p.3, 2010.
- VAZHAPILLY, R.; CHEN, F. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid production potential of microalgae and their heterotrophic growth. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 75 p- 393-400, 1998.

WAGNER, J., **Membrane Filtration Handbook – Practical Tips and Hints**. Osmosnics, 2 Ed. Revision 2, 2001, p.10.

WEIER, T. E.; STOCKING, C. R.; BARBOUR, M. G.; ROST, T. L. Botany: An introduction to plant biology. Editora Wiley, 1982, 720p.

WEISSMAN, J.; GOEBEL, R.P; BENEMANN, J.R. Photobioreactor desing: mixing,

WOLKMAN, H.; IMIANOVSKI, U.; OLIVEIRA, J.L.B.; SANT'ANNA, E.S.- Cultivation of *Arthrospira (spirulina) platensis* in desalinator wastewater and salinated synthetic medium: Protein content and amino-acid profile. **Brazilian journal of Microbiology**. (39):1, p.98-101.2008

WONG, M. H.; LAY, C. C. The comparison of soybean wastes using tea leaves and sewage sludge for growing *Chlorella pyrenoidosa*. **Environmental Pollution**, v.23, p.247-259, 1980.

WU, H.; GAO, K.; VILLAFANE, V.E.; WATANABE, T.; HELBLING, E. W. Effectts of solar UV radiation on morphology and photosynthesis of the filamentous cyanobacterium *Arthrospira platesis*, Apllied Environmental Microbiology, v.71, p. 5004 – 5013, 2005.

## ANEXO A - LAUDO DO LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA EM DESSALINIZAÇÃO



### LABDES

Laboratório de Referência em Dessalinização

Laudo N <sup>o</sup> .:/2010	Data da Coleta: 21/09/2010
Interessado: Weruska	Resp. pela Coleta: Interessado
Município:	Data da Entrega da Amostra: 21/09/2010
Localidade:	Tipo de Recipiente: Garrafa plástica
Procedência: Concentrado	Data da Análise: 28/09/2010

PARÂMETROS	RESULTADOS	VMP (*)
Condutividade Elétrica, µmho/cm a 25 °C	5.690,0	---
Potencial Hidrogeniônico, pH	8,1	6,0 a 9,5
Turbidez, (uT)	0,5	5,0
Cor, Unidade Hazen (mg Pt-Co/L).	0,0	15,0
Dureza em Cálcio (Ca <sup>++</sup> ), mg/L	145,0	---
Dureza em Magnésio (Mg <sup>++</sup> ), mg/L	172,2	---
Dureza Total (CaCO <sub>3</sub> ), mg/L	<b>1.080,0</b>	500,0
Sódio (Na <sup>+</sup> ), mg/L	<b>723,8</b>	200,0
Potássio (K <sup>+</sup> ), mg/L	15,0	---
Alumínio (Al <sup>3+</sup> ), mg/L	0,00	0,2
Ferro Total, mg/L	0,05	0,3
Alcalinidade em Hidróxidos, mg/L (CaCO <sub>3</sub> )	0,0	---
Alcalinidade em Carbonatos, mg/L (CaCO <sub>3</sub> )	140,0	---
Alcalinidade em Bicarbonatos, mg/L (CaCO <sub>3</sub> )	398,0	---
Alcalinidade Total, mg/L (CaCO <sub>3</sub> )	538,0	---
Sulfato (SO <sub>4</sub> <sup>-</sup> ), mg/L	102,1	250,0
Cloreto (Cl <sup>-</sup> ), mg/L	<b>1.418,2</b>	250,0
Nitrato (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ), mg/L	0,49	10,0
Nitrito (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ), mg/L	0,12	1,0
Amônia (NH <sub>3</sub> ), mg/L	1,35	1,5
Silica, mg/L (SiO <sub>2</sub> )	82,4	---
ILS (Índice de Saturação de Langelier)	1,35	≤ 0
Total de Sólidos Dissolvidos Secos a 180°C, mg/L	3.410,0	1.000,0

(\*)VMP - Valor Máximo Permissível ou recomendável pela Legislação Brasileira (PORTARIA 518/04 MS).

<p><b>LAUDO:</b> De acordo com os resultados analíticos acima relacionados, esta água se encontra dentro dos padrões de potabilidade no que se refere aos parâmetros físico-químicos. <b>**Sugere-se uma análise bacteriológica.</b></p> <p><b>OBSERVAÇÕES:</b> 1- Os resultados se referem única e exclusivamente à amostra de água analisada neste laboratório. 2- Os dados de identificação da amostra foram fornecidos pelo interessado.</p> <p>A divulgação dos resultados desta análise, assim como sua utilização para quaisquer fins, é de exclusiva responsabilidade do interessado.</p> <p>Eng. Químico Responsável: Prof. Kepler B. França (CRQ – 9.19.3.1303118)</p> <p>Visto da Coordenação: Prof. Kepler B. França <span style="float: right;">Data: 07/09/2010</span></p>
--


**LABDES**

Laboratório de Referência em Dessalinização

Laudo N°.: 09-SD/2010	Data da Coleta: 16/06/10
Interessado: LABDES/UFCC	Resp. pela Coleta: Interessado
Município: S.J do CARIRI	Data da Entrega da Amostra: 16/06/10
Localidade: URUCU	Tipo de Recipiente: Garrafa Plástica
Procedência: POÇO	Data da Análise: 16/06/10

PARÂMETROS	Alimentação	VMP (*)
Condutividade Elétrica, $\mu\text{mho/cm}$ a 25 °C	3.010,0	---
Potencial Hidrogeniônico, pH	7,3	6,5 a 8,5
Turbidez, (uT)	0,7	1,0 a 5,0
Cor, Unidade Hazen (mg Pt-Co/L).	0,0	15,0
Dureza em Cálcio, mg/L $\text{Ca}^{++}$	74,0	---
Dureza em Magnésio, mg/L $\text{Mg}^{++}$	77,2	---
Dureza Total, mg/L $\text{CaCO}_3$	506,5	500,0
Sódio, mg/L $\text{Na}^+$	464,0	200,0
Potássio, mg/L $\text{K}^+$	7,0	---
Alumínio ( $\text{Al}^{3+}$ ), mg/L	0,00	0,2
Ferro Total, mg/L	0,05	0,3
Alcalinidade em Hidróxidos, mg/L $\text{CaCO}_3$	0,0	---
Alcalinidade em Carbonatos, mg/L $\text{CaCO}_3$	22,4	---
Alcalinidade em Bicarbonatos, mg/L $\text{CaCO}_3$	343,2	---
Alcalinidade Total, mg/L $\text{CaCO}_3$	365,6	---
Sulfato, mg/L $\text{SO}_4^{--}$	0,0	250,0
Cloreto, mg/L $\text{Cl}^-$	720,7	250,0
Nitrato, mg/L $\text{NO}_3^-$	0,00	10,0
Nitrito, mg/L $\text{NO}_2^-$	0,01	1,0
Amônia ( $\text{NH}_3$ ), mg/L	0,59	1,3
Silica, mg/L $\text{SiO}_2$	48,2	---
ISL (Índice de Saturação de Langelier)	0,08	$\leq 0$
Total de Sólidos Dissolvidos Secos a 180°C, mg/L	1.823,8	1.000,0

(\*)VMP - Valor Máximo Permissível ou recomendável pela Legislação Brasileira (PORTARIA 518/04 MS).

**LAUDO:**

De acordo com a Legislação Brasileira em vigor, os resultados analíticos das amostras de águas são os seguintes:

- (a) a água da alimentação e do concentrado não se encontram dentro dos parâmetros permissíveis de potabilidade;  
 (b) a água do permeado encontra-se dentro dos padrões de potabilidade;

**OBSERVAÇÕES:**

- 1- Os resultados se referem única e exclusivamente à amostra de água analisada neste laboratório.
- 2- Os dados de identificação da amostra foram fornecidos pelo interessado.

A divulgação dos resultados desta análise, assim como sua utilização para quaisquer fins, é de exclusiva responsabilidade do interessado.

Eng. Químico Responsável: Prof. Kepler B. França (CRQ - 01.303.119)

Visto da Coordenação: Prof. Kepler B. França

Data: 2010