



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
ENGENHARIA QUÍMICA



**PRODUÇÃO DE BIO-ÓLEO EMPREGANDO MICROALGAS EM  
DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO**

*Wesley da Silva Borges*

UBERLÂNDIA - MG  
2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**



**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
ENGENHARIA QUÍMICA**

**PRODUÇÃO DE BIO-ÓLEO EMPREGANDO MICROALGAS EM  
DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO**

*Wesley da Silva Borges*

Orientadoras:

Dra. Vicelma Luiz Cardoso

Dra. Miriam Maria de Resende

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos

**UBERLÂNDIA - MG  
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

B732p Borges, Wesley da Silva, 1985-  
2014 Produção de bio-óleo empregando microalgas em diferentes meios  
de cultivo / Wesley da Silva Borges. - 2014.  
82 f. : il.

Orientadora: Vicielma Luiz Cardoso.  
Coorientadora: Miriam Maria de Resende  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa  
de Pós-Graduação em Engenharia Química.  
Inclui bibliografia.

1. Engenharia Química - Teses. 2. Microorganismos - Alga - Teses.  
3. *Scenedesmus sp.* - Teses. 4. Biocombustíveis - Teses. I. Cardoso,  
Vicielma Luiz. II. Resende, Miriam Maria. III. Universidade Federal de  
Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.  
IV. Título.

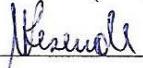
CDU: 66.0

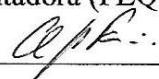
---

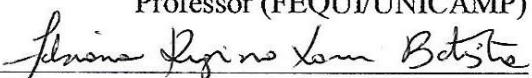
**TESE DE DOUTORADO DE WESLEY DA SILVA BORGES SUBMETIDA AO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS  
NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM ENGENHARIA  
QUÍMICA, EM 08/08/2014.**

**BANCA EXAMINADORA:**

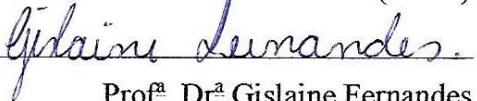
  
\_\_\_\_\_  
Profª. Drª Vicelma Luiz Cardoso  
Orientadora (FEQUI/UFU)

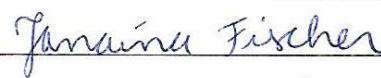
  
\_\_\_\_\_  
Profª. Drª Mirjam Maria de Resende  
Orientadora (FEQUI/UFU)

  
\_\_\_\_\_  
Profº. Dr. Elias Basile Tambourgi  
Professor (FEQUI/UNICAMP)

  
\_\_\_\_\_  
Profª. Drª Fabiana Regina Xavier Batista  
Professora (FEQUI/UFU)

  
\_\_\_\_\_  
Profª. Drª Cláudia Maria Tomás Melo  
Professora (IFTM)

  
\_\_\_\_\_  
Profª. Drª Gislaine Fernandes  
Professora (IFTM)

  
\_\_\_\_\_  
Drª Janaína Fischer  
Pós-Doutoranda (CNPQ - FEQUI/UFU)

A minha noiva, todos os familiares que sempre torceram para meu sucesso, e  
aos colegas que contribuíram para a conclusão deste Curso.

---

## AGRADECIMENTOS

---

A Deus.

Aos familiares, em especial aos meus pais João e Célia por terem me dado todo apoio possível, ao meu irmão Wanderson e à minha noiva Ludimila Marques pelo apoio e compreensão.

Às orientadoras Profª. Drª. Vicelma Luiz Cardoso e Profª. Drª. Miriam Maria de Resende por toda a orientação, paciência e dedicação ao longo de todo o Curso.

Ao Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho pela ajuda nas diversas leituras sobre o tema.

Aos colegas de Curso.

Aos alunos de iniciação científica Breno Araújo e Lucas Gomes Moura, que tanto ajudaram na realização dos experimentos.

Aos servidores da FEQUI.

Ao Programa de Pós-Graduação FEQUI, CAPES e CNPQ Brasil.

A FAPEMIG/VALE pelo apoio financeiro para realização da pesquisa.

Ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em especial aos professores Dr. Jorge Otávio Trierweiler, Dr. Marcelo Farenzena, e todos os pesquisadores do Grupo de Intensificação, Modelagem, Simulação, Controle e Otimização de Processos (GIMSCOP) que me receberam de braços abertos em seu departamento e deram apoio necessário para o início das atividades com microalgas.

Ao professor. Dr. Roberto Bianchini Derner, do Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina pela recepção no Laboratório de Cultivo de Algas e informações relevantes.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram na realização deste trabalho.

*“Abençoemos aqueles que se preocupam conosco, que nos amam, que nos atendem as necessidades... Valorizemos o amigo que nos socorre, que se interessa por nós, que nos escreve, que nos telefona para saber como estamos indo... A amizade é uma dádiva de Deus... Mais tarde, haveremos de sentir falta daqueles que não nos deixam experimentar a solidão.”*

(Chico Xavier)

---

---

## SUMÁRIO

---

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	i
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	iii
<b>LISTA DE SÍMBOLOS.....</b>	vi
<b>RESUMO.....</b>	vii
<b>ABSTRACT.....</b>	viii
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO .....</b>	1
<b>CAPÍTULO 2: OBJETIVOS .....</b>	4
2.1 – GERAL .....	4
2.2 – ESPECÍFICOS .....	4
<b>CAPÍTULO 3: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	5
3.1 - DEFINIÇÃO DE MACRO E MICROALGAS.....	5
3.2 - BIO-ÓLEO .....	6
3.3 - BIODIESEL E ÓLEO DE MICROALGAS .....	6
3.4 CLASSIFICAÇÕES DAS MICROALGAS .....	7
3.4.1 – <i>Diatomáceas</i> .....	7
3.4.2 – <i>Algas verdes azuladas</i> .....	8
3.4.3 – <i>Algas verdes</i> .....	8
3.4.4 – <i>Algas douradas</i> .....	8
3.5 - O CULTIVO DE MICROALGAS .....	8
3.5.1 – <i>Scenedesmus sp.</i> .....	14
3.5.2 – <i>Chlorella sp.</i> .....	15
3.5.3 – <i>Spirulina sp.</i> .....	15
3.5.4 – <i>Nannochloropsis oculata</i> . .....	16
3.5.5 – <i>Dunaliela salina</i> .....	16

3.5.6 – <i>Haematococcus pluvialis</i> .....	16
3.6 - FATORES QUE INTERFEREM NO CRESCIMENTO DAS MICROALGAS .....	17
3.6.1 – <i>CO<sub>2</sub></i> para desenvolvimento das microalgas .....	18
3.7 - RELAÇÃO ENTRE NUTRIENTES E CRESCIMENTO DAS MICROALGAS .....	19
3.7.1 – Macronutrientes .....	20
3.7.2 – Micronutrientes .....	21
3.8 – PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS .....	22
<b>CAPÍTULO 4: MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
4.1 - MICROALGAS .....	25
4.2 – UNIDADE EXPERIMENTAL E MEIO DE CULTIVO .....	26
4.2.1 - Meio de cultivo para <i>Scenedesmus sp.</i> .....	28
4.2.2 - Meio de cultivo para <i>Spirulina platensis</i> e <i>Chlorella sp.</i> .....	28
4.2.3 - Meio de cultivo para <i>Nannochloropsis oculata</i> . ....	29
4.3 - TESTES PRELIMINARES .....	29
4.3.1 - Comportamento de diferentes espécies de microalgas em relação ao teor de lipídeos e biomassa .....	29
4.3.2 - Produção de lipídeos e biomassa pela microalga <i>Scenedesmus sp.</i> em reatores abertos – tipo bandeja.....	30
4.3.3 - Avaliação do teor lipídico e biomassa em reatores tipo bandeja aberto e coberto com filme PVC em diferentes tempos de cultivo .....	30
4.3.4 – Idade do Inóculo .....	31
4.3.5 - Perfil do tempo de realização dos experimentos e perfis do teor de lipídeos, oxigênio dissolvido e demanda química de oxigênio durante o crescimento da microalga <i>Scenedesmus sp.</i> .....	31
4.3.6 - Inserção de vitaminas no meio de cultivo da microalga <i>Scenedesmus sp.</i> em reatores verticais em acrílico .....	32
4.4-ESTUDO DA VARIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DOS MACRONUTRIENTES NO MEIO DE CULTIVO.....	32
4.5- ESTUDO DA VARIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DOS MICRONUTRIENTES NA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS .....	33
4.6- OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SULFATO DE ZINCO E CLORETO DE MANGANÊS.....	35
4.7 - MÉTODOS ANALÍTICOS .....	39

4.7.1 - Determinação de biomassa através de espectroscopia.....	39
4.7.2 - Intensidade Luminosa .....	39
4.7.3 - Determinação do peso seco da biomassa.....	39
4.7.4 - Quantidade de óleo e Teor lipídeos.....	39
4.7.5 - Oxigênio dissolvido (OD) e Demanda Química de Oxigênio (DQO) .....	41
 <b>CAPÍTULO 5: RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
5.1 – PRODUÇÃO DE BIOMASSA A PARTIR DO CRESCIMENTO DAS MICROALGAS.....	42
5.2 - COMPORTAMENTO DE DIFERENTES ESPÉCIES DE MICROALGAS EM RELAÇÃO AO TEOR DE LIPÍDEOS E BIOMASSA .....	45
5.3 - PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS E BIOMASSA PELA MICROALGA <i>Scenedesmus sp.</i> EM REATORES ABERTOS – TIPO BANDEJA – COM MENOR TEMPO DE CULTIVO E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE INÓCULO .....	46
5.4 - AVALIAÇÃO DO TEOR LIPÍDICO E BIOMASSA EM REATORES TIPO BANDEJA ABERTO E COBERTO COM FILME PVC EM DIFERENTES TEMPOS DE CULTIVO .....	47
5.5 - IDADE DO INÓCULO .....	50
5.6 - PERFIL DO TEMPO DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS E PERFIS DO TEOR DE LIPÍDEOS, OXIGÊNIO DISSOLVIDO E DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO DURANTE O CRESCIMENTO DA MICROALGA <i>Scenedesmus sp.</i> .....	51
5.7 - INSERÇÃO DE VITAMINAS NO MEIO DE CULTIVO DA MICROALGA <i>Scenedesmus sp.</i> EM REATORES VERTICais EM ACRÍLICO .....	53
5.8- VARIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DOS MACRONUTRIENTES NO MEIO DE CULTIVO .....	54
5.9 -ESTUDO DA VARIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DOS MICRONUTRIENTES NA PODUÇÃO DE LIPÍDEOS .....	56
5.10 – OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ZnSO <sub>4</sub> E MnCl <sub>2</sub> .....	58
5.10.1 - Análise estatística a resposta Teor de Lipídeos, quantidade de óleo produzido e biomassa seca .....	59
5.10.2 - Reprodutibilidade nas melhores condições experimentais do PCC .....	67
 <b>CAPÍTULO 6: CONCLUSÕES .....</b>	<b>69</b>
 <b>CAPÍTULO 7: SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>70</b>

CAPÍTULO 8: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	71
CAPÍTULO 9: APÊNDICES .....	79
APÊNDICE 1: ESPECTROSCOPIA VISÍVEL - RELAÇÃO ENTRE ABSORBÂNCIA E PESO SECO – CURVA DE CALIBRAÇÃO <i>Scenedesmus sp</i> .....	79
APÊNDICE 2:ESPECTROSCOPIA VISÍVEL - RELAÇÃO ENTRE ABSORBÂNCIA E PESO SECO – CURVA DE CALIBRAÇÃO <i>Nannochloropsis oculata</i> .....	80
APÊNDICE 3:ESPECTROSCOPIA VISÍVEL - RELAÇÃO ENTRE ABSORBÂNCIA E PESO SECO – CURVA DE CALIBRAÇÃO <i>Chlorella sp.</i> .....	81
APÊNDICE 4 - ESPECTROSCOPIA VISÍVEL - RELAÇÃO ENTRE ABSORBÂNDIA E PESO SECO – CURVA DE CALIBRAÇÃO <i>Spirulina platensis</i> .....	82

---

## LISTA DE FIGURAS

---

Fig. 3.1 - Comportamento do crescimento de microalgas em relação ao tempo de cultivo.....	9
Fig. 3.2 – Cultivo de microalgas em lagoas abertas .....	10
Fig. 3.3 – Formação de produtos a partir da biomassa de algas .....	12
Fig.4.1 – Fluxograma etapas do trabalho.....	25
Fig.4.2 – Incubadora: Banco de algas .....	26
Fig. 4.3 –Unidade experimental de produção de bio-óleo por microalgas .....	27
Fig. 4.4 - Reator aberto (tipo bandeja) com cultivo da microalga <i>Scenedesmus sp.</i> .....	30
Fig.4.5 – Extração de lipídeos em evaporador rotativo .....	41
Fig. 5.1 – Curva de para crescimento da <i>Scenedesmus sp.</i> .....	42
Fig. 5.2 – Curva de para crescimento da <i>Nannochloropsis oculata</i> .....	43
Fig. 5.3 – Curva de para crescimento da <i>Chlorella sp.</i> .....	44
Fig. 5.4 – Curva de para crescimento da <i>Spirulina platensis</i> .....	44
Fig. 5.5 – Reatores de bandeja coberto com filme PVC .....	48
Fig. 5.6 – Acompanhamento de O <sub>2</sub> dissolvido em reator de bandeja aberto .....	49
Fig. 5.7 – Acompanhamento de O <sub>2</sub> dissolvido em reator de bandeja coberto com filme PVC.....	49
Fig. 5.8 – Reatores em acrílico na forma retangular vertical.....	50
Fig. 5.9 – Perfis do teor de lipídeos (%), concentração da biomassa (g/L), DQO (mgO <sub>2</sub> /L) e oxigênio dissolvido (mgO <sub>2</sub> /L) em função do tempo de processo .....	52
Fig. 5.10 - Perfis do teor de lipídeos (%), concentração da biomassa (g/L), DQO (mgO <sub>2</sub> /L) e oxigênio dissolvido (mgO <sub>2</sub> /L) em função do tempo de processo para reatores verticais em acrílico com vitaminas inseridas .....	54
Fig. 5.11 - Distribuição dos resíduos em função dos valores preditos relativo ao teor de lipídeos .....	61
Fig. 5.12 - Valores preditos em função dos observados para o teor de lipídeos .....	61

Fig. 5.13 - Distribuição dos resíduos relativo à biomassa .....	62
Fig. 5.14 - Valores preditos em função dos observados relativos à biomassa .....	62
Fig. 5.15 - Superfície de resposta para o teor de lipídeos em relação à concentração ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O e concentração de MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O .....	64
Fig. 5.16 - Curvas de contorno para o teor de lipídeos em relação à concentração ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O e concentração de MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O .....	64
Fig. 5.17 – Curvas de contorno para a quantidade de óleo produzido em relação à concentração ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O e concentração de MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O .....	65
Fig. 5.18 - Superfície de resposta para a biomassa em relação à concentração ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O e concentração de MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O .....	66
Fig. 5.19 - Curvas de contorno para a biomassa em relação à concentração ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O e concentração de MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O .....	66
Fig. 9.1 – Relação entre a absorbância e peso seco para a alga <i>Scenedesmus sp.</i> .....	79
Fig. 9.2 – Relação entre a absorbância e peso seco para a alga <i>Nannochloropsis oculata</i> .....	80
Fig. 9.3 – Relação entre a absorbância e peso seco para a alga <i>Chlorella sp.</i> .....	81
Fig. 9.4 – Relação entre a absorbância e peso seco para a alga <i>Spirulina platensis</i> .....	82

---

**LISTA DE TABELAS**

---

Tab. 3.1 – Comparativo entre rendimento anual de óleo para produção à partir de microalgas e plantas oleaginosas .....	6
Tab. 3.2 – Vantagens e desvantagens dos sistemas de cultivo das microalgas .....	11
Tab. 3.3 – Principais estudos com a microalga <i>Scenedesmus sp.</i> .....	14
Tab. 4.1 - Composição do meio Guillard modificado .....	28
Tab. 4.2 - Composição do meio de cultivo W.C. ....	28
Tab. 4.3 - Composição do meio de cultivo f/2 .....	29
Tab. 4.4:- Composição da solução de vitaminas inseridas no meio de cultivo da <i>Scenedesmus sp.</i> .....	32
Tab. 4.5 – Concentrações dos macronutrientes testadas .....	33
Tab. 4.6 - Composição do meio para teste dos micronutrientes .....	34
Tab. 4.7 – Concentrações dos micronutrientes testadas .....	35
Tab. 4.8 - Matriz do planejamento composto central .....	36
Tab. 4.9 – Matriz do planejamento composto central com valores reais para concentrações de ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O e MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O .....	38
Tab. 5.1 – Teor de lipídeos, quantidade de óleo produzido e biomassa seca das microalgas <i>Scenedesmus sp.</i> , <i>Spirulina platensis</i> , <i>Nannochloropsis oculata</i> e <i>Chlorella sp.</i> durante 30 dias de cultivo, em fotobiorreatores planos verticais em acrílico .....	45
Tab. 5.2 – Teor de lipídeos, quantidade de óleo produzido e biomassa da microalga <i>Scenedesmus sp.</i> com diferentes concentrações de inóculo e 12 dias de cultivo em reator do tipo bandeja aberto.....	46
Tab. 5.3 – Resultados para teor de lipídeos, quantidade de óleo produzido e biomassa em reatores de bandeja (aberto e coberto) com 12 e 24 dias de cultivo. ....	47
Tab 5.4- Resultados para teor de lipídeos, quantidade de óleo produzido e biomassa para inóculos de diferentes idades para <i>Scenedesmus sp.</i> .....	51

Tab. 5.5 – Resultado para o teor de lipídeos, quantidade de óleo produzido e biomassa para cada experimento em função das concentrações dos macronutrientes .....	55
Tab. 5.6 - Teste com alteração simultaneamente em $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{MgSO}_4$ .....	56
Tab. 5.7 – Resultados para o teor de lipídeos, quantidade de óleo produzido e biomassa para cada experimento em função das concentrações dos micronutrientes. ....	57
Tab. 5.8 – Reprodutibilidade dos experimentos em função da concentração de $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .....	58
Tab. 5.9 - Resultados do planejamento composto central em relação à concentração de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . ....	59
Tab. 5.10 - Comparativo entre os resultados dos pontos centrais do PCC e reprodução do melhor ponto na condição otimizada.....	68

---

## LISTA DE SÍMBOLOS

---

- $\mu\text{g}$  – Micrograma
- ABS – Valor da leitura em absorbância
- ATP – Adenosina tri-fosfato
- COT – Carbono orgânico total
- DQO – Demanda química de oxigênio
- K – Número de variáveis estudadas no planejamento experimental
- PCC – Planejamento composto central
- $R^2$  - Coeficiente de determinação
- $t$  - t de Student
- vvm - volume de ar por minuto pelo volume do líquido
- $X_{+1}$  - Valor da variável no nível superior
- $X_0$  - Valor da variável no ponto central
- $X_{-1}$  - Valor da variável no nível inferior
- $X_n$  = valor codificado da variável ( $n = 1, 2, \dots$ )

---

## RESUMO

---

As microalgas são organismos fotossintetizantes, microscópicos e unicelulares, presentes tanto nos meios aquáticos como no solo. Apresentam produtividade superior a de plantas oleaginosas, sendo cerca de 89,9% em relação a palma e 99,2% em relação a soja. E produzem um bio-óleo que pode ser classificado como matéria-prima para produção de biocombustíveis. A utilização de microalgas para produção de bio-óleo pode ser uma potencial alternativa econômica em relação à outras fontes de combustíveis. Os cultivos das microalgas ocorrem em lagoas abertas ou em sistemas de fotobiorreatores. A biomassa de microalga pode ser destinada às mais diversas aplicações, tais como a produção de lipídeos e uso em biofertilizantes. Neste trabalho avaliou-se a produção de bio-óleo empregando a microalga *Scenedesmus sp.* em meio fermentativo contendo sais. A microalga *Scenedesmus sp.* foi escolhida entre as microalgas *Spirulina platensis*, *Nannochoropsis oculata* e *Chlorella sp.*, pela boa produção de óleo, não necessidade de adição de vitaminas no meio e facilidade no cultivo por ser cultivada em água doce. O cultivo ocorreu em reatores planos verticais em acrílico, de volume útil 3 Litros, com sistema de aeração 0,7 vvm, climatizado a  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$  com iluminação artificial com 3 lâmpadas fluorescentes de 20 W, submetidas a fotoperíodo de 12 horas. Testes preliminares definiram que a melhor forma de cultivo da microalga *Scenedesmus sp.*, visando a produção de bio-óleo, foi utilizando inóculo de 10% do volume útil, com idade de 12 dias de cultivo, sem a adição de vitaminas, obtendo 0,121 g de óleo produzido por reator, teor de lipídeos de 18,15% e concentração de biomassa final em 0,221 g/L. Verificou-se que alterações na concentração dos macro e micronutrientes do meio proposto na literatura não favoreceram a produção do bio-óleo, exceto para os micronutrientes  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Avaliou-se a influência da concentração de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  em um planejamento composto central (PCC). A análise conjunta das variáveis por meio da análise do PCC e superfícies de resposta mostraram que a produção de lipídeos foi favorecida quando se trabalhou com 0,06 g/L de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 0,5 g/L de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , chegando em uma produção de 0,141 g de bio-óleo, teor de lipídeos de 47,5% e biomassa 0,099 g/L, representando uma melhora de 161,7% no teor de lipídeos e de 16,9% na quantidade de óleo produzida e redução de 55,32% na concentração de biomassa seca.

Palavras-chave: microalgas; lipídeos; *Scenedesmus sp.*; bio-óleo.

---

## ABSTRACT

---

Microalgae are photosynthetic unicellular microorganism present in aquatic environments and soil. Microalgae have more productivity than oilseeds, being approximately 89.9% over the palm and 99.2% compared to soybean. Microalgae produce a bio-oil that can be classified as a raw material for biofuel production. The use of microalgae to bio-oil production can be a potential economic alternative to other sources of fuel. The microalgae cultivate occur in open ponds or photobioreactors in systems. The microalgae biomass can be for the most diverse applications such as the production of lipids and use in biofertilizers. In this paper were evaluate the bio-oil production using the *Scenedesmus sp.* microalgae in fermentation medium containing salts. The *Scenedesmus sp.* was chosen from the microalgae *Spirulina platensis*, *Chlorella sp.* and *Nannochoropsis oculata*, good oil production, no need to add vitamins in the middle and ease in growing to be cultivated in fresh water. The cultivation occurred in vertical planes reactors in acrylic, useful volume 3 L with 0.7 vvm aeration system, temperatura  $23 \pm 1$  °C and artificial illumination with 3 fluorescent lamps of 20 W, subjected to a photoperiod of 12 hours. Preliminary tests determined that the best way of microalgae cultivate *Scenedesmus sp.*, in order to produce bio-oil, using inoculum was 10% of total volume, aged 12 days of culture without the vitamins addition, getting 0.121 g of oil produced per reactor, the lipid content of 18.15% and final biomass concentration at 0.221 g/L. It was found that changes in the concentration of macro-and micronutrients medium proposed in the literature do not favor the production of bio-oil, except for  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  and  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  micronutrients. Were evaluated the influence of the concentration of  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  and  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  in a central composite design (CCD). The joint analysis of the variables through the analysis of the CCD and response surfaces showed that the lipids production is favored when working with 0.06 g/L of  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  and 0.5 g/L  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ , reaching in a production of 0.141 g of bio-oil, lipid content of 47.5% and biomass 0.099 g/L, representing a 161.7% improvement in lipid content and 16.9% in volume oil produced and 55.32% reduction in the dry biomass concentration.

Keywords: algae; lipids; *Scenedesmus sp*; bio-oil.

---

## CAPÍTULO 1

### INTRODUÇÃO

---

A busca por fontes renováveis para a produção de biocombustíveis cresce a cada dia em nossa sociedade principalmente devido à problemas ambientais, como as emissões de gases oriundos da queima de combustíveis fósseis. O fornecimento limitado de petróleo como combustível exige a descoberta de novas fontes de energias alternativas, sendo renovável e sustentável, como os ácidos graxos extraídos de microalgas (HO *et al.*, 2012)

As microalgas são matérias-prima promissoras para a produção de biodiesel devido à sua alta taxa de crescimento e possuir altos rendimentos em lipídeos, além de uma capacidade para crescer em diferentes ambientes. Mas a elevada produção de lipídeos muitas vezes só é alcançada sob determinadas condições de estresse, que impedem o crescimento destas, proporcionando uma produção ideal de lipídeos. A utilização de microalgas para extração de bio-óleo pode ser uma potencial alternativa econômica em relação às outras fontes de combustíveis (BLATTI *et al.*, 2013).

Algumas espécies de microalgas podem ter um teor de lipídeos de até 60% de sua biomassa, porém essa quantidade geralmente é associada à fatores de estresse na produtividade da biomassa (HO *et al.*, 2012). Desta forma as microalgas ganham destaque por utilizarem a luz solar e converter dióxido de carbono em lipídeos e proteínas, sendo uma importante alternativa na biomitigação de dióxido de carbono, podendo também se tornar fonte de energia e biocombustíveis (AMIN, 2009; CHISTI, 2007).

Segundo Tomaselli (2004) as microalgas podem ser encontradas em todo o mundo e podem ser classificadas conforme sua pigmentação, constituição da parede celular, em relação à natureza química de seus produtos, forma de divisão nuclear e celular.

O emprego das microalgas tradicionalmente ocorre para geração de alimentos para a aquicultura, na produção de alevinos e na cultura do camarão. Além disso, devido à sua capacidade de assimilar nutrientes presentes na água, as microalgas podem ser utilizadas na biorremediação e tratamento de águas contaminadas, pois convertem energia solar em biomassa e incorporam nutrientes como o nitrogênio e o fósforo (ABDEL-RAOUF *et al.*, 2012).

A aplicação na área de tratamentos de águas contaminadas ou resíduos também é uma justificativa para se estudar o comportamento das microalgas. Segundo Brennan e Owende

(2010), a produção de biocombustíveis por microalgas junto com tratamento de resíduos é uma área biotecnológica em potencial aplicação comercial.

As microalgas apresentam três tipos de metabolismos distintos em relação à fonte de carbono que é disponível no meio de crescimento: apresentam um metabolismo autotrófico, em que na presença de luz junto a determinados sais minerais é capaz de fixar o dióxido de carbono; um metabolismo heterotrófico, em que a microalga precisa de uma fonte de carbono orgânica que esteja presente no meio de cultivo na ausência de luminosidade; e também apresentam um mecanismo mixotrófico, em que há o desenvolvimento conjunto de ambas as formas já citadas (AMARO *et al.*, 2011; ZHENG *et al.*, 2012). As características metabólicas das microalgas fazem com que elas apresentem uma importante fonte de recursos a serem exploradas. Junto ao metabolismo sintético, a respiração e a fixação de nitrogênio constituem rotas metabólicas ainda a serem exploradas (SUBRAMANIAN e THAJUDDIN, 2005).

Os sistemas de cultivos de microalgas são baseados em lagoas abertas ou em fotobiorreatores fechados e a viabilidade de cada sistema é influenciado de acordo com a microalga a ser cultivada (LOURENÇO, 2006).

Os fotobiorreatores, são sistemas fechados, proporcionando um ambiente mais protegido de contaminações do que as lagoas abertas, possibilitando um maior rendimento por unidade de área e volume e obtendo cultivos com maior grau de pureza em relação a menor contaminação por outros micro-organismos (LOURENÇO, 2006).

Com relação ao meio de cultivo de microalgas há diversas formulações que contemplam as suas necessidades nutricionais, precisando basicamente de macronutrientes, micronutrientes e vitaminas. Os macronutrientes apresentam a função de constituir as estruturas do meio intracelular, participando do processo de troca de energia e regulando atividades metabólicas, enquanto os micronutrientes participam da estrutura e atividade enzimática. Já as vitaminas, como a tiamina e biotina agem, respectivamente, como coenzima e transportadora de dióxido de carbono (LOURENÇO, 2006).

Várias microalgas, podem ser utilizadas em biorremediações, como a *Scenedesmus sp.* segundo Martinez *et al.* (2000). As microalgas utilizam carbono, energia luminosa e nutrientes para produzir sua biomassa, que pode ser utilizada para produção de biocombustíveis (MATA *et al.*, 2010).

A biomassa de microalga pode ser destinada às mais diversas aplicações, tais como a produção de lipídeos, corantes, enzimas, antibióticos, carboidratos e vitaminas. Por meio de diversos estudos em processos envolvendo metabolismo das microalgas, pesquisas buscam o

surgimento de novas espécies de microalgas capazes de gerar cada vez mais lipídeos e agregar valor à outros co-produtos (BLATTI *et al.*, 2013).

Os lipídeos das microalgas são constituídos de diferentes ácidos graxos saturados e insaturados (HUANG *et al.*, 2010). Ao final do processo de extração dos lipídeos das microalgas, a biomassa residual pode ainda ser utilizada como biofertilizantes devido à sua alta relação nitrogênio/fósforo (SINGH E GU, 2010).

Entre as justificativas de se trabalhar com microalgas está a vasta gama de aplicações que possuem, podendo variar conforme sua espécie, podendo serem utilizadas na biomitigação de dióxido de carbono por apresentarem atributos desejáveis para a fixação deste, pois apresentam altas taxas de crescimento e utilização de dióxido de carbono e também possibilidade de obtenção de uma biomassa valiosa para produção de biodiesel e sedimentação espontânea que facilita a retirada da biomassa (BRENNAN E OWENDE, 2010). Sobre os produtos metabólicos das microalgas, tem-se proteínas, carboidratos, ácidos nucléicos, vitaminas e lipídeos (DERNER *et al.*, 2006; MALLICK *et al.*, 2012; SPOLAORE *et al.*, 2006).

Por meio de diversos estudos em processos envolvendo metabolismo das microalgas, pesquisas buscam o surgimento de novas espécies de microalgas capaz de gerar cada vez mais lipídeos e agregar valor à outros co-produtos. A manipulação eficaz dos ácidos graxos de microalgas requer uma compreensão mais detalhada de todo o processo de formação, dessa forma, à medida que novas espécies surgem, estratégias para maximizar a produção de ácidos graxos são traçadas de modo a estudar a interação que ocorre entre a biossíntese de ácidos graxos e demais produtos das microalgas (BLATTI *et al.*, 2013).

---

## CAPÍTULO 2

### OBJETIVOS

---

#### **2.1 - GERAL**

Avaliar a produção de bio-óleo empregando microalgas em diferentes meios de cultivo.

#### **2.2 ESPECÍFICOS**

- Avaliar qual cepa de microalgas *Scenedesmus sp.*, *Nannochloropsis oculata*, *Spirulina platensis* e *Chlorella sp.* é capaz de sintetizar um maior teor de lipídeos.
- Buscar idade de inóculo ideal da microalga *Scenedesmus sp.* para produção de lipídeos;
- Escolher o tempo do processo de produção de bio-óleo pela microalga *Scenedesmus sp.*;
- Avaliar a composição de micro e macronutrientes no meio de cultivo visando aumentar o teor de lipídeos produzido.

---

## CAPÍTULO 3

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

Este capítulo aborda a revisão bibliográfica sobre o tema, com conceitos e pontos relevantes sobre as microalgas, classificações, o cultivo e produção de bio-óleo.

#### 3.1 – DEFINIÇÃO DE MACRO E MICROALGAS

As algas são organismos talófitos, ou seja, não apresentam diferenciação quanto à caule, folhas ou raízes. São organismos fotossintetizantes e que em geral possuem o pigmento clorofila *a* (LEE, 2008). Podem ser encontradas em diversos habitats, desde águas doces ou salgadas, até mesmo em troncos de árvores e rochas. As algas podem variar desde organismos unicelulares microscópicos, consideradas microalgas até formas celulares complexas com vários metros de comprimento, denominadas macroalgas (RAVEN *et al.*, 2007).

As macroalgas crescem em geral fixas em determinado local passível de ser colonizado, como as algas calcárias, que apresentam papel importante nos recifes de corais. Estas algas depositam carbonato de cálcio nas paredes celulares, fornecendo resistência aos corais, participando de ciclos biogeoquímicos também de outros organismos (RAVEN *et al.*, 2007).

As microalgas são organismos pertencentes ao reino vegetal. São organismos fotossintetizantes, microscópicos e unicelulares, presentes tanto nos meios aquáticos (doce ou salino), como no solo. Fisiologicamente podem ser procarióticos ou eucarióticos, podem variar em tamanho, morfologia e outras características (HOEKMAN *et al.* 2009).

A composição das microalgas está relacionada à natureza de cada espécie e também à fatores ambientais relacionados à região de cultivo da microalga (MIAO E WU, 2006).

As principais vantagens das microalgas sobre os vegetais superiores são poder utilizar solos inapropriados para a agricultura, poderem ser cultivadas durante todo o ano e também a necessidade de uma menor área de produção, visto que as microalgas apresentam produtividade superior à de plantas oleaginosas, sendo cerca de 89,9% em relação a palma e 99,2% em relação a soja (CHISTI, 2007).

### 3.2 – BIO-ÓLEO

O óleo obtido a partir das microalgas, denominado bio-óleo, é classificado como matéria-prima de biocombustíveis de terceira geração. A produção de óleo por microalgas pode ser 20 vezes maior se comparada a espécies vegetais oleaginosas. O teor de lipídeos das microalgas varia em média de 20% a 40% em relação à sua biomassa seca (AHMAD *et al.*, 2011). As microalgas podem produzir de 25 a 220 vezes mais triglicerídeos do que as plantas oleaginosas terrestres, conforme mostra a Tabela 3.1 (CHISTI, 2007).

Tabela 3.1 – Comparativo entre rendimento anual de óleo para produção à partir de microalgas e plantas oleaginosas (CHISTI, 2007).

Cultura	Rendimento anual de óleo	
	L/ha	L/m <sup>2</sup>
Milho	172	0,02
Soja	446	0,04
Canola	1190	0,12
Côco	2689	0,27
Palma	5950	0,60
Microalgas	58.700	5,87

O caminho metabólico para produção do bio-óleo das microalgas é análogo ao das plantas superiores produtores de óleos vegetais. A produção do bio-óleo pelas microalgas está sujeita à variação das condições de crescimento das células. O óleo encontrado nas microalgas apresentam características fisico-químicas similares à óleo produzido por outras plantas, e assim, pode ser considerado promissor para produção de biodiesel (BECKER, 2004).

### 3.3 BIODIESEL E ÓLEO DE MICROALGAS

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

isso pode-se fazer modificações no metabolismo e no meio de cultivo para que os lipídeos de interesse sejam produzidos (BEER *et al.*, 2009).

O biodiesel é composto de éster metílico de ácidos graxos, com comprimento geralmente de 8 a 14 átomos de carbono saturados ou monoinsaturados. Já os ácidos graxos produzidos por microalgas possuem de 16 a 22 carbonos. Assim, há um futuro promissor na produção de ácidos graxos com composições variadas por meio das microalgas (HARWOOD E GUSCHINA, 2009).

Devido ao seu potencial para uso misturado ao diesel, o biodiesel, que é caracterizado como combustível renovável e biodegradável, apresenta um crescente interesse científico (XIONG *et al.*, 2008).

As microalgas são promissoras para a produção de bio-óleo, porém a produção de lipídeos e a produtividade da biomassa são antagonistas: bons teores de lipídeos são produzidos à custas de um comprometido crescimento das algas. Para otimizar condições de cultivo das microalgas como matéria prima para produção de biodiesel o principal desafio é aumentar o teor de bio-óleo (BLATTI *et al.*, 2013).

### **3.4 CLASSIFICAÇÕES DAS MICROALGAS**

Segundo Ohse *et al.* (2007), as microalgas são divididas em quatro classes; Diatomáceas, Algas verdes azuladas; Algas verdes e Algas douradas.

#### **3.4.1 – Diatomáceas**

As diatomáceas (*Bacillariophyceae*) são as algas predominantes nos oceanos. Também são encontradas em água salobra e doce. Hoje existem cerca de 100.000 espécies conhecidas de diatomáceas. Como principal característica, elas possuem paredes impregnadas com sílica polimerizada em sua estrutura. As diatomáceas armazenam carbono sob a forma de óleo natural e apresentam complexa estrutura coletora de luz, que englobam clorofilas *a* e *c*. Apresentam coloração dourado-amarronzada e a reprodução ocorre por meio de divisão binária ou sexuada (OHSE *et al.*, 2007).

### **3.4.2 – Algas verdes azuladas**

As algas verde-azuladas (*Cyanophyceae*) são algas de células procarióticas e apresentam organização semelhante às bactérias. Há a existência de cerca de 2.000 espécies conhecidas, em diferentes habitats. Estas algas apresentam coloração verde-azulada, vermelha, violeta ou castanho. Possuem amido como reserva nutricional. Estas algas também possuem um importante papel na fixação de nitrogênio na atmosfera (OHSE *et al.*, 2007).

### **3.4.3 – Algas verdes**

São predominantes em água doce. As algas verdes (*Chlorophyceae*) podem formar colônias ou serem unicelulares e possuem como forma de reserva o amido, embora também possam armazenar o óleo. Apresentam coloração verde devido aos pigmentos de clorofila *a* e *b*, apresentando reprodução por meio de divisão binária, reprodução sexual ou esporos assexuais (OHSE *et al.*, 2007).

### **3.4.4 – Algas douradas**

Segundo Ohse *et al.* (2007), estas algas (*Chrysophyceae*) apresentam características semelhantes às diatomáceas no que diz respeito à composição bioquímica e pigmentação. Podem apresentar coloração marrom, amarela ou laranja. Apresentam óleos naturais em suas reservas e atualmente existem cerca de 1.000 espécies conhecidas. São algas características principalmente de água doce.

## **3.5 - O CULTIVO DE MICROALGAS**

Uma das formas de cultivo de microalgas é o modo de operação por batelada. A Figura 3.1 mostra cada etapa do crescimento das microalgas, em que há a fase de adaptação ou *lag* (1) que ocorre devido a adaptação das células no meio de cultivo, fase exponencial (2) em que há o início do crescimento e multiplicação das células, fase de redução do

crescimento ou de transição (3), fase estacionária (4), fase de declínio ou de morte (5). Yuan-Kun e Hui (2004) apresenta o gráfico da Figura 3.1 com cada fase.

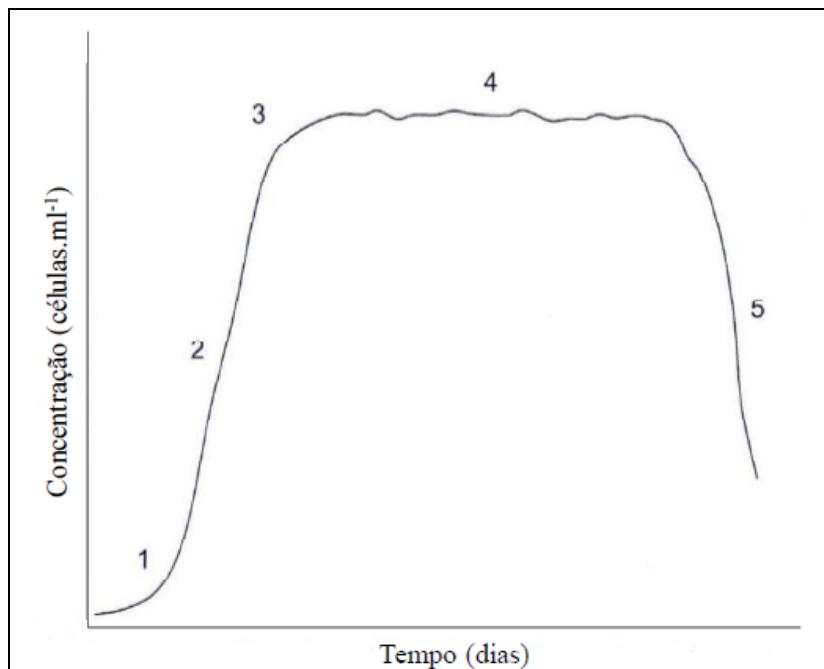


Fig. 3.1 – Comportamento do crescimento de microalgas em relação ao tempo de cultivo.  
(YUAN-KUN e HUI, 2004)

No modo de operação de cultivo contínuo ocorre a saída permanente de microalgas e de meio de cultivo no reator (VONSHAK e TORZILLO; YUAN-KUN E HUI, 2004). Além do sistema de cultivo por batelada e contínuo, as microalgas podem ser cultivadas em um sistema semicontínuo, em que há a substituição de parte do meio de cultivo em intervalos regulares. Essa substituição geralmente acontece quando se tem uma alta quantidade de biomassa. O modo de operação de cultivo semicontínuo proporciona elevada produtividade, assim como alto consumo de nutrientes. Tanto no modo contínuo como semicontínuo para que se tenha microalgas uniformes em relação ao tamanho das células, a fase estacionária das microalgas pode ocorrer após dias ou semanas do início do cultivo (LOURENÇO, 2006).

Diferentemente das formas mencionadas acima, as lagoas abertas se constituem basicamente de áreas com grandes superfícies em contato direto com o ar onde ocorre o desenvolvimento natural das microalgas. A Figura 3.2 mostra o cultivo de duas microalgas: *Dunaliella salina* em lagoas abertas na Austrália e a *Spirulina sp.*, em sistema *raceway*, nos Estados Unidos (CRHISTI, 2007).



Fig. 3.2 – Cultivo de microalgas em lagoas abertas.  
(CHRISTI, 2007)

Os cultivos fechados ocorrem em sistemas de fotobiorreatores, geralmente em formato cilíndrico ou tubular, com disposição vertical ou horizontal dos tubos. Também há os reatores planos, que permitem um controle mais eficiente da energia solar devido seu ajuste do ângulo. A aeração pode ser feita de modo a promover uma mistura no sistema, aumentando a absorção de nutrientes (LOURENÇO, 2006).

Independentemente do tipo de reator e cultivo escolhido, deve-se prevalecer que a escolha promova uma alta produtividade volumétrica e eficiência na conversão de energia luminosa, levando em conta os dispositivos para mistura e trocas gasosas, sistemas de limpeza, temperatura, intensidade luminosa e durabilidade do material de construção do reator (BEHRENS, 2005; TREDICI, 2004).

A Tabela 3.2 apresenta uma comparação entre os diferentes modos de cultivo das microalgas, de acordo com Brennan e Owende (2010) e Mata *et al.* (2010).

Tabela 3.2 – Vantagens e desvantagens dos sistemas de cultivo das microalgas (BRENNAN e OWENDE; MATA *et al.*, 2010)

	Vantagens	Desvantagens
<b>Lagoas abertas e <i>raceways</i></b>	Baixo custo, com facilidade na limpeza; Baixa demanda de energia, fácil manutenção	Apresentam baixa produtividade e requer grandes áreas de terra; Fácil contaminação; Pouco controle das condições ambientais da cultura
<b>Fotobiorreatores tubulares</b>	Grande área de superfície iluminada.	Pode ocorrer o acúmulo de biomassa nas paredes; Requer grande área de seção transversal. Há variações de oxigênio dissolvido ao longo dos tubos
<b>Fotobiorreatores de colunas verticais</b>	Baixo consumo de energia; É compacto e possuem boa transferência de massa; Facilidade em esterilização.	É pequena a área de superfície iluminada; É caro se comparado com sistemas abertos; Seu projeto exige materiais sofisticados.
<b>Fotobiorreatores planos</b>	Boa passagem de luz, com grande área de superfície iluminada; Facilidade na esterilização; Elevada produtividade	O aumento em escala requer muitos compartimentos e materiais; Pode ocorrer acúmulo de biomassa nas paredes.

A manipulação da cultura para síntese de lipídeos de microalgas requer uma compreensão mais detalhada de todo o processo de formação, dessa forma, à medida que novas espécies surgem, estratégias para maximizar a produção de ácidos graxos são traçadas de modo a estudar a interação que ocorre entre a biossíntese de ácidos graxos e demais produtos das microalgas. (BLATTI *et al.*, 2013). A Figura 3.3 mostra os processos aos quais a biomassa de microalgas pode ser submetida com fins energéticos e os produtos formados.

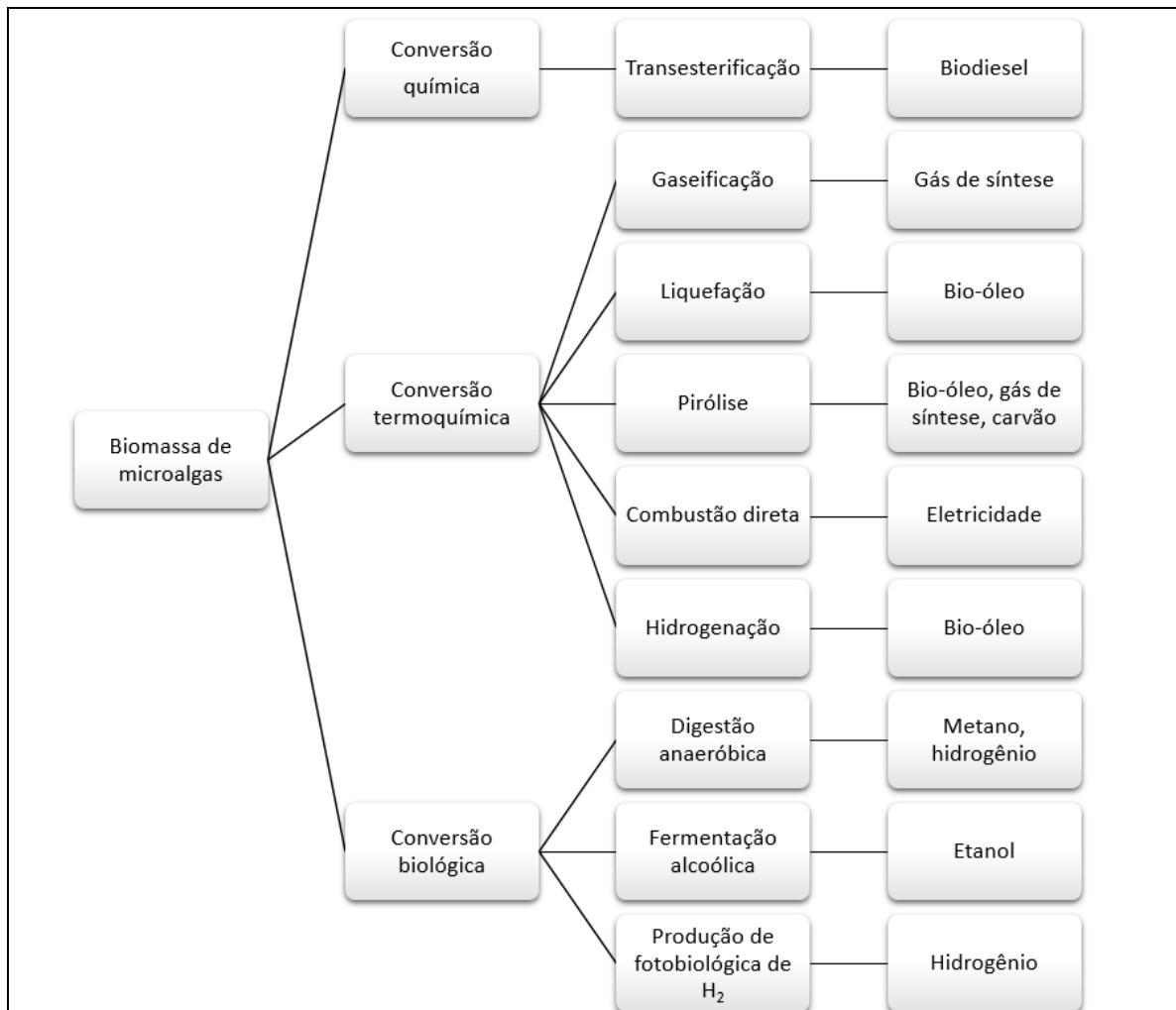


Fig. 3.3 – Formação de produtos a partir da biomassa de algas.

Fonte: Gris, 2010 (adaptado de Amin, 2009; Brennan e Owende, 2010).

Como pode-se observar na Figura 3.3, a biomassa de microalgas pode formar produtos a partir de 3 tipos de conversões: química, termoquímica e biológica. No processo de conversão química, o destaque ocorre para a transesterificação de bio-óleo das microalgas, quando este é extraído, para produção de biodiesel. Na conversão termoquímica há a decomposição térmica do material orgânico que forma a biomassa para que combustíveis sejam produzidos. A decomposição termoquímica pode passar por diferentes processos, como a gaseificação, liquefação, pirólise, combustão direta e hidrogenação. O processo de conversão biológica, pode ocorrer por meio de digestão anaeróbia, fermentação alcoólica e também por produção de hidrogênio fotobiológico (BRENNAN e OWENDE, 2010).

A formação de cada composto dentro da célula da microalga é regulada por mecanismos metabólicos, como por exemplo em microalgas verdes, em que o complexo

sistema coletor de luz junto à clorofila capturam energia solar na forma de fótons, e essa energia é utilizada na fotossíntese, na oxidação catalítica (BEER *et al.*, 2009).

A pigmentação, constituição da parede celular relacionada à natureza química de seus produtos e a forma de divisão nuclear e celular são os aspectos que devem ser levados em consideração como base de classificação das microalgas (TOMASELLI, 2004).

As cianobactérias, como organismos procariontes fotossintéticos de mais fácil manipulação do que as microalgas eucarióticas, podem produzir lipídeos com menores custos associados à colheita de biomassa, porém, o baixo teor de lipídeos produzidos por estas dificulta a produtividade e viabilidade como produtora de bio-óleo para utilização em biocombustíveis (WILLIAMS e LAURENS, 2010). A fotossíntese é um processo que consiste na conversão de compostos inorgânicos e energia luminosa em matéria orgânica por organismos fototróficos (MASOJIDEK *et al.*, 2004).

Para colocar as microalgas em crescimento em condições de estresse visando conseguir rendimentos de óleo adequados, há diversos esforços da engenharia para aumentar o teor de lipídeos durante o crescimento exponencial (DAY *et al.*, 2012).

Os ácidos graxos são biosintetizados no cloroplasto das microalgas a partir de um grupo de enzimas. O processo de formação de lipídeos se inicia na Acetyl-CoA carboxilase, em que há sua carboxilação até formar a Malonil-CoA, sendo uma etapa fundamental para a formação de ácidos graxos (POSTBEITENMILLER, *et al.*, 1992).

As microalgas possuem mecanismos de adaptação em relação às mudanças de intensidade de luz a qual estão expostas, por exemplo, quando há uma limitação de luz, as células aumentam o número de unidades fotossintéticas e também o tamanho dos complexos de coleta de luz. O tempo de resposta das microalgas diante mudanças nas condições ambientais pode se dar em questões de segundos ou até mesmo em dias, pois diferentes mecanismos são utilizados para lidar com o excesso de energia (VONSHAK e TORZILLO, 2004).

No caso de sistemas abertos de produção, a colheita da biomassa de microalgas corresponde de 20 a 30% dos custos totais. Para a colheita das microalgas podem-se envolver processos de flocação, flotação, filtração e centrifugação. O que torna o processo difícil é o pequeno tamanho de algumas células de microalgas (BRENNAN e OWENDE, 2010).

Em termos gerais, o preparo das microalgas para determinada aplicação ocorre em duas etapas, segundo Brennan e Owende (2010):

- Colheita da microalga: processo em um sistema aberto em que a biomassa é separada da suspensão. As técnicas utilizadas podem ser a flotação, floculação ou sedimentação por gravidade;
- Concentração das células: a cultura é concentrada por meio de centrifugação e filtração, em um sistema fechado.

Uma outra metodologia de colheita das microalgas em um sistema aberto é a secagem ao sol, mas a principal desvantagem é a exigência de grandes superfícies de secagem e há grandes riscos de perdas da biomassa (BRENNAN e OWENDE, 2010).

Dentre as espécies de microalgas mais cultivadas estão a *Chlorella sp.* e *Spirulina sp.*, utilizadas principalmente para a suplementação alimentar; *Dunaliela salina*, fonte de β-caroteno e *Haematococcus pluvialis*, para produção e processamento de astaxantina (AZEREDO, 2012). Além destas também tem-se a *Scenedesmus sp.*, utilizada por exemplo para produção de biocombustíveis (CHOI *et al.*, 2011).

### **3.5.1 – *Scenedesmus sp.***

A microalga *Scenedesmus sp.* é muito comum em águas doces. São clorofiladas, unicelulares e pertencem à família *Scenedesmaceae* (STANKIEWICZ *et al.*, 1981). Essa microalga pode ser utilizada em biorremediações, na remoção de nutrientes da água para melhorar a qualidade, segundo Martinez *et al.* (2000). *Scenedesmus sp.* utiliza carbono, energia luminosa e nutrientes para produzir sua biomassa, que pode ser utilizada para produção de biocombustíveis (MATA *et al.*, 2010).

A Tabela 3.3 mostra os principais estudos com esta microalga, segundo Mata *et al.* (2010).

Tab. 3.3 – Principais estudos com a microalga *Scenedesmus sp.* (MATA *et al.*, 2010)

<b>Foco do estudo</b>	<b>Microalga</b>	<b>Autores do estudo</b>
Biorremediação de resíduos	<i>Scenedesmus sp.</i>	Godos <i>et al.</i> (2010)
Suplementação alimentar	<i>Scenedesmus sp.</i>	Yen, Chiang e Sun (2012)
Produção de biocombustíveis	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Choi <i>et al.</i> (2011)

Godos *et al.* (2010) estudaram a avaliação do crescimento da mistura das microalgas *Scenedesmus sp.*, *Spirulina platensis* e *Chlorella sorokiniana*, para degradação de águas

residuais de uma pocilga, diluídas de 4 a 8 vezes, em reator fechado de volume útil 1250 mL, sendo 500 mL de águas residuárias. Os resultados mostraram que as microalgas conseguiram remover 54% do carbono, nitrogênio e fósforo do lodo ativado durante a biodegradação das águas residuárias.

Yen, Chiang e Sun (2012) estudaram o cultivo da *Scenedesmus sp.* para suplementação alimentar, com a extração da luteína por fluído supercrítico de CO<sub>2</sub> no cultivo da *Scenedesmus sp.* em fotobioreator de volume 20 litros, aeração 0,5 vvm, com tempo de cultivo 10 dias. A luteína é um carotenóide presente em alguns vegetais e é utilizada como antioxidante nas membranas oculares. O aumento da pressão e temperatura na operação do biorreator melhora a recuperação da luteína, embora o aumento da temperatura leva à geração de impurezas. O metanol como solvente conseguiu extrair 76,7% da luteína das células.

Choi *et al.* (2011) utilizaram a *Scenedesmus obliquus* para produção de biocombustível, hidrogênio. As fermentações ocorreram em frascos de 120 mL com volume útil 80 mL, em meio anaeróbio suplementado com nitrogênio. Os cultivos ocorreram durante 12 dias. Ao término, foi constatado por meio de cromatografia gasosa que o biogás produzido era hidrogênio, sendo esta microalga promissora no seguimento de estudos com biocombustíveis.

### **3.5.2 – *Chlorella sp.***

A microalga *Chlorella sp.* é fonte de proteínas devido à fácil assimilação dos aminoácidos presentes na sua composição. Nesse aspecto A *Chlorella sp.* é utilizada na suplementação alimentar humana e na piscicultura. Japão e Taiwan são os maiores produtores desta microalga, com um preço na faixa de vinte mil dólares por tonelada (LUNDQUIST *et al.*, 2010; AZEREDO, 2012).

### **3.5.3 – *Spirulina sp.***

A *Spirulina sp.* também é utilizada na alimentação devido sua alta concentração de proteínas e também na área farmacêutica devido inúmeros benefícios à saúde, como melhora da defesa do sistema imunológico, inibição e prevenção de diversos tipos de cânceres e diminuição das taxas de colesterol no organismo. (RICHMOND, 2004; JOVENTINO *et al.*,

2012). Os maiores produtores desta microalga são Ásia e Estados Unidos, com preço médio de 10 mil dólares por tonelada, segundo Lundquist *et al.* (2010).

### **3.5.4 – *Nannochloropsis oculata*.**

É uma microalga unicelular, que pertence à divisão *Ochrophyta*, da classe *Eustigmatophyceae*, composta por polissacarídeos que compõem sua parede celular. Quanto à estrutura química do seu produto de reserva, este ainda não é muito bem conhecido. São microalgas de águas salgadas e muito utilizadas na aquicultura (LOURENÇO, 2006).

Uma das vantagens da *Nannochloropsis oculata* é que por ser uma microalga marinha apresenta menor risco de contaminação por fungos e bactérias devido à natureza salina do meio de cultivo (OHSE *et al.*, 2007).

### **3.5.5 – *Dunaliela salina***

O principal interesse nestas microalgas é a produção de carotenóides. É uma microalga resistente a grande faixa de temperaturas, em águas salobras e salgadas (AZEREDO, 2012). Austrália, China, Israel e Estados Unidos são os principais produtores desta microalga. Em relação ao preço, o custo de produção desta microalga é de aproximadamente três dólares por quilograma e a comercialização da biomassa seca fica na faixa de 215 a 2.150 euros por quilograma (KITTO, 2012; BRENNAN e OWENDE; 2010).

### **3.5.6 – *Haematococcus pluvialis*.**

É uma espécie sensível à mudanças nas condições ambientais, ficando mais vulnerável a contaminações. Por exigir um melhor controle em seu cultivo, os custos de produção desta microalga são elevados em relação às outras (RANJBAR *et al.*, 2008). Esta microalga também é cultivada para a exploração de carotenóides, como a astaxantina. A tonelada do carotenóide astaxantina custa 10 mil dólares e a produção mundial é de apenas 100 toneladas por ano, devido à alta sensibilidade da espécie (LUNDQUIST *et al.*, 2010).

### **3.6 – FATORES QUE INTERFEREM NO CRESCIMENTO DAS MICROALGAS**

A obtenção de biomassa e de produtos metabólicos das microalgas pode ser influenciada pelas interações entre fatores biológicos, físicos e químicos (FALKOWSKI e RAVEN, 1997).

Fatores químicos ou físicos podem influenciar no cultivo de microalgas, como é o caso da luz e temperatura, que são fatores físicos e se relacionam, pois, segundo Vonshak e Torzillo (2004), uma temperatura ótima para a fotossíntese cresce com o aumento da intensidade de luz. Outro fator importante é o projeto dos reatores, que devem ser projetados de acordo com determinadas estratégias de cultivo, como favorecer a absorção de luz, favorecendo a formação de produtos desejados, como os lipídeos.

Em todo o cultivo de microalgas, o ponto mais importante para a fotossíntese e para os metabólitos secundários é a luz, mas somente quando todas as necessidades nutricionais e intensidade de luz forem satisfatórias para as microalgas é que a produção máxima será alcançada (VONSHAK e TORZILLO, 2004).

A temperatura é um dos fatores que mais afeta a taxa metabólica dos organismos, por isso é desejável que se trabalhe com temperaturas constantes, de modo a proporcionar mais estabilidade no crescimento celular nos experimentos e operações de rotinas, permitindo maior reproduzibilidade e previsibilidade das respostas das espécies (LOURENÇO, 2006). Schmidt (2007) recomenda que as cepas de microalgas sejam mantidas em torno de 22 °C ou temperaturas menores, o que diminuiu a frequência de repiques.

A iluminação também é um fator que pode influenciar no desenvolvimento e crescimento das microalgas. Segundo Oliveira (2013), a condição ótima para o crescimento das microalgas dependerá da intensidade da luz, do comprimento de onda e duração aos quais as células estão expostas. Conforme especifica o autor supracitado, para cultivos laboratoriais as lâmpadas mais utilizadas são as fluorescentes do tipo luz do dia, pois simulam comprimentos de onda de 350 a 700 nm, que são necessários para que as microalgas façam a fotossíntese. O sistema de iluminação normalmente é dotado de 12 horas de luz e 12 horas no escuro (SCHMIDT, 2007).

A produtividade de biomassa e lipídeos está ligada a luminosidade e composição do meio de cultivo. A temperatura, composição do meio, intensidade luminosa, aeração e configuração do biorreator podem afetar a biofixação de CO<sub>2</sub> pela microalga (HO *et al.*, 2012).

A agitação e aeração também podem ser pontos que interferem no sistema metabólico da microalga. A aeração promove uma agitação dos cultivos, criando uma homogeneização do meio de crescimento, evitando decantação e acúmulo de células no fundo do reator (LOURENÇO, 2006).

### ***3.6.1 – CO<sub>2</sub> para desenvolvimento das microalgas***

Segundo Chisti (2007), o uso da biomassa de microalgas destaca-se como uma fonte sustentável na produção de biodiesel por não gerar resíduos químicos, pois sua produção pode ser feita em qualquer tipo de terreno, em sistema aberto. Além disso, as microalgas podem ser produzidas ininterruptamente em qualquer época do ano, podendo ser recolhidas diariamente.

A injeção de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) no sistema fechado de produção de microalgas pode potencializar elevação na taxa fotossintética, assegurando um rápido crescimento e aumento de biomassa, embora o uso de CO<sub>2</sub> deva ser controlado para se tornar eficaz e não acarretar perdas desnecessárias (GODOY *et al.*, 2012). Em cultivos de microalgas marinhas e de água doce, com diferentes concentrações de CO<sub>2</sub>, observa-se o aumento do crescimento em relação ao uso do CO<sub>2</sub> até determinada taxa, a partir da qual os cultivos não apresentam mais variações até a inibição do crescimento (CHIU *et al.*, 2009; WIDJAJA *et al.*, 2009).

As microalgas, quando cultivadas em meio autotrófico na presença de luz, são capazes de captar o dióxido de carbono que está presente no ar atmosférico. Isso é viável quando aplicado à produção de biomassa de algas para o desenvolvimento de biocombustíveis. No entanto, há limitações neste processo, sendo a principal limitação a concentração final da biomassa das algas, que raramente apresenta rendimentos superiores a 1 g/L no final do cultivo (FENG *et al.*, 2011; ZHENG *et al.*, 2012).

A escolha de espécies de microalgas para fazer a biomitigação de CO<sub>2</sub> tem um efeito significativo sobre a eficácia do processo. Para Brennan e Owende (2010), há alguns atributos desejáveis para a fixação de CO<sub>2</sub>, embora atualmente não existam cepas que atendam a todos os atributos, descritos abaixo:

- altas taxas de crescimento;
- alta tolerância a vestígios de constituintes dos gases de combustão;
- possibilidades de obtenção de valiosos subprodutos, como biodiesel e biomassa;
- facilidade de colheita;

- tolerância a altas temperaturas de água para minimizar o custo de resfriamento de gases de combustão.

Para Jaiswal e Kashyap (2002) a adaptação de microalgas a faixas de concentração de dióxido de carbono está relacionada com um mecanismo biofísico denominado mecanismo de concentração de carbono, que concentra o dióxido de carbono em sítios de carboxilação fotossintética. A função do mecanismo do carbono é elevar os níveis de carbono inorgânico intracelular, compensando a limitação do suprimento de dióxido de carbono.

A assimilação de carbono inorgânico se dá por três diferentes vias, segundo Cuaresma *et al.* (2006):

- assimilação direta do dióxido de carbono pela membrana plasmática;
- utilização de bicarbonato pela indução da enzima anidrase carbônica. Esta enzima converte os íons  $\text{HCO}_3^-$  em  $\text{CO}_2$ ;
- transporte de bicarbonato diretamente pela membrana plasmática.

### **3.7 - RELAÇÃO ENTRE NUTRIENTES E CRESCIMENTO DAS MICROALGAS**

Lourenço (2006) aborda a atuação de cada um dos componentes que fazem parte dos diversos meios de cultivos para as microalgas. Os elementos carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio, fósforo, magnésio, cobre, zinco e molibdênio são elementos considerados universalmente necessários a todas as algas. Alguns elementos, como o enxofre, potássio e cálcio, embora necessários, podem ser substituídos por outros.

Os nutrientes para o cultivo de microalgas podem ser assimilados ou absorvidos. A assimilação consiste em uma sequência de reações de redução destes por meio de complexos enzimáticos, levando à incorporação do elemento, que geralmente está na forma de um íon inorgânico a substâncias orgânicas das células. Já a absorção se dá com um transporte do elemento, que também geralmente se encontra em forma de íon, por meio das membranas plasmáticas, em que o nutriente passa do meio exterior para o interior da célula (LAVÍN E LOURENÇO, 2005).

A concentração de cada nutriente – elemento – é determinada conforme exigência nutricional dos processos metabólicos das algas. Segundo Lourenço (2006), os nutrientes se dividem em macronutrientes e micronutrientes.

### **3.7.1. Macronutrientes**

Os macronutrientes são os elementos necessários em concentrações da ordem de centenas ou milhares de µg/g de massa seca (C, H, O, N, P, S, K, Mg, Si, Fe).

Os macronutrientes são fundamentais por serem constituintes de biomoléculas, do meio intracelular e de membranas. Atuam nos processos de troca de energia e fazem a regulagem metabólica (LOURENÇO, 2006).

O nitrogênio é um constituinte de diversas substâncias do metabolismo primário das algas. Segundo Lavín e Lourenço (2005), o nitrogênio pode ser encontrado no interior das células das algas principalmente sob a forma de nitrato, amônia ou ureia. Se o suprimento de nitrogênio for abundante em cultivos, tem-se a tendência de aumentar as concentrações de proteínas e clorofila nas células das algas. No entanto, segundo Lourenço *et al.* (2004), caso a concentração de nitrogênio disponível para as microalgas sejam baixas, há uma diminuição da taxa de divisão celular, levando às reduções nas concentrações de proteína e clorofila. A ausência de nitrogênio também tende a levar as microalgas a uma mudança de cor. Em cultivos velhos, a ausência deste pigmento resulta em descoloração e amarelamento da biomassa.

O carbono é um dos componentes mais importantes de todas as substâncias orgânicas que são sintetizadas pelas células. Diversos meios de cultivo podem não utilizar carbono, visto que considera sua existência na água e por meio da difusão natural de CO<sub>2</sub> do ar atmosférico para o meio de cultivo (LOURENÇO, 2006).

O oxigênio é fundamental nas atividades respiratórias e demais processos que envolvem energia. Não é um elemento limitante. O fósforo é envolvido diretamente com todos os processos que envolvem trocas energéticas nas células das algas. Possuem as funções de atuarem na transferência de energia e constituição de moléculas estruturais. A assimilação do fósforo é dependente da luz e isso provavelmente ocorre devido a acumulação de energia em ATP. Segundo Lobban e Harrinson (1994), polifosfatos e açúcares fosfatados podem ser utilizados como fontes de fósforo, porém estes necessitam de uma hidrólise enzimática extracelular para viabilizar a absorção de fosfato (LOURENÇO, 2006).

O silício é um componente fundamental do esqueleto externo. É adicionado sob a forma de silicato de sódio hidratado. Em situações de limitações, pode ocorrer a diminuição da espessura da parede celular das algas, levando a perdas populacionais (LOURENÇO, 2006).

O potássio atua na regulagem osmótica, no pH interno e estabilidade de proteínas. Tem o papel de ativar enzimas e em muitos casos pode ser substituído por sódio (LOURENÇO, 2006). Já o magnésio, por ser um constituinte da molécula de clorofila, é essencial para as algas. Está envolvido com a ativação de enzimas e sob sua deficiência as células das algas perdem pigmentação (LOBBAN e HARRISON, 1994).

O enxofre é apresentado por algumas enzimas como um co-fator, como pela enzima acetil, coenzima de algas verdes e heterocontófitas. Vitaminas, como a tiamina e biotina apresentam elevadas taxas de enxofre (LOBBAN e HARRISON, 1994).

O ferro atua nas vias biossintéticas da clorofila, respiração e fotossíntese, reduções de nitratos e nitritos, sulfato, fixação de nitrogênio molecular e ainda é co-fator de enzimas. Já o Hidrogênio tem pequena importância para as algas por não ser limitante nos cultivos. Este componente é obtido por meio da quebra da molécula da água nas reações primárias da fotossíntese (SUNDA et al., 2005).

### **3.7.2. Micronutrientes**

Os micronutrientes englobam os nutrientes necessários em concentrações baixas, da ordem de unidades ou dezenas de  $\mu\text{g/g}$  de massa seca (Mn, Cu, Zn, Mo, V, B, Co, Ca, Na, Se, Ni). Contudo a definição de macro e micronutrientes pode ser controvertida entre diferentes autores para determinados elementos, como o Ferro e Boro, que possuem concentrações em média próximas dos limites que definem um e outro (LOURENÇO, 2006).

Os micronutrientes participam da estrutura e da atividade de diversas enzimas, que estão envolvidas nas vias metabólicas das algas. Estes também participam da estruturação de organelas celulares, como os ribossomos (SUNDA et al., 2005).

O manganês atua como co-fator de enzimas que participam da síntese de ácidos graxos e também do Ciclo de Krebs. Tem importância fundamental no transporte de elétrons do fotossistema, atua na manutenção da estrutura das membranas dos cloroplastos e também é um componente da enzima superóxido-dismutase, que é a enzima que remove radicais superóxidos tóxicos das células. O manganês é exigido em concentrações mais baixas que as do ferro (LOURENÇO, 2006).

A deficiência de manganês afeta o processo de clorofila e inibe o crescimento de micro-organismos fotoautotróficos. A deficiência de manganês pode ser um fator limitante da

fotossíntese nas algas. Por outro lado, o manganês não é necessário para uma fotoredução de CO<sub>2</sub> (CONSTANTOPOULOS, 1970).

O zinco é essencial para todos os tipos de vida, incluindo micro-organismos, animais e plantas. Na maioria dos casos, o zinco é um cofator essencial para diversas funções biológicas (VALLEE, 1986). A remoção de zinco pode levar a perdas na atividade enzimática (ARNOLD E HAYMORE, 1991).

O íon de zinco está localizado no sítio ativo de uma enzima, participando diretamente do mecanismo catalítico, interagindo com as moléculas de substrato por meio de reações (FIERKE *et al.*, 2000). O zinco apresenta papéis metabólicos semelhante aos apresentados para o manganês, que atua na síntese de ácidos graxos. O zinco participa da estrutura de enzimas como co-fator e também é um componente estrutural da enzima anidrase carbônica, que é uma enzima crítica ao transporte e fixação de CO<sub>2</sub>. Geralmente o zinco é adicionado na forma de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, que é uma de suas formas solúveis (LOURENÇO, 2006)

O cobre atua no transporte de elétrons na fotossíntese. Neste caso, as algas necessitam dele para a aquisição de energia. Já o molibdênio apresenta funções associadas ao metabolismo do nitrogênio por ser constituinte da enzima nitrato redutase. É um co-fator de enzimas que atuam na fotossíntese e respiração. O cobalto participa de processos de fixação de nitrogênio pela célula (LOBBAN e HARRISON, 1994).

As vitaminas mais importantes são a tiamina, biotina e cianocobalamina. Várias espécies de algas podem sintetizar estas vitaminas e assim, são poucas as espécies que tem a necessidade de receber estas vitaminas como fonte externa (BEER *et al.*, 2009). A tiamina age como coenzima e está envolvida nos processos de respiração celular e fermentação. A biotina é uma vitamina e segundo Lourenço (2006), a função dela na microalga é fazer o transporte de CO<sub>2</sub> por ser um co-fator da enzima piruvato carboxilase.

### **3.8 – PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS**

O planejamento de experimentos é necessário para se chegar à otimização de um processo, desenvolver formulações dentro de parâmetros estabelecidos e avaliar os efeitos e impactos que os fatores possuem em relação à resposta desejada. A realização dos experimentos, de forma confiável e significativa, ocorre quando da utilização de um método científico de planejamento. Durante a realização de análises experimentais etapas devem ser seguidas, segundo Rodrigues e Iemma (2005):

- a realização do planejamento;
- a análise estatística dos dados .

Um exemplo de planejamento de experimentos é o planejamento fatorial, que envolve todas as combinações possíveis entre todos os níveis das variáveis, permitindo assim avaliar quais variáveis interferem em uma determinada resposta, mencionando também quais destas variáveis são importantes (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Para Rodrigues e Iemma (2005) as vantagens do uso do planejamento experimental são:

- redução do tempo de experimentação, pois permite a otimização do número de experimentos;
- redução dos custos relativos à execução dos ensaios;
- permitir a avaliação e a minimização do erro experimental;
- possibilitar uma otimização multivariada;
- permitir a verificação conjunta da influência das variáveis estudadas;
- possibilidade de otimizar mais de uma resposta ao mesmo tempo.

Para Box *et al.* (1978), a metodologia do planejamento de experimentos aliada à uma análise de superfícies de resposta permite estatisticamente verificar os efeitos individuais, interações entre as variáveis, avaliação de erros experimentais e o equacionamento empírico dos resultados.

A técnica de superfície de respostas é um conjunto de técnicas estatísticas utilizadas para modelar processos em que as respostas são influenciadas por fatores de entrada, que são as variáveis independentes. O modelo gerado permite estimar o valor de uma determinada resposta em função das variáveis em estudo dentro da área de trabalho (LOPERA *et al.*, 2012).

O Planejamento Composto Central (PCC) é um dos planejamentos experimentais mais conhecidos. Este é baseado em um planejamento fatorial completo mais um planejamento com réplicas no ponto central. Neste planejamento, as variáveis de entrada são codificadas (LOPERA *et al.*, 2012).

A utilização de tratamentos estatístico por meio de PCC foi adotada por Ramirez *et al.*, (2013) na avaliação do uso da vinhaça para o cultivo da *Scenedesmus sp.*, em que adotou-se um planejamento composto central para determinar os efeitos significativos e otimização das variáveis temperatura, intensidade luminosa e porcentagem da vinhaça na influência do

crescimento das microalgas, tendo como resultados um crescimento celular superior a 0,2 g/L quando as microalgas foram cultivadas com doses de vinhaça de até 40% do meio.

Gris *et al.* (2013) também utilizou um PCC para avaliar o crescimento da microalga *Nannochloropsis oculata*, otimizando as variáveis temperatura e intensidade luminosa ao longo de 11 dias de experimentos, em que os experimentos foram cultivados em reatores com volume útil 3 litros e aeração 0,23 vvm, e a temperatura variando de 19 a 29 °C e intensidade luminosa 40 a 140  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . A otimização das variáveis por meio da técnica de superfície de resposta mostrou que 221,9 mg/L de células da microalga foram obtidas na temperatura 21 °C e intensidade luminosa 137  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

---

## CAPÍTULO 4

### MATERIAL E MÉTODOS

---

Neste capítulo serão apresentadas as microalgas, a unidade experimental, o material e métodos experimentais utilizados neste trabalho.

As etapas do trabalho estão ilustradas resumidamente no fluxograma da Figura 4.1.

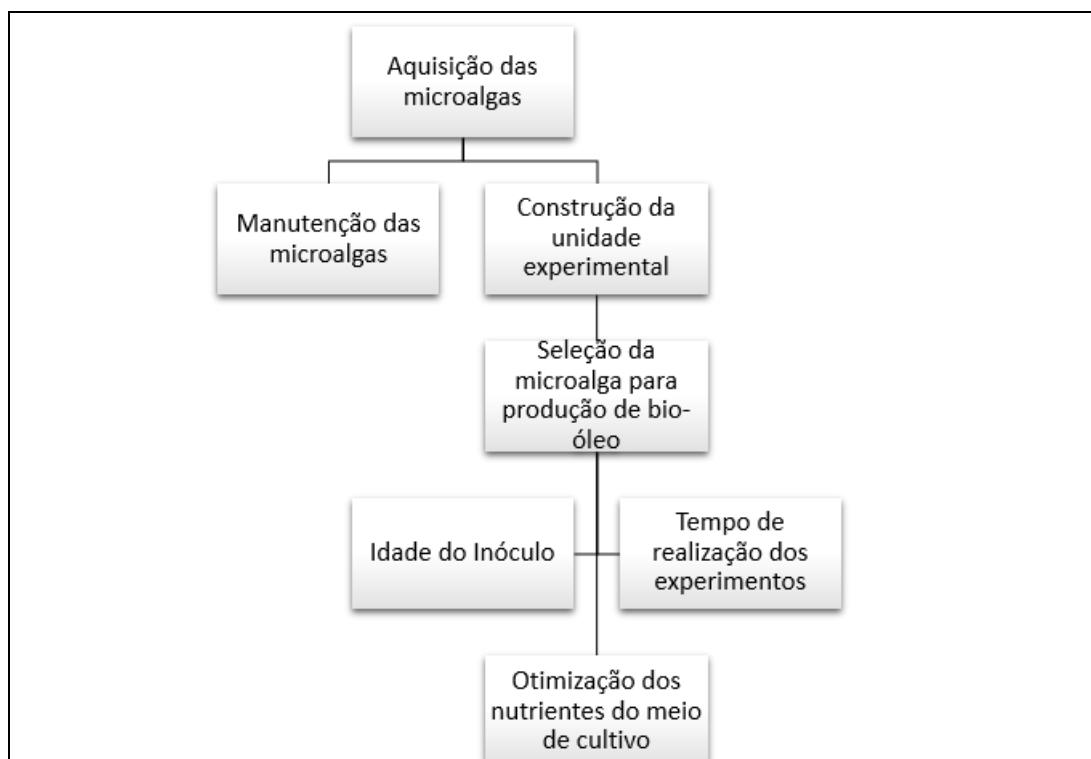


Fig. 4.1 – Fluxograma etapas do trabalho

#### **4.1 – MICROALGAS**

Para a produção de bio-óleo a partir de microalgas, utilizou-se as cepas das microalgas: *Nannochloropsis oculata*, *Scenedesmus sp.*, *Chlorella sp.* e *Spirulina platensis*.

As cepas da *Nannochloropsis oculata* e *Scenedesmus sp.* foram gentilmente cedidas pelo Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre RS. A microalga *Scenedesmus sp.* foi coletada na “Lagoa de Cota Cota”, em La Paz (Bolívia) e isolada no laboratório de IIDEPROQ - UMSA (*Instituto de Investigación y Desarrollo de Procesos Químicos*) da Universidad Mayor de San Andres. A cepa *Chlorella*

## Material e Métodos

*sp.* foi cedida pelo Instituto Nacional de Tecnologia. Já a cepa *Spirulina platensis* foi obtida da Fundação André Tosello, Campinas – SP.

As microalgas foram mantidas em incubadora dotada de fotoperíodo de 12 h luz e 12 h escuro, com temperatura de  $22,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5$  e repiques de manutenção feitos a cada 15 dias, sendo posteriormente armazenadas até utilização nos experimentos (Figura 4.2).



Fig.4.2 – Incubadora: Banco de algas  
(Foto tirada pelo autor)

### **4.2 - UNIDADE EXPERIMENTAL E MEIO DE CULTIVO**

As microalgas foram mantidas em ambiente climatizado a  $23 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  com iluminação artificial com 3 lâmpadas fluorescentes de 20 W, submetidas a fotoperíodo de 12 horas, cultivadas em reatores verticais em acrílico e reatores abertos em formato de bandejas, com volume útil de 3 litros. Os fotobiorreatores foram construídos seguindo os critérios básicos de cultivo de microalgas de Muñoz *et al.* (2004): elevada eficiência na utilização da energia

## Material e Métodos

luminosa, facilidade no controle de aeração, adequado sistema de mistura, facilidade em aumento de escala e reduzido estresse hidrodinâmico das células.

A unidade experimental foi dotada de sistema de controle de iluminação, temperatura e aeração (Figura 4.3), semelhante à unidade experimental adotada por Gris *et al.* (2013). A unidade experimental foi construída pela equipe do projeto da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia (FEQUI/UFU) e foi baseada em uma montagem experimental do laboratório de pesquisa do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, que trabalha na área de intensificação, modelagem, simulação, controle e otimização de processos (GIMSCOP). Os cultivos foram realizados em um volume total de 3 litros em cada reator, sendo 10% do volume como inóculo nos experimentos e aeração de 0,7 vvm. A produtividade de biomassa e lipídeos está ligada a luminosidade e composição do meio de cultivo. Diariamente, a variação do volume do meio de cultivo foi corrigida devido a evaporação com a adição de água destilada. Este procedimento também foi adotado por Moraes *et al.* (2012) quando do cultivo de microalgas para biofixação de CO<sub>2</sub> em diferentes reatores.

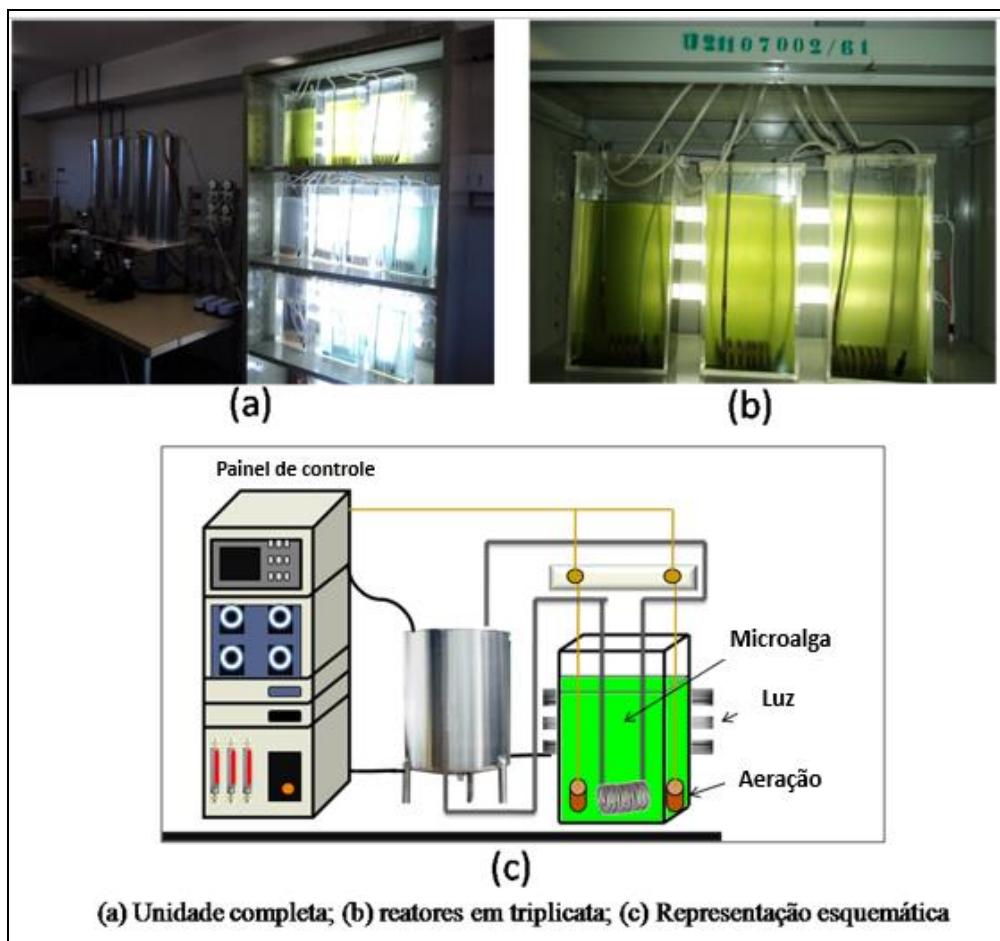


Fig. 4.3 –Unidade experimental de produção de bio-óleo por microalgas  
(Foto tirada pelo autor)

**4.2.1 - Meio de cultivo para *Scenedesmus sp.***

Utilizou-se o meio Guillard modificado (1975), sem a adição de vitaminas, conforme composição apresentada na Tabela 4.1.

Tab. 4.1 - Composição do meio Guillard modificado (1975).

<b>Reagentes</b>	<b>Soluções – estoque (g/L)</b>	<b>Meio de cultivo</b>
Solução 1: Sais	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O = 36,76 MgSO <sub>4</sub> = 18,04 NaHCO <sub>3</sub> = 12,6 K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O = 11,41 NaNO <sub>3</sub> = 85,01	4 mL
Solução 2: Ferro e micronutrientes	Na <sub>2</sub> EDTA = 4,36 FeCl <sub>3</sub> ·H <sub>2</sub> O = 3,15 CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O = 0,012 ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O = 0,022 CoCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O = 0,012 MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O = 0,18 Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O = 0,008	4 mL
Água destilada		1000 mL

Não ocorreu correção do pH neste meio de cultivo.

**4.2.2 - Meio de cultivo para *Spirulina platensis* e *Chlorella sp.***

Utilizou-se o meio de cultivo W.C. de Guillard e Lorenzen (1972), apresentado na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Composição do meio de cultivo W.C. (GUILLARD e LORENZEN, 1972)

<b>Reagentes</b>	<b>Soluções – estoque ( g/L)</b>	<b>Meio de cultivo</b>
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	36,8	1 mL
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	37,0	1 mL
Na <sub>2</sub> HCO <sub>3</sub>	12,6	1 mL
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	11,4	1 mL
NaNO <sub>3</sub>	85,0	1 mL
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	21,2	1 mL
Solução de Ferro	Na <sub>2</sub> EDTA = 4,36 FeCl <sub>3</sub> ·H <sub>2</sub> O = 3,15	1 mL
Solução de micronutrientes	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O = 0,01 ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O = 0,022 CoCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O = 0,01 MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O = 0,18 Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O = 0,006 H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> = 1,0	1 mL
Solução de vitaminas	Tiamina = 0,1 Biotina= 0,0005	1 mL
Água destilada		1000 mL

Correção do pH para 6,5 com solução HCl.

**4.2.3 - Meio de cultivo para *Nannochloropsis oculata*.**

Foi utilizado o meio de cultivo f/2 (GUILLARD, 1975 apud LOURENÇO, 2006), conforme descrito na Tabela 4.3

Tabela 4.3 - Composição do meio de cultivo f/2 (LOURENÇO, 2006)

<b>Reagentes</b>	<b>Soluções – estoque ( g/L)</b>	<b>Meio de cultivo</b>
Sal Marinho	33,3	1000 mL
NaNO <sub>3</sub>	75	1 mL
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O	5,0	1 mL
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O	30	1 mL
Solução de Metais-traço	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O = 0,0098 ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O = 0,022 CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O = 0,01 MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O = 0,18 Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O = 0,0063 FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O = 0,00315 Na <sub>2</sub> EDTA = 0,00436	1 mL
Solução de vitaminas	Tiamina = 0,1 Biotina = 0,0005 Cianocobalamina = 0,0005	1 mL

Não ocorreu correção do pH neste meio de cultivo.

Meio e esterilizado a 121°C/15min.

### 4.3 - TESTES PRELIMINARES

#### 4.3.1 - Comportamento de diferentes espécies de microalgas em relação ao teor de lipídeos e biomassa

Foram testadas todas as microalgas - *Scenedesmus sp.*, *Spirulina platensis*, *Nannochloropsis oculata* e *Chlorella sp.* - para verificar como estas se comportavam em relação à produção de bio-óleo, expresso em teor de lipídeos e biomassa seca produzida.

As microalgas cresceram em seus respectivos meios de cultivo por 30 dias, em reatores verticais em acrílico com volume útil de 3 litros, temperatura 23 °C, aeração de 0,7 vvm e fotoperíodo 12h claro e 12 h escuro. Os dados de volume, temperatura, aeração e fotoperíodo mencionados, foram adotados em todos os testes.

**4.3.2 - Produção de lipídeos e biomassa pela microalga *Scenedesmus sp.* em reatores abertos – tipo bandeja.**

A microalga *Scenedesmus sp.* foi cultivada em reatores abertos (Figura 4.4) – tipo bandeja – para verificar o seu comportamento neste tipo de biorreator para a produção lipídica e biomassa produzida. Junto com este novo tipo de reator, foi avaliado qual a melhor concentração de inóculo para o cultivo das microalgas, utilizando inóculos com 10% e 20% da *Scenedesmus sp.* Foram utilizados 12 dias de cultivo, visando redução de tempo nos experimentos.



Fig. 4.4 - reator aberto (tipo bandeja) com cultivo da microalga *Scenedesmus sp.*

**4.3.3 - Avaliação do teor lipídico e biomassa em reatores tipo bandeja aberto e coberto com filme PVC em diferentes tempos de cultivo**

Devido a perda de água por evaporação durante o cultivo da *Scenedesmus sp.*, foi realizado um teste para verificar a produção de óleo e biomassa no mesmo reator, mas utilizando filme plástico em PVC para fechar o reator, transformando este em um reator de bandeja do tipo coberto.

Para verificar se o fechamento do reator também influenciaria no tempo de cultivo necessário para a microalga, estes experimentos foram realizados nos tempos de 12 dias

(tempo já utilizado em estudos anteriores) e também um tempo maior, de 24 dias, com 10% de volume do meio de inóculo.

#### **4.3.4 – Idade do Inóculo**

Com o intuito de trabalhar com as melhores condições de cultivo da *Scenedesmus sp.* para maximizar a produção lipídica e melhorar o crescimento, verificou-se o tempo de crescimento do inóculo e também o tempo que o ensaio experimental deve ficar em funcionamento para a máxima produção de óleo.

Para analisar qual a melhor idade do inóculo a ser utilizada em experimentos, testou-se o cultivo da microalga utilizando inóculos com 6, 12, 15, 18 e 24 dias de crescimento. O tempo compreendido de 6 a 24 dias foi adotado devido a fase de adaptação das microalgas (em torno de 6 dias) até a fase estacionária de crescimento das microalgas, 24 dias (GRIS, 2010; YUAN-KUN E HUI, 2004). Os experimentos também foram realizados utilizando 10% do volume de meio de cultivo como inóculo, intensidade luminosa de 5000 lux, medidos por um luxímetro e aeração de 0,7 vvm nos reatores, de volume útil 3 litros, cultivados no meio Guillard modificado. Após o término foram analisadas a biomassa seca e o teor de lipídeos.

#### **4.3.5 - Perfil do tempo de realização dos experimentos e perfis do teor de lipídeos, oxigênio dissolvido e demanda química de oxigênio durante o crescimento da microalga *Scenedesmus sp.***

O tempo de realização de cada experimento também foi investigado novamente junto com o teor de lipídeos, oxigênio dissolvido, demanda química de oxigênio (DQO) e biomassa seca após o cultivo, visando um menor tempo de realização dos testes para obter o máximo de teor de lipídeos. Em relação às questões operacionais, adotou-se os mesmos procedimentos descritos anteriormente, em reatores em acrílicos, pois também são cobertos, proporcionam maior controle de temperatura e menor evaporação do meio de cultivo. Os experimentos foram realizados em batelada nos intervalos de tempo de 5 a 23 dias, buscando verificar os diferentes perfis das respostas analisadas durante todo o período de crescimento da microalga.

**4.3.6 - Inserção de vitaminas no meio de cultivo da microalga *Scenedesmus sp.* em reatores verticais em acrílico**

Visando verificar a influência da inserção de vitaminas no meio de cultivo da *Scenedesmus sp.* para produção de maiores teores de lipídeos, foram adicionadas vitaminas segundo a composição original do meio Guillard (1975), conforme Tabela 4.4. Após a preparação da solução-estoque de vitaminas, adicionou-se 1 mL desta solução para cada 1000 mL de meio de cultivo. Os experimentos foram realizados nas mesmas condições operacionais trabalhadas anteriormente em reatores verticais em acrílico, e as análises feitas entre o período de 9 a 14 dias.

Tab. 4.4 - Composição da solução de vitaminas inseridas no meio de cultivo da *Scenedesmus sp.*

Solução	Reagente utilizado	Concentração da solução estoque (mg/L)
Vitaminas (1mL/L de meio)	Tiamina (B <sub>1</sub> )	100
	Cianocobalamina (B <sub>12</sub> )	0,5
	Biotina (B <sub>7</sub> )	0,5

**4.4-ESTUDO DA VARIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DOS MACRONUTRIENTES NO MEIO DE CULTIVO**

Diferentes concentrações foram testadas dos macronutrientes de forma a buscar performance para a maior produção lipídica. As condições operacionais foram semelhantes às adotas nos testes anteriores.

Nos testes com os macronutrientes, foram alteradas as concentrações de cada macronutriente, mantendo as concentrações normais dos micronutrientes conforme o meio Guillard, com o intuito de verificar se algum macronutriente quando alterado a sua concentração poderia apresentar melhora na produção lipídica.

Foram realizados 15 experimentos e ocorreu a variação de um macronutriente, nas seguintes condições: sem a adição do determinado macronutriente; metade da concentração; e o dobro da concentração citada na literatura do meio de cultivo referente à solução-estoque

para preparação do meio de cultivo. A realização dos experimentos, com a concentração de cada macronutriente está descrita na Tabela 4.5.

Tab. 4.5 – Concentrações dos macronutrientes testadas

<b>Macronutriente</b>	<b>Condição</b>	<b>Nova concentração na solução-estoque (g/L)</b>
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Sem adição	0
	Metade	18,38
	Dobro	73,52
$\text{MgSO}_4$	Sem adição	0
	Metade	9,02
	Dobro	36,08
$\text{NaHCO}_3$	Sem adição	0
	Metade	6,3
	Dobro	25,2
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Sem adição	0
	Metade	5,705
	Dobro	22,82
$\text{NaNO}_3$	Sem adição	0
	Metade	42,55
	Dobro	170,02

Não ocorreu correção do pH neste meio de cultivo. As novas concentrações dos macronutrientes foram calculadas com base na concentração da solução-estoque proposta no meio de cultivo original ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  - 36,76 g/L;  $\text{MgSO}_4$  - 18,04 g/L;  $\text{NaHCO}_3$ , - 12,6 g/L;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  – 11,41 g/L;  $\text{NaNO}_3$ - 85,01 g/L).

#### **4.5- ESTUDO DA VARIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DOS MICRONUTRIENTES NA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS**

Foram testadas diferentes concentrações dos seguintes micronutrientes no meio de cultivo da *Scenedesmus sp.*: ácido etilenodinitrilo tetracético ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ), cloreto de ferro hidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) e cloreto de cobalto hidratado ( $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ). As concentrações dos macronutrientes não foram alteradas neste teste.

Para cada experimento, todas as soluções-estoque para a preparação do meio de cultivo foram utilizadas, conforme apresentada na Tabela 4.1. Quando ocorreu a variação de um deles, por exemplo no Na<sub>2</sub>EDTA (Tabela 4.6), a concentração dos demais manteve-se a mesma já adotada na literatura. Os experimentos também foram realizados utilizando 10% do volume de meio de cultivo como inóculo, intensidade luminosa de 5000 lux, medida por um luxímetro, aeração de 0,7 vvm nos reatores e volume útil 3 litros, analisando a quantidade de óleo produzido, o teor de lipídeos e biomassa produzida.

Tab. 4.6 - Composição do meio para teste dos micronutrientes

<b>Reagentes</b>	<b>Soluções – estoque (g/L)</b>	<b>Meio de cultivo</b>
Solução 1 - Sais	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O = 36,76 MgSO <sub>4</sub> = 18,04 NaHCO <sub>3</sub> = 12,6 K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O = 11,41 NaNO <sub>3</sub> = 85,01	4 mL
Solução 2 – Ferro e micronutrientes	Na <sub>2</sub> EDTA = * FeCl <sub>3</sub> ·H <sub>2</sub> O = * CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O = * ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O = 0,022 CoCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O = * MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O = 0,18 Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O = 0,008	4 mL
Água destilada		1000 mL

\*concentrações variadas de acordo com a concentração testada em cada experimento.

As concentrações testadas para Na<sub>2</sub>EDTA, FeCl<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O e CoCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O estão descritas na Tabela 4.7.

Os micronutrientes que apresentaram algum comportamento relevante na alteração de teor de lipídeos e biomassa foram testados novamente para reproduzir os resultados.

As concentrações dos micronutrientes ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O e MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O não foram alteradas, pois segundo a literatura, zinco e manganês participam da rota metabólica para produção de lipídeos, segundo Lourenço (2006), não sendo necessário investigar o comportamento deles nesta etapa de testes.

Tab. 4.7 – Concentrações dos micronutrientes testadas

<b>Micronutriente</b>	<b>Condição</b>	<b>Nova concentração na solução-estoque (g/L)</b>
Na <sub>2</sub> EDTA	Sem adição	0
	Metade	2,18
	Dobro	8,72
	Quíntuplo	21,8
FeCl <sub>3</sub> ·H <sub>2</sub> O	Sem adição	0
	Metade	1,575
	Dobro	6,3
	Quíntuplo	15,75
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	Sem adição	0
	Metade	0,006
	Dobro	0,024
	Quíntuplo	0,06
CoCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	Sem adição	0
	Metade	0,006
	Dobro	0,024
	Quíntuplo	0,06

As novas concentrações dos micronutrientes foram calculadas com base na concentração da solução-estoque proposta no meio de cultivo original: Na<sub>2</sub>EDTA - 4,36 g/L; FeCl<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O - 3,15 g/L; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O - 0,012g/L; CoCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 0,012 - g/L

As melhores condições da concentração dos micronutrientes foram utilizadas para prosseguir os testes.

#### **4.6- OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DE SULFATO DE ZINCO E CLORETO DE MANGANÊS**

Para otimizar a concentração de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O e concentração de MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O na produção de bio-óleo e concentração de biomassa seca, foram realizados testes experimentais baseado em um planejamento estatístico denominado Planejamento Composto Central (PCC).

O Planejamento Composto Central (PCC) foi realizado com 11 experimentos ( $2^2$ ) mais 3 réplicas no ponto central e 4 experimentos no ponto axial. O  $\alpha$  de rotabilidade foi de 1,415, resultando em 11 experimentos (Tabela 4.8).

Tab. 4.8 - Matriz do planejamento composto central

Experimento	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (g/L)	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O (g/L)
1	-1	-1
2	-1	1
3	1	-1
4	1	1
5	-1,415	0
6	1,415	0
7	0	-1,415
8	0	1,415
9	0	0
10	0	0
11	0	0

Todos os níveis das variáveis estudadas foram adimensionalizados (codificados) conforme utilização da Equação 4.1.

$$X_n = \frac{(X - X_0)}{\left[ \frac{X_{+1} - X_{-1}}{2} \right]} \quad (\text{Eq.4.1})$$

Sendo,

- $X_n$  = valor codificado da variável ( $n = 1,2,\dots$ )
- $X$  = valor da variável a ser calculada;
- $X_0$  = valor da variável no ponto central;
- $X_{+1}$  = valor da variável no nível superior;
- $X_{-1}$  = valor da variável no nível inferior.

Para o PCC adotou-se as seguintes faixas para a concentração de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O e de MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, respectivamente, definidos por testes preliminares: 0,00374 a 0,1283g/L e de 0,0300 a 1,0495 g/L. Neste planejamento foi estabelecido o nível superior com o sinal +1 das variáveis escolhidas para o planejamento, sendo a concentração ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O no meio de cultivo com microalgas de 0,110 g/L e a concentração de MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0,900 g/L. O nível inferior das variáveis escolhidas foi representado por -1 sendo a concentração de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,022 g/L e concentração de MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0,180 g/L. Estes valores foram definidos em testes preliminares. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. O PCC foi feito para as variáveis ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O e MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O pelo fato de que zinco e manganês participam da rota metabólica para produção de lipídeos (LOURENÇO, 2006).

As Equações codificadas (Eq. 4.2 e 4.3) para cada variável estudada no experimento foram:

$$X_1 = \frac{(\text{concentração ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,066)}{\left[ \frac{0,110 - 0,022}{2} \right]} = \frac{(\text{concentração ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,066)}{[0,044]} \quad (\text{Eq.4.2})$$

$$X_2 = \frac{(\text{concentração MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 0,540)}{\left[ \frac{0,900 - 0,180}{2} \right]} = \frac{(\text{concentração MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 0,540)}{[0,360]} \quad (\text{Eq.4.3})$$

A Tabela 4.9 mostra as variáveis em suas grandezas reais. As respostas para o planejamento realizado foram: teor de lipídeos (%), quantidade de óleo produzido por reator (g) e biomassa seca (g/L).

Tab. 4.9 - Matriz do planejamento composto central com valores reais para concentrações de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

<b>Experimento</b>	<b><math>\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}</math> (g/L)</b>	<b><math>\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}</math> (g/L)</b>
1	0,022	0,18
2	0,022	0,9
3	0,11	0,18
4	0,11	0,9
5	0,00374	0,54
6	0,1283	0,54
7	0,066	0,03
8	0,066	1,0495
9	0,066	0,54
10	0,066	0,54
11	0,066	0,54

Abaixo encontra-se descrito a equação empírica de 2<sup>a</sup> ordem (Eq. 4.4) que representa cada uma das respostas estudadas.

$$\text{Resposta} = \beta_0 + aX_1 + bX_2 + dX_1^2 + eX_2^2 + gX_1X_2 \quad (\text{Eq.4.4})$$

Sendo:

- $\beta_0$  = valor médio da resposta;
- a, b, c,...i = parâmetro da equação;
- $X_1$  = Concentração de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;
- $X_2$  = Concentração de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .

Os cálculos estatísticos foram realizados com auxílio do *Software Statistica 7.1*, da *StatSoft.*, verificando quais variáveis influenciam em determinada respostas pelos valores de *t de Student*, sendo eliminados os efeitos com nível de significância maior que 5% e a otimização foi realizada utilizando a técnica de superfície de respostas.

Após a maximização dos resultados no PCC, foi realizada a reprodução experimental das melhores condições para a produção de lipídeos em relação às respostas concentração de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .

## 4.7 - MÉTODOS ANALÍTICOS

### 4.7.1 – Determinação de biomassa através de espectroscopia.

Adotou-se o método de espectrofotometria visível para acompanhamento da produção de biomassa a partir do crescimento em relação ao tempo de cultivo. Uma alíquota de 4 mL da amostra foi coletada diariamente para a realização da leitura no espectrofotômetro, verificando o crescimento das microalgas. Utilizou-se como branco o meio de cultivo sem microalgas. Foram adotadas as medições no comprimento de 510 nm, para a *Nannochloropsis oculata* e 570 nm para das demais, de acordo com Lourenço (2006). O valor da leitura da absorbância foi relacionado com uma curva de calibração e equação previamente construídos, em que foi possível determinar a concentração de biomassa em g/L (Gris, 2010).

### 4.7.2 - Intensidade Luminosa

Foi determinada a partir de um luxímetro digital Modelo 401025, marca *Extech Instruments*. A medição da intensidade Luminosa foi feita de modo a caracterizar a quantidade de luz emitida nos reatores.

### 4.7.3 – Determinação do peso seco da biomassa

Após os cultivos, a amostra foi centrifugada em um equipamento modelo *Heraeus Megafuge 16*, marca *Thermo Fischer Scientific*, em um campo centrífugo relativo de 7808 g por 5 minutos. O sedimento obtido da centrifugação foi colocado em bêquer previamente pesado e levado para secagem em estufa a 80°C por 48 horas. Posteriormente as amostras foram colocadas em um dessecador por 30 minutos e estas foram pesadas, determinando a biomassa seca final, sendo a concentração de células expressas em g/L (LOURENÇO, 2006; GRIS, 2010).

### 4.7.4 – Quantidade de óleo e Teor lipídios

Para a determinação da quantidade de óleo e teor de lipídeo, utilizou-se o método de Folch *et al.* (1957) com banho ultrassônico (Figura 4.5). Aproximadamente 500 mg da amostra foi macerada em cadinho de porcelana com 20 mL de clorofórmio e 10 mL de metanol (a). Posteriormente a mistura obtida foi colocada um tubo plástico de 50 mL e mantida em banho ultrassônico a 40 kHz por 90 minutos. Após este tempo, a amostra foi submetida à centrifugação a 4800 rpm (campo centrífugo relativo de 7808 g) por 8 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante contendo os lipídeos extraídos foi transferido para outro tubo plástico de 50 mL e foram adicionados 6 mL de solução KCl 0,88%. Após agitação, houve a formação de duas fases, uma hidrofílica e a inferior com lipídeos. A fase superior foi removida e foi adicionado 4 mL de mistura metanol/água 1:1, seguido de nova agitação. O novo sobrenadante foi retirado e a fase remanescente, contendo lipídeos foi filtrada com sulfato de sódio anidro, recolhida em balão previamente pesado e o solvente foi extraído desta fase por meio de evaporador rotativo. O conteúdo remanescente no balão após a evaporação dos solventes no processo de extração de lipídeos foi contabilizado como óleo produzido pela microalga (b). A quantidade de óleo produzido é referente ao volume de cultivo de cada reator (3 litros), que representa a constante da Equação 4.7.

O teor de lipídeos em porcentagem mássica foi obtido conforme Equação 4.7:

$$\text{Teor de lipídeos (\%)} = \frac{(\text{massa de óleo produzido}) \times 100}{(\text{concentração da biomassa}) \times 3} = \quad (\text{Eq.4.7})$$

Sendo:

- Massa de óleo produzido: expressa em gramas.
- Concentração da biomassa: expressa em g/L

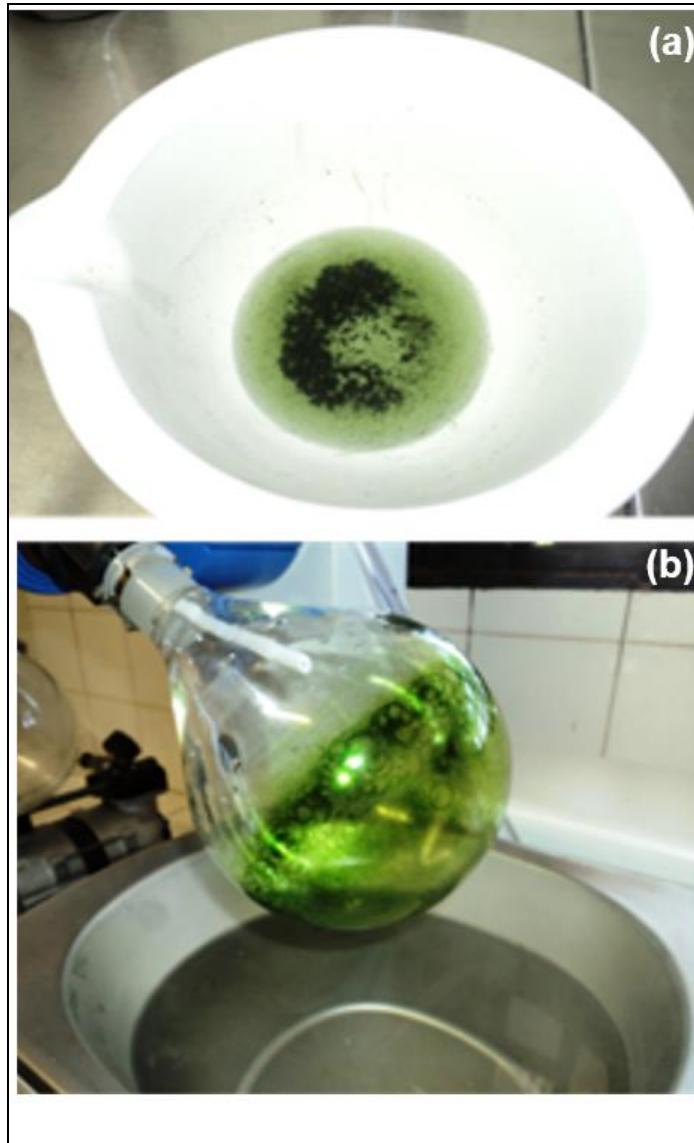


Fig.4.5 – Extração de lipídeos em evaporador rotativo  
(Foto tirada pelo autor)

#### **4.7.5 – Oxigênio dissolvido (OD) e Demanda Química de Oxigênio (DQO)**

A análise de demanda química de oxigênio foi realizada pelo método de oxidação por dicromato de potássio em meio ácido, empregando o procedimento descrito por *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1998). Já o oxigênio dissolvido foi medido diretamente no experimento realizado por meio de um sensor polarográfico, marca *Metler Toledo*, previamente calibrado.

---

## CAPÍTULO 5

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho.

#### **5.1 – PRODUÇÃO DE BIOMASSA A PARTIR DO CRESCIMENTO DAS MICROALGAS**

A avaliação do crescimento de microalgas pela utilização de medidas de densidade óptica baseia-se na obstrução física da passagem da luz pelas células, em que quanto maior a concentração celular, maior será a absorbância. Segundo os princípios da Lei de Lambert-Beer, a intensidade da luz emitida decresce exponencialmente à medida que a espessura do meio absorvente aumenta aritmeticamente (HARRIS, 2005).

Após monitoramento diário dos valores de absorbância para verificar a produção de biomassa em função do tempo, foram feitas as relações entre absorbância e peso seco (APÊNDICE 1). Com a leitura no espectrofotômetro da amostra cultivada para a *Scenedesmus sp.* foi possível obter a concentração de biomassa em função do tempo na preparação do inóculo, conforme a Figura 5.1.

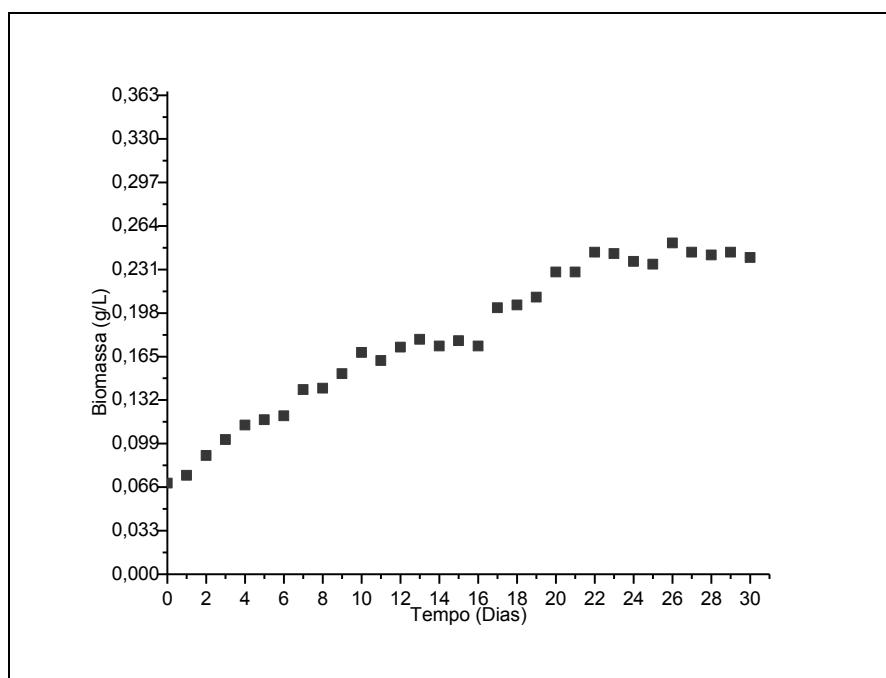


Fig. 5.1 – Curva de inóculo para crescimento da microalga *Scenedesmus sp.*

A Figura 5.1 mostra que entre o 10º e o 16º dia ocorreu a estabilidade de crescimento da *Scenedesmus sp.* (no 12º dia tem-se 0,168 g/L) e que outra estabilidade do crescimento ocorreu no 22º e 30º dias. O resultado mostra que para a alga *Scenedesmus sp.* o crescimento das células foi finalizado no 22º dia, com 0,244 g/L de biomassa. Segundo Sheng-Yi *et al.* (2009) e Brown *et al.* (1997) o acúmulo de lipídeos em células de microalgas ocorre principalmente durante a fase estacionária, o que foi verificado entre o 10º e 16º dia e também entre 22º e 30º dia.

Na curva de crescimento apresentada há a existência de etapas de crescimento bem definidas: a fase de adaptação, também chamada de *lag*, que ocorre até o 2º dia de cultivo devido à presença de possíveis células inviáveis e também ao período de adaptação fisiológica das células diante das condições de cultivo; uma fase exponencial, também chamada logarítmica, que variou do 2º ao 10º dia e depois do 16º ao 22º dia, que segundo Gris (2010) indica o início do crescimento e multiplicação das células e ocorre porque a microalga vai consumindo nutrientes e ao término, utiliza alguma substância de reserva para continuar o crescimento; a fase estacionária ocorreu entre o 10º e 16º dia e após o 22º dia de cultivo.

As Figuras 5.2, 5.3 e 5.4 mostram, respectivamente, as curvas de crescimento para das *Nannochloropsis oculata*, *Chlorella sp.* e *Spirulina platensis*, de acordo com as leituras em absorbâncias apresentadas nos Apêndices 2 a 4.

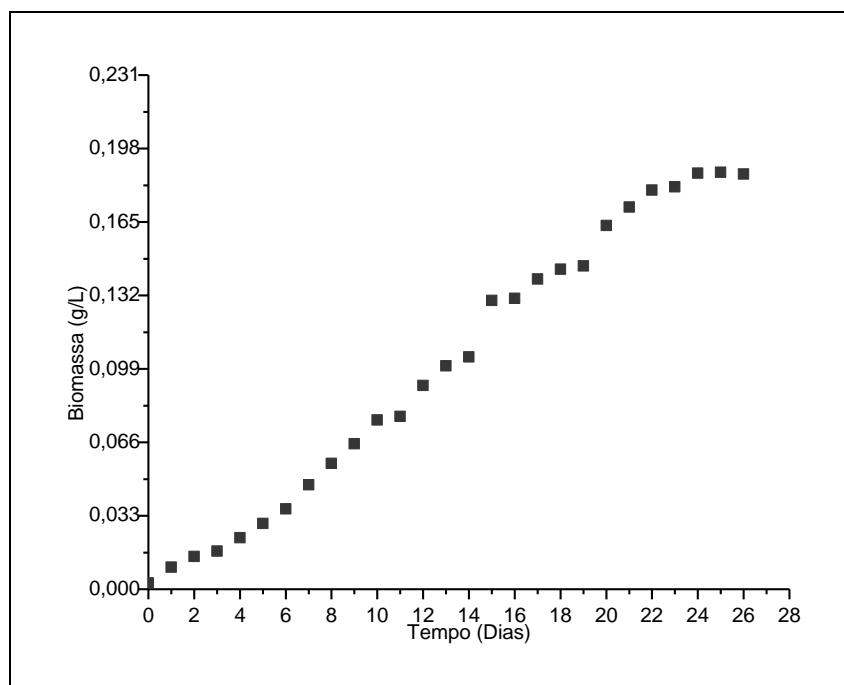


Fig. 5.2 – Curva de crescimento da *Nannochloropsis oculata*

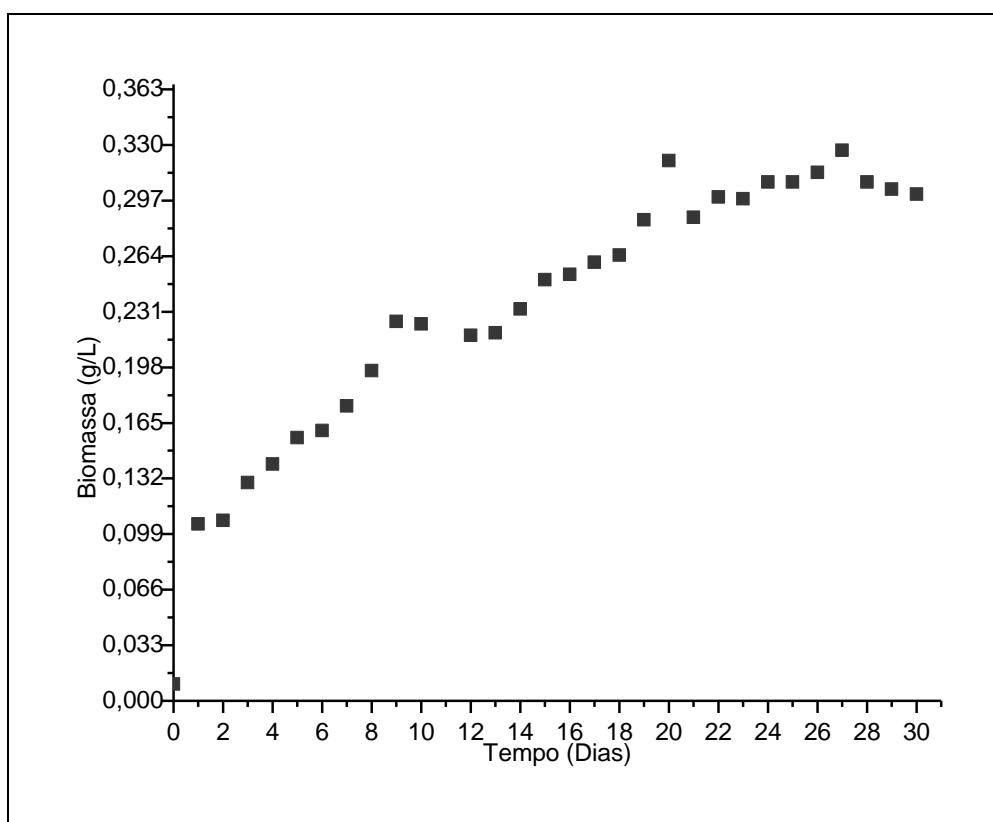


Fig. 5.3 – Curva para crescimento da *Chlorella* sp.

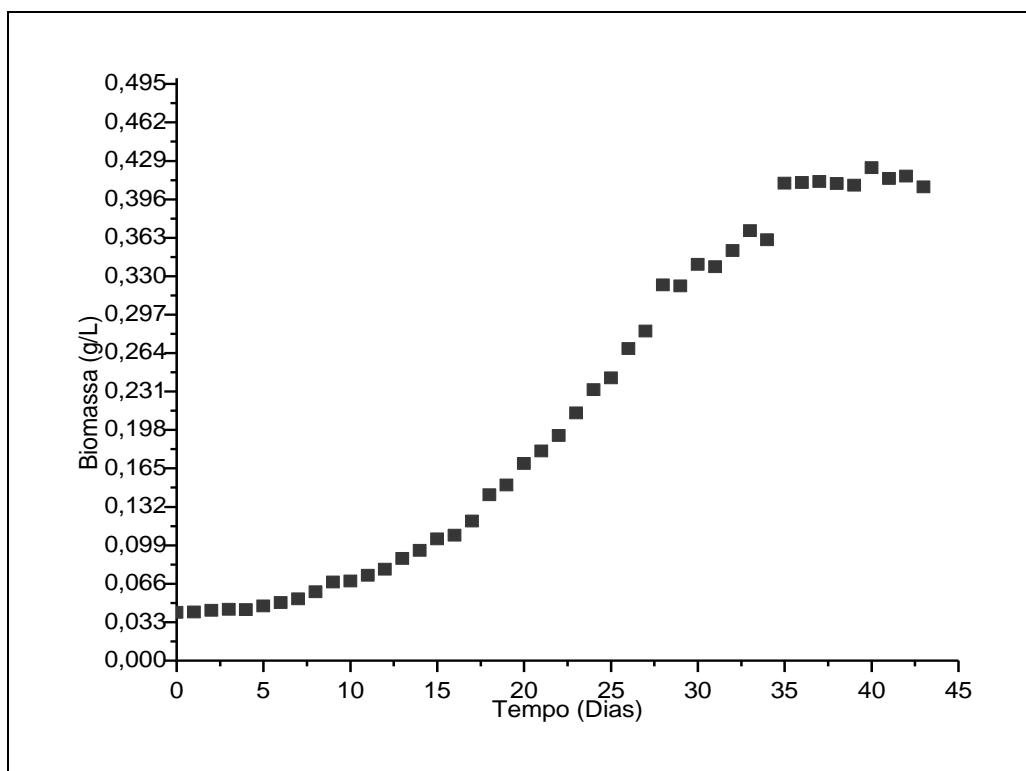


Fig. 5.4 – Curva de para crescimento da *Spirulina platensis*

## 5.2 - COMPORTAMENTO DE DIFERENTES ESPÉCIES DE MICROALGAS EM RELAÇÃO AO TEOR DE LIPÍDEOS E BIOMASSA

Nos primeiros testes experimentais, todas as espécies de microalgas disponíveis pelo grupo de pesquisa foram analisadas de forma a buscar qual delas apresentavam melhores resultados, principalmente em relação ao teor de lipídeos (A concentração inicial de biomassa do inóculo, com 12 dias foi de 0,102 g/L).

A Tabela 5.1, apresenta os resultados do teor de lipídeos, quantidade de óleo produzido e biomassa seca para *Scenedesmus sp.*, *Spirulina platensis*, *Nannochloropsis oculata* e *Chlorella sp.* durante o tempo de 30 dias, nos fotobioreatores planos verticais em acrílico, utilizando 10% de volume da microalga como inóculo.

Tab. 5.1 – Teor de lipídeos, quantidade de óleo produzido e biomassa seca das microalgas *Scenedesmus sp.*, *Spirulina platensis*, *Nannochloropsis oculata* e *Chlorella sp.* durante 30 dias de cultivo em fotobioreatores planos verticais em acrílico

Microalgas	Teor de lipídeos extraído	Quantidade de	Biomassa
	das células (%)	óleo produzido*	seca (g/L)
<i>Scenedesmus sp.</i>	36,70	0,292	0,265
<i>Spirulina platensis</i>	14,22	0,010	0,023
<i>Nannochloropsis oculata</i>	49,49	0,652	0,439
<i>Chlorella sp.</i>	35,09	0,045	0,043

\* quantidade produzida por reator com capacidade de 3 litros.

Verifica-se na Tabela 5.1 que a *Nannochloropsis oculata* apresentou maior teor de lipídeos extraído de suas células, com maior quantidade de biomassa seca produzida, o que representa uma maior produção de óleo (0,652 g). Porém, esta microalga é de difícil cultivo na região de Uberlândia-MG por ser de água salgada. Nesse aspecto, a outra microalga que apresentou maior quantidade de óleo produzido foi a *Scenedesmus sp.*, que apresentou teor lipídico de 36,70%, sendo 0,292 g de óleo, sendo uma microalga de água doce e de fácil cultivo, não necessitando de se trabalhar em meio salino, que é difícil de se conseguir na região de Uberlândia – MG e a preparação deste com sais marinhos torna o processo com elevados custos. Além disso, esta microalga não requer adição de vitaminas em seu meio de

crescimento, o que também representa uma economia nos custos relacionados à produção do meio de cultivo. Assim, adotou-se esta espécie de microalga para prosseguir nos testes, visando melhorar a extração lipídica e aspectos econômicos com relação à custos com nutrientes.

### **5.3 - PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS E BIOMASSA PELA MICROALGA *Scenedesmus sp.* EM REATORES ABERTOS – TIPO BANDEJA – COM MENOR TEMPO DE CULTIVO E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE INÓCULO**

Como a *Scenedesmus sp.* foi selecionada pelo teste anterior, devido sua produção lipídica e facilidade no cultivo, esta espécie foi submetida a teste utilizando diferentes concentrações de inóculo e tempo de cultivo menor, 12 dias, conforme Tabela 5.2.

Tab. 5.2 – Teor de lipídeos, quantidade de óleo produzido e biomassa da microalga *Scenedesmus sp.* com diferentes concentrações de inóculo e 12 dias de cultivo em reator tipo bandeja aberto.

Inóculo (%) v/v	Teor de lipídeos extraído das células (%)	Quantidade de óleo produzido*	Biomassa seca (g/L)
10% <i>Scenedesmus sp.</i>	7,71	0,099	0,432
20% <i>Scenedesmus sp.</i>	4,17	0,099	0,799

10% de inóculo significa que utilizou-se um volume de inóculo de 300 mL e este apresentou concentração de 0,102 g/L de microalgas e 20% utilizou volume de inóculo 600 mL com concentração de 0,204 g/L de microalgas.

\* quantidade produzida por reator com capacidade de 3 litros.

Ao longo dos 12 dias de cultivos, nota-se na Tabela 5.2 que quando se utilizou uma menor concentração de inóculo (10%), o teor de lipídeos extraído das células foi maior do que quando se utilizou 20% de inóculo e ainda obteve-se uma menor concentração de biomassa, gerando menor quantidade de resíduos. Os resultados mostram também que a produção de lipídeo para ambos os casos foi igual (0,099 g de óleo). Esse resultado foi fundamental para

## Resultados e Discussão

---

verificar que a produção de bio-óleo não está associada ao crescimento celular e sim relacionada ao armazenamento de reservas nutricionais (LEMOS *et al.*, 2012).

Fazendo comparação dos resultados apresentados na Tabela 5.1 com a Tabela 5.2, verifica-se que nesta última obteve-se menor teor lipídico, porém foi utilizado somente 12 dias de cultivo. Mesmo sendo menor o teor de lipídeos, este experimento foi importante para verificar que reduzindo o tempo de cultivo também é possível a obtenção de bio-óleo, sendo possível efetuar estudos em tempos menores para maximizar o teor de lipídeos.

Nos reatores do tipo bandeja aberto verificou-se perda de água durante o processo a qual precisou ser repostada. Este fato deve estar relacionado com a evaporação do meio de cultivo ao longo dos dias. Este comportamento mostrou que havia a necessidade de se realizar experimentos em reatores abertos e cobertos para melhor avaliar esse comportamento.

Como um dos objetivos deste estudo foi maximizar a produção lipídica, adotou-se o uso de inóculo com 10% (v/v) da microalga como padrão para a realização dos próximos testes experimentais.

### **5.4 - AVALIAÇÃO DO TEOR LIPÍDICO E BIOMASSA EM REATORES TIPO BANDEJA ABERTO E COBERTO COM FILME PVC EM DIFERENTES TEMPOS DE CULTIVO**

A Tabela 5.3 apresenta os resultados para os experimentos realizados nos reatores de bandeja (aberto e coberto) para os tempos de 12 e 24 dias de cultivo, utilizando 10% de volume de inóculo.

Tab. 5.3 – Resultados para teor de lipídeos, quantidade de óleo produzido e biomassa em reatores de bandeja (aberto e coberto) com 12 e 24 dias de cultivo.

Dias de Cultivo	Tipo do reator de bandeja	Teor de lipídeos extraído das células (%)	Quantidade de óleo produzido (g)	Biomassa seca (g/L)
12	Aberto	7,11	0,047	0,221
	Coberto c/ filme PVC	13,76	0,059	0,143
24	Aberto	1,04	0,007	0,236
	Coberto c/ filme PVC	2,13	0,007	0,116

## Resultados e Discussão

Na Tabela 5.3 é possível verificar que o maior teor de lipídeos realmente continua sendo quando as microalgas são cultivadas em 12 dias de experimentos. Foi observado que quando se trabalhou com os reatores em formato de bandeja, os melhores resultados ocorreram quando estes foram cobertos com filme de PVC (Figura 5.5), chegando a 13,76% de lipídeos em relação à massa seca de biomassa final produzida com uma produção de 0,059 g de óleo no reator. Este resultado mostra que a produção de bio-óleo foi maior quando se trabalhou com reatores cobertos, evitando perdas relacionadas à evaporação. Ao se trabalhar com reatores abertos, as microalgas são cultivas com exposição ao ambiente, ocorrendo variação do volume do meio de cultivo devido evaporação. Este inconveniente foi corrigido com a adição de água destilada, procedimento este também adotado por Moraes *et al.* (2012).



Fig. 5.5 – reatores de bandeja coberto com filme PVC

(Foto tirada pelo autor)

Além do experimento com reator de bandeja coberto com filme PVC apresentar melhor resultado em 12 dias, houve uma menor produção de biomassa nos reatores cobertos.

Durante os experimentos realizados em 24 dias de cultivo, também foi acompanhado a concentração de oxigênio dissolvido, com intuito de verificar possíveis interferências e variações deste parâmetro ao longo do tempo de experimento. As Figuras 5.6 e 5.7 mostram, respectivamente, a concentração de oxigênio dissolvido para os experimentos realizados em reatores do tipo de bandeja aberto e coberto com filme PVC.

## Resultados e Discussão

---

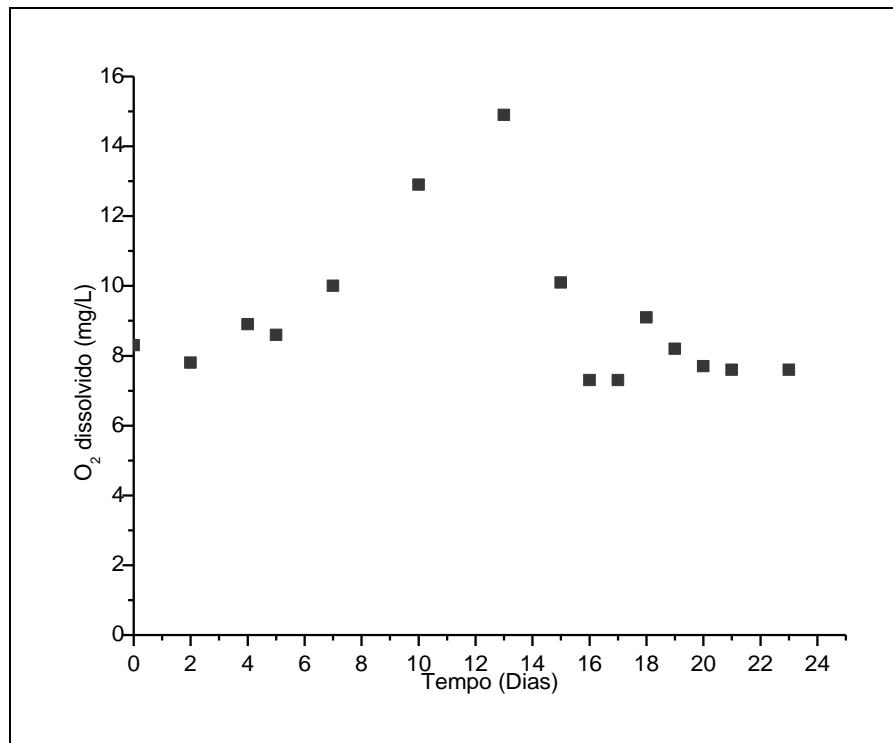


Fig. 5.6 – Perfil do  $O_2$  dissolvido em reator de bandeja aberto em função do tempo

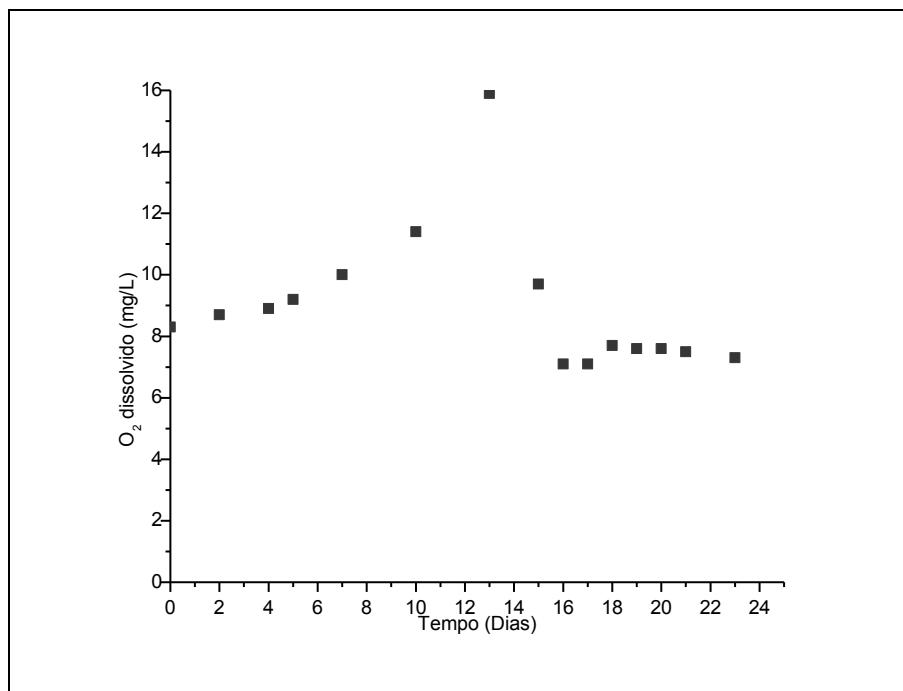


Fig. 5.7 – Perfil do  $O_2$  dissolvido em reator de bandeja coberto com filme de PVC em função do tempo.

Nas Figuras 5.6 e 5.7, verifica-se que houve variações das concentrações de oxigênio dissolvido ao longo do tempo de realização dos experimentos. Verifica-se que até

aproximadamente até o 14º dia houve um aumento na concentração de oxigênio dissolvido em ambos os casos, e depois houve uma queda. Contudo, nos experimentos em que os reatores de bandeja foram cobertos, ou seja, sem a evaporação do meio e reposição de água ocorreu maior estabilidade da concentração de oxigênio do que no reator aberto. Logo, verifica-se uma maior eficiência dos reatores cobertos.

Após verificar que houve variações na concentração de oxigênio dissolvido ao longo do tempo nos experimentos, constatou-se a necessidade de se verificar a existência de alguma relação entre o oxigênio e a produção de lipídeos. Logo, foi efetuado um estudo do perfil do tempo para verificar se o tempo ideal de cultivo nos reatores era de 12 dias ou não, e o teor de lipídeos e biomassa em diferentes dias, dentro do prazo total de 24 dias. Como foi verificado que o melhor reator foi o coberto, ou seja, fechado, utilizou-se os reatores em acrílicos na forma retangular vertical, pois estes também são cobertos (fechados) e foram construídos especificamente para este fim, proporcionando melhor controle interno da temperatura para as microalgas e tornando-se nula a evaporação do meio (Figura 5.8).



Fig. 5.8 - Reatores em acrílicos na forma retangular vertical  
(Foto tirada pelo autor)

## 5.5 - IDADE DO INÓCULO

Como resultados dos testes preliminares para biomassa seca, teor de lipídeos e quantidade de óleo produzido nos experimentos cultivados ao longo de 12 dias de fermentação com 10% de inóculo de diferentes idades, tem-se os resultados apresentados na

Tabela 5.4 para os experimentos cultivados com inóculo com 6, 12, 15, 18 e 24 dias de crescimento.

Tab 5.4- Resultados para teor de lipídeos, quantidade de óleo produzido e biomassa para inóculos de diferentes idades para *Scenedesmus sp.*

Exp.	Idade do inóculo (dias)	Biomassa seca (g/L)	Teor de Lipídeos extraído das células (%)	Quantidade de óleo produzido por reator (g)
1	6	0,127	8,39	0,032
2	12	0,211	18,95	0,120
3	15	0,234	12,96	0,091
4	18	0,178	16,85	0,090
5	24	0,266	4,00	0,032

Na Tabela 5.4, verifica-se que no experimento 2 onde utilizou inóculo com idade de 12 dias, obteve-se 18,95% de teor de lipídeos, e 0,120 g de óleo produzido, sendo os valores máximos alcançados. Comparando o experimento 2 com os demais, verificou-se que a maior concentração de biomassa não representava maiores valores no teor de lipídeos como mostra o experimento 3 e 5. Logo, objetivando a produção lipídica, adotou-se 12 dias como o tempo de crescimento das microalgas no inóculo. Segundo Lemos *et al.* (2012), as microalgas quando reduzem sua multiplicação celular podem armazenar reservas nutricionais, e os lipídeos podem se incluir neste caso.

## 5.6 - PERFIL DO TEMPO DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS E PERFIS DO TEOR DE LIPÍDEOS, OXIGÊNIO DISSOLVIDO E DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO DURANTE O CRESCIMENTO DA MICROALGA *Scenedesmus sp.*

Visando definir o tempo de processo mais adequado para produção de bio-óleo nos biorreatores, foi avaliado os perfis de concentração de biomassa seca, teor de lipídeos, concentração de oxigênio dissolvido e a concentração de demanda química de oxigênio (DQO) no meio fermentativo em função do tempo de processo nos biorreatores em acrílico na forma retangular vertical (Figura 5.9).

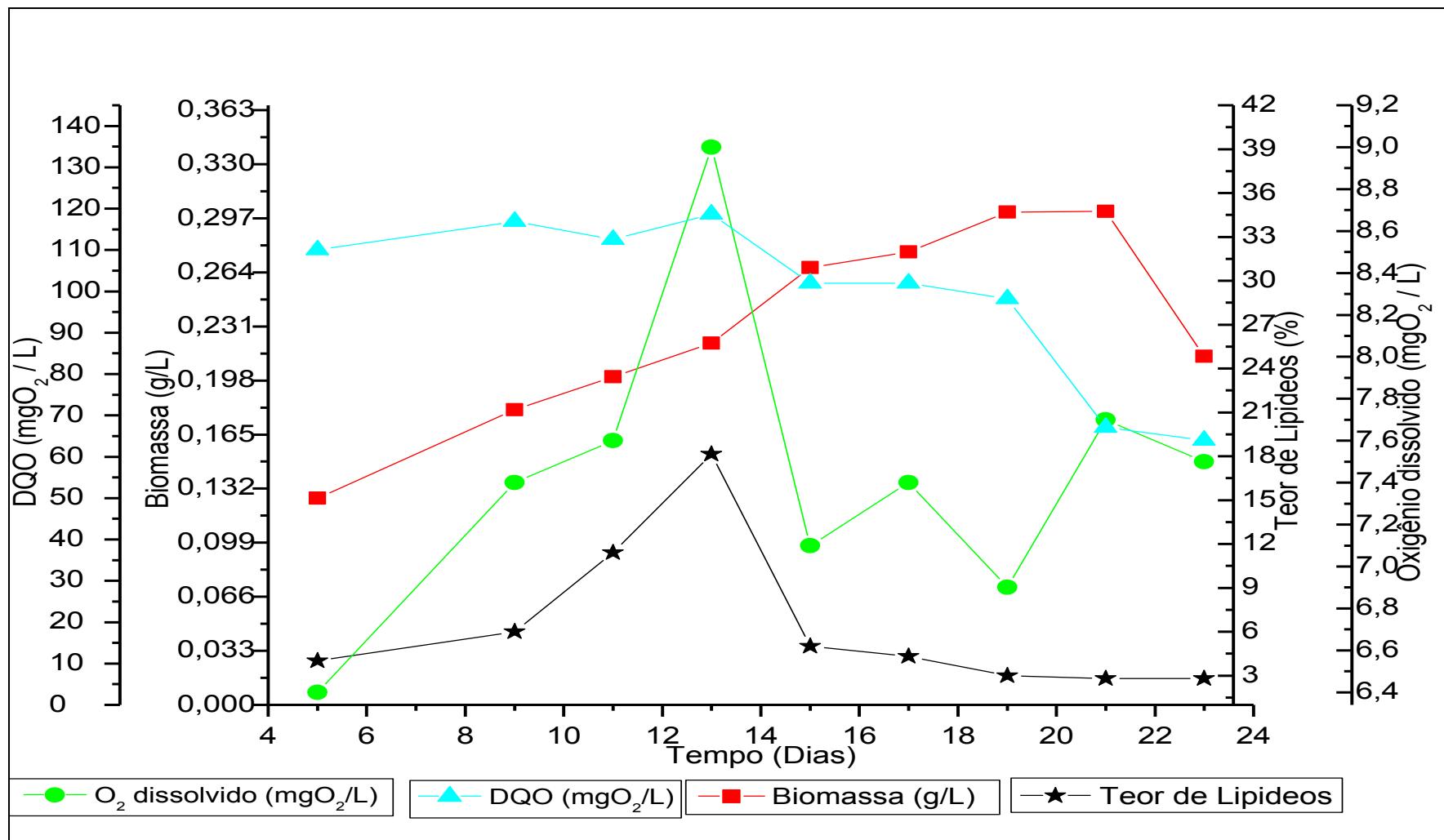


Fig. 5.9 – Perfis do teor de lipídeos (%), concentração da biomassa (g/L), DQO (mgO<sub>2</sub>/L) e oxigênio dissolvido (mgO<sub>2</sub>/L) em função do tempo de processo em reator acrílico

O perfil de crescimento apresentado na Figura 5.9 mostra que o acúmulo de lipídeos não está associado ao crescimento da microalga, expresso pela concentração de biomassa. Observa-se que quando ocorreu a maior produção de lipídeos, entre os dias 11° (11,40%) e 13° (18,15%), a concentração da biomassa era de 0,200 g/L e 0,221 g/L respectivamente. A maior produção de biomassa ocorreu no 21° dia de crescimento, com 0,301 g/L. Essa máxima produção condiz com o crescimento das microalgas de acordo com Yuan-Kun e Hui (2004), em que após este período a microalga entra em uma fase de declínio, como ocorreu no 23° dia de crescimento, em que a produção da microalga esteve em 0,213 g/L.

A concentração de oxigênio dissolvido é um parâmetro difícil de analisar devido a agitação fornecida pela corrente de ar e do oxigênio gerado fotossinteticamente pelas reações de Hill, em que ocorre a liberação de O<sub>2</sub> (FAY, 1983). Os resultados apresentados mostram que maiores teores de lipídeos foram obtidos no período em que as concentrações de oxigênio dissolvido foram maiores. Este resultado indica que o metabolismo fotossintetizante da *Scenedesmus sp.* pode estar relacionado ao de produção de lipídeos. Portanto, buscando otimizar condições operacionais, adotou-se que a melhor produção de óleo ocorreu no 12° dia de crescimento da microalga.

A Figura 5.9 mostra que a diminuição de DQO coincide com a redução do teor de lipídeos (13º dia). Este fato pode estar relacionado ao consumo de carga orgânica do meio com a redução da reserva de óleo nas microalgas.

## **5.7 - INSERÇÃO DE VITAMINAS NO MEIO DE CULTIVO DA MICROALGA *Scenedesmus sp.* EM REATORES VERTICais EM ACRÍLICO**

A Figura 5.10 apresenta os resultados obtidos para o teor de lipídeos, biomassa seca, oxigênio dissolvido e DQO para os experimentos realizados com a inserção de vitaminas nos reatores verticais em acrílico.

## Resultados e Discussão

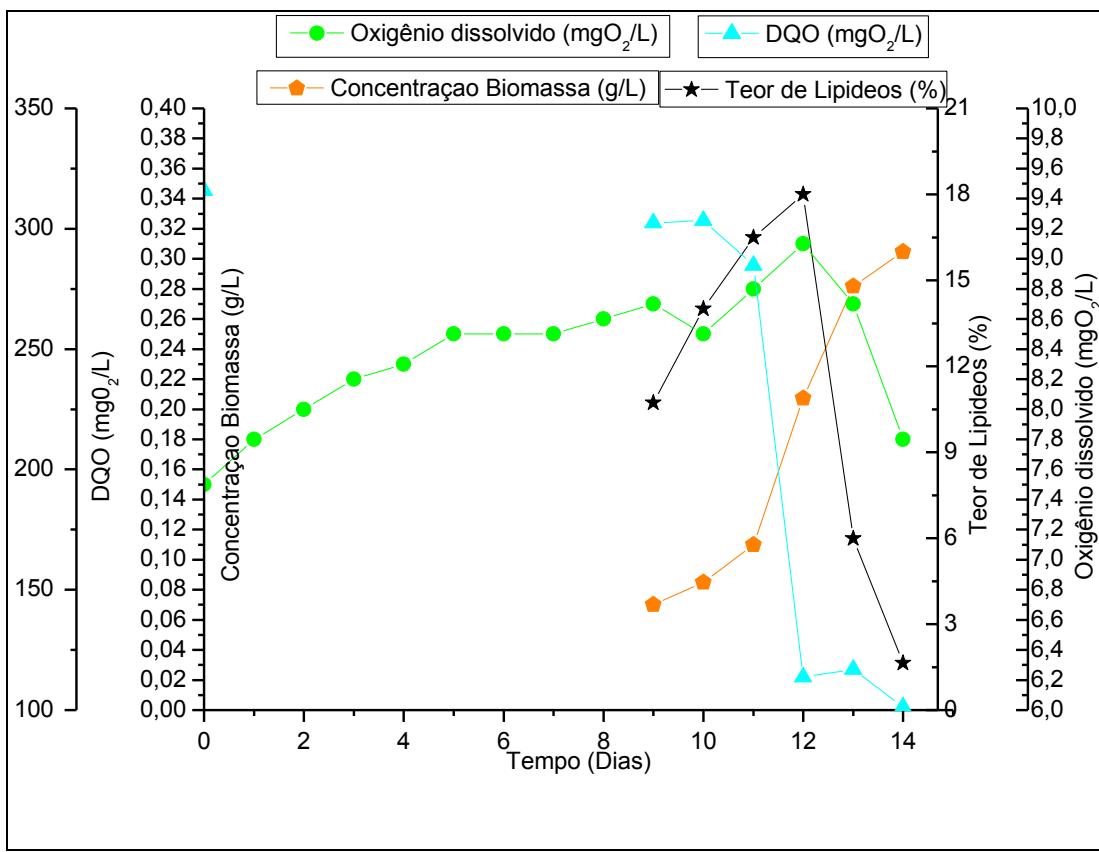


Fig. 5.10 - Perfis do teor de lipídeos (%) concentração da biomassa (g/L), DQO (mgO<sub>2</sub>/L) e oxigênio dissolvido (mgO<sub>2</sub>/L) em função do tempo de processo para reatores verticais em acrílico com vitaminas

A Figura 5.10 mostra que quando são inseridas vitaminas no meio de cultivo da *Scenedesmus sp.* o valor do teor de lipídeo e o seu comportamento foi semelhante ao processo sem adição de vitaminas, mas a quantidade de óleo foi menor (processo sem vitaminas 0,120 g de óleo, com teor de lipídeos em 18,15% e com vitaminas 0,112 g óleo e 18,00% para teor de lipídeos). Observa-se também que ocorreu uma queda na DQO próximo de 12 dias, quando houve maior produção de lipídeos e neste tempo também há um aumento na concentração de oxigênio dissolvido. Portanto optou-se por não adicionar vitaminas ao meio para a *Scenedesmus sp.*, o que representa uma economia no processo de produção do bio-óleo.

### **5.8- VARIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DOS MACRONUTRIENTES NO MEIO DE CULTIVO.**

Os resultados para os experimentos com diferentes concentrações dos macronutrientes são apresentados na Tabela 5.5.

## Resultados e Discussão

---

Tab. 5.5 – Resultado para o teor de lipídeos, quantidade de óleo produzido e biomassa para cada experimento em função das concentrações dos macronutrientes

Macronutriente	Condição	Concentração na solução-estoque (g/L)	Biomassa (g/L)	Teor de lipídeos extraído das células (%)	Quantidade de óleo produzido por reator (g)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Sem adição	0	0,075	6,78	0,015
	Metade	18,38	0,194	16,79	0,098
	Dobro	73,52	0,225	7,41	0,050
$\text{MgSO}_4$	Sem adição	0	0,057	8,72	0,015
	Metade	9,02	0,185	16,31	0,091
	Dobro	36,08	0,138	6,22	0,026
$\text{NaHCO}_3$	Sem adição	0	0,064	9,47	0,018
	Metade	6,3	0,110	9,21	0,030
	Dobro	25,2	0,064	6,01	0,012
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Sem adição	0	0,001	0,00	0,000
	Metade	5,705	0,010	7,25	0,002
	Dobro	22,82	0,230	4,34	0,030
$\text{NaNO}_3$	Sem adição	0	0,127	9,37	0,036
	Metade	42,55	0,155	2,17	0,010
	Dobro	170,02	0,150	6,68	0,030

As novas concentrações dos macronutrientes foram calculadas com base na concentração da solução-estoque proposta no meio de cultivo original ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  - 36,76 g/L;  $\text{MgSO}_4$  - 18,04 g/L;  $\text{NaHCO}_3$ , - 12,6 g/L;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  – 11,41 g/L;  $\text{NaNO}_3$ - 85,01 g/L).

Com base nos resultados apresentados na Tabela 5.5, verifica-se que a alteração das concentrações dos macronutrientes não apresentou nenhum perfil que melhorasse os teores de lipídeos e nem a quantidade de lipídeos produzida, quando comparado aos resultados apresentados na Figura 5.9, onde se obteve teor de lipídeos de 18,15%, uma quantidade de óleo de 0,120 g e concentração de biomassa 0,221 g/L. Este fato mostra que não há uma interferência positiva para a produção de lipídeos quando as concentrações dos macronutrientes são alteradas.

Assim, como individualmente os experimentos que foram realizados com a metade da concentração de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{MgSO}_4$  foram os que apresentaram maiores teores de lipídeos, estes foram reproduzidos novamente, em duplicatas, e também feito experimento combinando as metades das concentrações de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e de  $\text{MgSO}_4$  do meio tradicional, conforme os resultados da Tabela 5.6, feitos em duplicata:

Tabela 5.6 - Teste com alteração simultaneamente em  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{MgSO}_4$ .

Exp.	Condição	Biomassa (g/L)	Teor de Lipídeos extraído das células (%)	Quantidade de óleo produzido (g)
1	Metade $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e Normal $\text{MgSO}_4$	0,191	15,87	0,091
	Metade $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e Normal $\text{MgSO}_4$	0,182	16,78	0,092
2	Metade $\text{MgSO}_4$ e Normal $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,190	17,75	0,101
	Metade $\text{MgSO}_4$ e Normal $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,184	17,87	0,099
3	Metade $\text{MgSO}_4$ e Metade $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,193	14,61	0,085
	Metade $\text{MgSO}_4$ e Metade $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,190	14,57	0,083

As novas concentrações dos macronutrientes foram calculadas com base na concentração da solução-estoque proposta no meio de cultivo original ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  - 36,76 g/L;  $\text{MgSO}_4$  - 18,04 g/L;  $\text{NaHCO}_3$ , - 12,6 g/L;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  - 11,41 g/L;  $\text{NaNO}_3$ - 85,01 g/L).

Os resultados apresentados na Tabela 5.6 mostram que quando se combinam as diferentes concentrações de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{MgSO}_4$  não se conseguiu superar a quantidade de óleo lipídeos de 0,121 g e de seu teor de 18,15%. Assim, não é viável proceder com nenhuma alteração nos macronutrientes. Os resultados das Tabelas 5.5 e 5.6, mostram também que houve uma boa reproduzibilidade dos experimentos. As microalgas são uma matéria-prima promissora para a produção de biodiesel devido à sua alta taxa de crescimento, além de possuir altos rendimentos em lipídeos e capacidade para crescer em diferentes ambientes. A elevada produção de lipídeos muitas vezes só é alcançada sob determinadas condições de estresse, que impedem o crescimento destas, proporcionando uma produção ideal de lipídeos (BLATTI *et al.*, 2013).

## 5.9 -ESTUDO DA VARIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DOS MICRONUTRIENTES NA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS.

A Tabela 5.7 apresenta os resultados obtidos para biomassa seca, teor de lipídeos extraído das células e quantidade de óleo produzido pela *Scenedesmus sp.* para os experimentos em função das concentrações dos micronutrientes  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ,  $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .

## Resultados e Discussão

---

Tab. 5.7 – Resultados para o teor de lipídeos e biomassa para cada experimento em função das concentrações dos micronutrientes.

Micronutriente	Condição	Concentração na solução-estoque (g/L)	Biomassa (g/L)	Teor de Lipídeos extraído das células (%)	Quantidade de óleo produzido (g)
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	Sem adição	0	0,077	4,35	0,010
	Metade	2,18	0,081	4,11	0,010
	Dobro	8,72	0,053	13,75	0,022
	Quíntuplo	21,8	0,065	5,10	0,010
$\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Sem adição	0	0,079	8,12	0,019
	Metade	1,575	0,182	15,83	0,086
	Dobro	6,3	0,103	10,92	0,034
	Quíntuplo	15,75	0,074	7,99	0,018
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sem adição	0	0,071	9,36	0,020
	Metade	0,006	0,074	8,11	0,018
	Dobro	0,024	0,086	3,90	0,010
	Quíntuplo	0,06	0,051	6,56	0,010
$\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Sem adição	0	0,063	10,78	0,020
	Metade	0,006	0,174	16,27	0,085
	Dobro	0,024	0,079	12,36	0,029
	Quíntuplo	0,06	0,047	7,06	0,010

As novas concentrações dos micronutrientes foram calculadas com base na concentração da solução-estoque proposta no meio de cultivo original:  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  - 4,36 g/L;  $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  - 3,15 g/L;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  - 0,012 g/L;  $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,012 - g/L

Nos resultados apresentados na Tabela 5.7 verifica-se que nos experimentos em que ocorreu alteração nas concentrações dos micronutrientes não ocorreu elevação no teor de lipídeos e na quantidade de óleo produzida comparativamente em relação às condições definidas anteriormente.

Visando avaliar mais detalhadamente o efeito das concentrações de  $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  foi efetuado experimentos com diferentes concentrações destes compostos e com a repetição da metade da concentração destes, conforme mostra a Tabela 5.8

Tab. 5.8 – Reprodutibilidade dos experimentos em função da concentração de  $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 

Micronutriente	Condição	Concentração na solução-estoque (g/L)	Biomassa (g/L)	Teor de Lipídeos extraído das células (%)	Quantidade de óleo produzido (g)
$\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$\frac{1}{4}$	0,788	0,143	15,38	0,066
	Metade	1,575	0,172	16,01	0,083
	$\frac{3}{4}$	2,363	0,183	13,48	0,074
	Dobro	6,3	0,079	12,78	0,030
$\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$\frac{1}{4}$	0,003	0,164	14,88	0,073
	Metade	0,006	0,173	16,67	0,087
	$\frac{3}{4}$	0,009	0,125	14,04	0,053
	Dobro	0,024	0,107	11,72	0,038

As novas concentrações dos micronutrientes foram calculadas com base na concentração da solução-estoque proposta no meio de cultivo original:  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  - 4,36 g/L;  $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  - 3,15 g/L;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  - 0,012g/L;  $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,012 - g/L

Os resultados obtidos na Tabela 5.8, mostram que a utilização de concentrações de  $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  diferentes das empregadas na Tabela 5.7 e da utilizada inicialmente (Tabela 4.1) não proporcionaram aumento na produção de óleo e no teor de lipídeos em relação aos testes iniciais. Nesse aspecto, conclui-se que dentre os micronutrientes estudados, não é viável a alteração de suas concentrações, pois não há melhora na produção de lipídeos.

A alteração individual da concentração dos micronutrientes  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  não foi investigada neste teste, assim como feito com os demais micronutrientes, pois a literatura informa que estes apresentam papéis metabólicos já definidos na produção de lipídeos, em que estes atuam como co-fator de enzimas e no Ciclo de Krebs (LOURENÇO, 2006).

## 5.10 – OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE $\text{ZnSO}_4$ E $\text{MnCl}_2$

Para otimização da concentração de zinco e cloreto de manganês foram experimentos realizados baseados em um planejamento estatístico denominado Planejamento Composto

Central (PCC) obtido para as variáveis concentração de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $X_1$ ) e concentração de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ( $X_2$ ), conforme disposto na Tabela 5.9. Como resposta dos experimentos, foram obtidas como respostas o teor de lipídeos, expresso em %, quantidade de lipídeos produzidos, em gramas e biomassa seca (g/L). Todos os experimentos foram feitos em triplicatas nos reatores dispostos na Unidade Experimental e os resultados apresentados são a média dos valores obtidos.

Tab. 5.9 - Resultados do planejamento composto central em relação à concentração de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .

Exp.	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	Biomassa seca (g/L)	Teor de Lipídeos extraído das células (%)	Quantidade de óleo produzido (g)
1	0,022 (-1)	0,18 (-1)	0,074	30,41	0,067
2	0,022 (-1)	0,9 (+1)	0,109	26,12	0,086
3	0,11 (+1)	0,18 (-1)	0,111	25,98	0,087
4	0,11 (+1)	0,9 (+1)	0,045	19,25	0,026
5	0,00374 (-α)	0,54 (0)	0,106	31,96	0,102
6	0,1283 (+α)	0,54 (0)	0,086	17,58	0,045
7	0,066 (0)	0,03 (-α)	0,067	39,16	0,079
8	0,066 (0)	1,0495 (+α)	0,044	19,14	0,025
9	0,066 (0)	0,54 (0)	0,103	47,32	0,146
10	0,066 (0)	0,54 (0)	0,095	50,01	0,143
11	0,066 (0)	0,54 (0)	0,097	48,32	0,141

### **5.10.1 - Análise estatística a resposta Teor de Lipídeos, quantidade de óleo produzido e biomassa seca**

Para análise dos dados apresentados na Tabela 5.9, foi adotada uma área de rejeição de 5% em um teste de hipóteses *t de Student* e relacionando as variáveis independentes com a resposta teor de lipídeos e biomassa seca. As Equações 5.1, 5.2 e 5.3 descrevem os modelos empíricos ajustados para o teor de lipídeos, quantidade de óleo produzido e concentração de

biomassa seca, respectivamente, em função das variáveis significativas. Os valores dos coeficientes determinação ( $R^2$ ) foram de 0,961, 0,980 e 0,965 para as respostas teor de lipídeos, quantidade de óleo produzido e biomassa, respectivamente. Estes resultados indicam que 96,1%, 98,0% e 96,5% dos dados experimentais ajustam aos modelos de suas respectivas equações.

$$\text{Teor de Lipídeos (\%)} = 48,55 - 3,95X_1 - 4,91X_2 - 12,26X_1X_2 - 10,08X_2X_2 \quad (\text{Eq.5.1})$$

$$\text{Qtd. de óleo (g)} = 0,1432 - 0,0150X_1 - 0,0148X_2 - 0,0338X_1X_1 - 0,0447X_2X_2 - 0,0197X_1X_2 \quad (\text{Eq. 5.2}).$$

$$\text{Biomassa (g/L)} = 0,0995 - 0,0070X_1 - 0,0079X_2 - 0,0195X_2X_2 - 0,0253X_1X_2 \quad (\text{Eq.5.3})$$

Para a Equação 5.1 (teor de lipídeos) e Equação 5.2 (quantidade de óleo produzido) os valores negativos para  $X_1$  e  $X_2$  indicam que menores concentrações de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  conduzem a maiores teores de lipídeos e maior produção de óleo, conforme comparação entre os experimentos: 5 e 6, 7 e 8. Já para a resposta concentração de biomassa (Equação 5.3), os sinais negativos de  $X_1$  e  $X_2$  mostram que menores concentrações  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  levam a uma maior produção de biomassa, o que pode ser comprovado comparando os resultados obtidos nos experimentos 1 e 4 (Tabela 5.9).

A Figura 5.11 mostra a distribuição dos resíduos em torno de zero para a resposta teor de lipídeos. A distribuição dos resíduos foi aleatória em torno de zero, sem nenhuma tendência. A Figura 5.12 mostra os valores preditos em função dos observados, em que os valores observados ficaram próximos dos preditos.

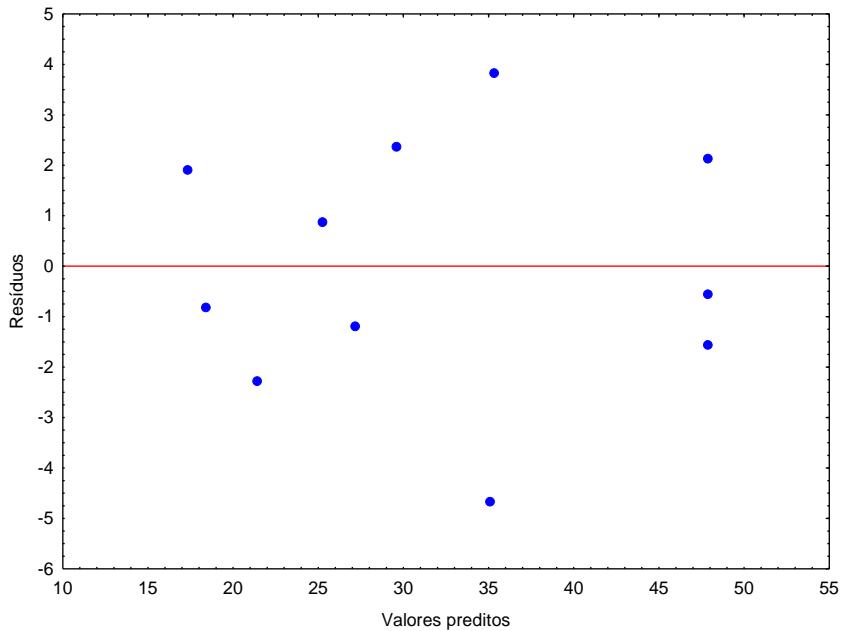


Fig. 5.11 - Distribuição dos resíduos em função dos valores preditos relativo ao teor de lipídios

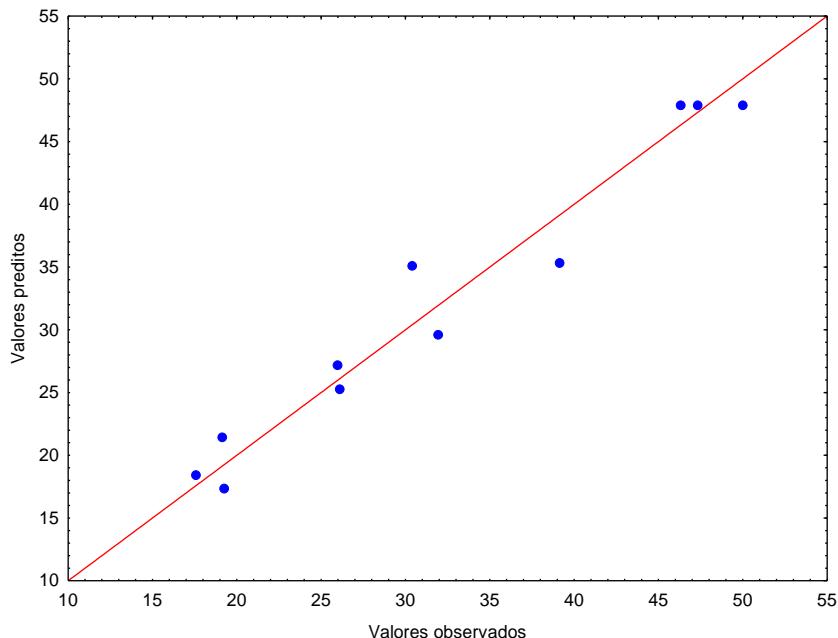


Fig. 5.12 - Valores preditos em função dos observados para o teor de lipídios

A Figura 5.13 mostra a distribuição dos resíduos em torno de zero relativos à bioamassa, sendo aleatória e sem nenhuma tendência. A Figura 5.14 mostra os valores preditos em função dos observados para a resposta biomassa, em que os observados ficaram próximos dos preditos.

## Resultados e Discussão

---

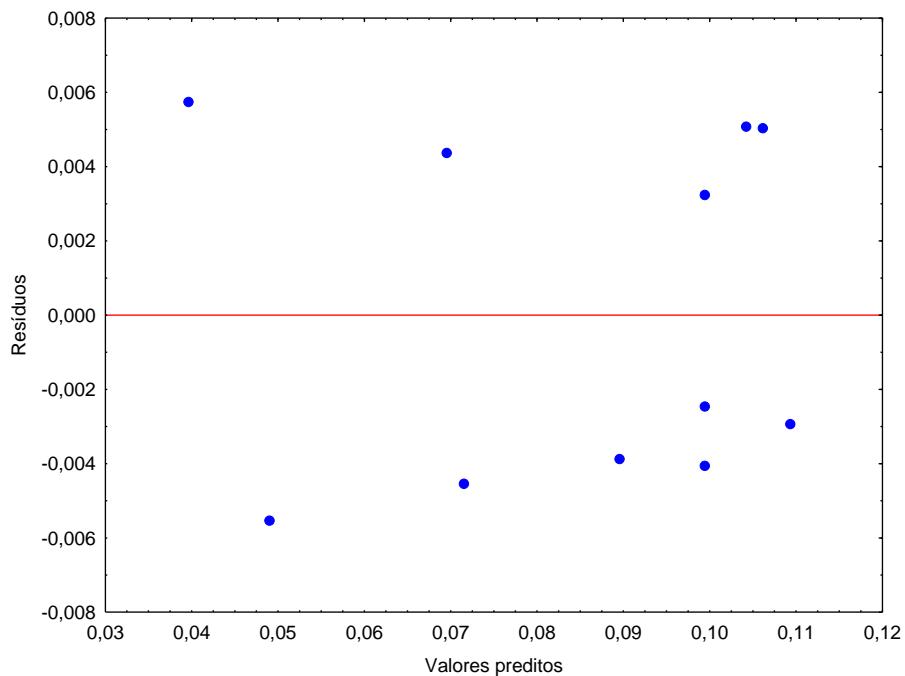


Fig. 5.13 - Distribuição dos resíduos relativo à biomassa

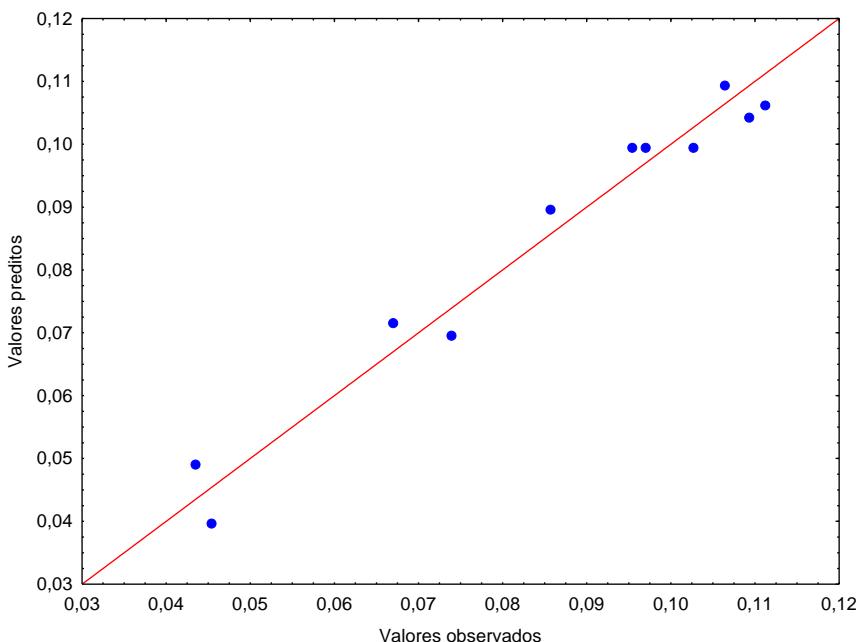


Fig. 5.14 - Valores preditos em função dos observados relativos à biomassa

Os valores reais de concentração de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  que maximizaram a resposta foram respectivamente 0,058 g/L e 0,467 g/L. Utilizando a Equação 5.1 tem-se que nesta condição foi produzido teor de lipídeos de 43,79%, com valores codificados, e na Equação 5.2, houve 0,125 g de óleo produzido, sendo próximo dos resultados de teor de lipídeos e quantidade de óleo produzido apresentado nos experimentos 9, 10 e 11, que são os

pontos centrais (47,32, 50,01, e 48,32 % respectivamente). Este fato mostra a importância de se analisar as respostas utilizando as curvas de contorno, visando obter a situação de maior viabilidade econômica. Segundo Becker (2004), o conteúdo de lipídeos de biomassa de microalgas pode variar de 1 a 40% do peso seco e em determinadas condições de cultivo podendo alcançar até 85%. Gris (2010) encontrou 36,3% de lipídeos para a *Nannochloropsis oculata* em cultivo de 11 dias em reator “*airlift*”, também utilizando o método de extração de Folch *et al* (1957) com banho ultrassônico.

Lemos *et al* (2012) obtiveram de 24 a 30% de teor de lipídeos totais durante o cultivo da *Scenedesmus sp.* durante 9 dias, sem otimização da concentração dos nutrientes presentes no meio de produção.

Utilizando na Equação 5.3 o valor calculado no ponto de otimização (0,058 g/L de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O e 0,467 g/L MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O) para a biomassa, encontra-se 0,091 g/L, sendo próximo ao valor da biomassa apresentada nos experimentos 9, 10 e 11 (0,103, 0,095 e 0,097 g/L, respectivamente), que foram as concentrações da biomassa seca no ponto central do PCC. Lemos *et al.* (2012), após 12 dias de cultivo da *Scenedesmus sp.*, obtiveram em média 0,44 g/L de biomassa seca. Neste trabalho utilizou-se 10% de volume de inóculo em galões de 10 litros. O formato do reator e o seu volume, pode justificar uma maior concentração de biomassa.

Os valores de biomassa da Tabela 5.9 foram menores do que a concentração de biomassa encontrada por Gris (2010), que encontrou de 0,2 a 0,4 g/L de biomassa seca quando do cultivo da *Nannochloropsis oculata* em fotobioreator do tipo “*airlift*”, sem a entrada de CO<sub>2</sub>, durante 11 dias de experimentos.

O efeito das variáveis concentração de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O e concentração de MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O para a resposta teor de lipídeos também pode ser visualizado nos gráficos de superfícies de resposta, conforme Figura 5.15 e sua curva de contorno (Figura 5.16).

*Resultados e Discussão*

---

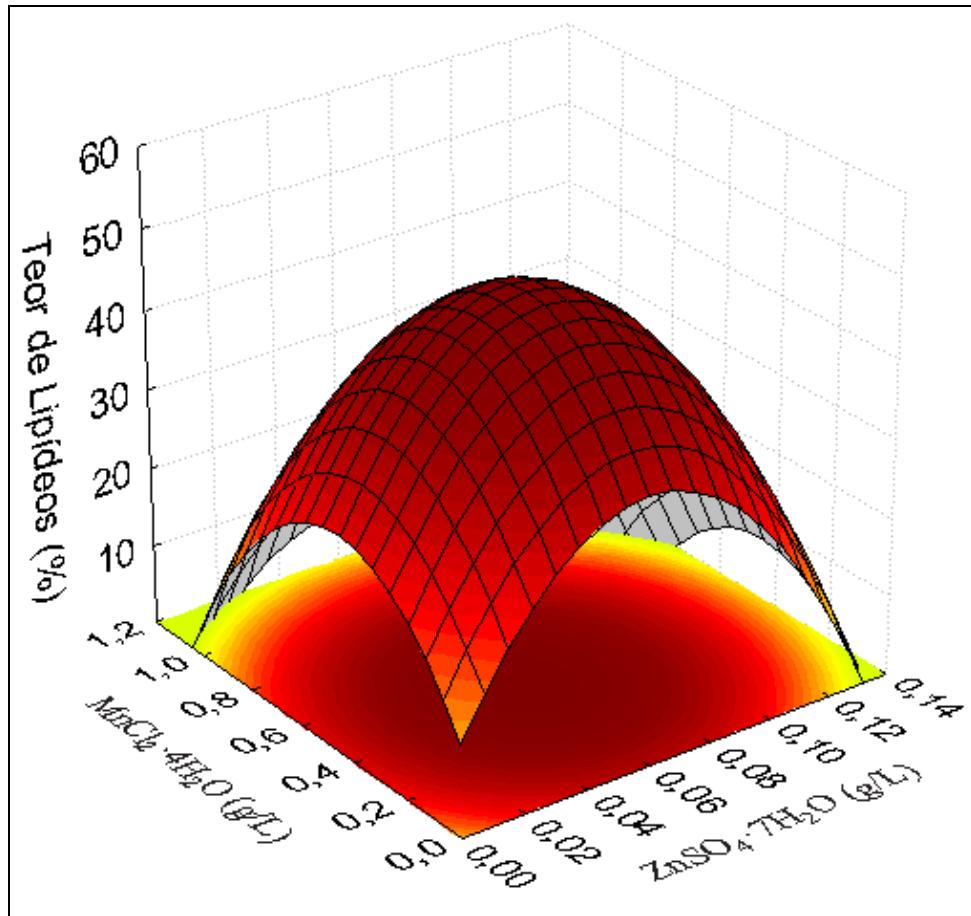


Fig. 5.15 - Superfície de resposta para o teor de lipídeos em relação à concentração  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e concentração de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

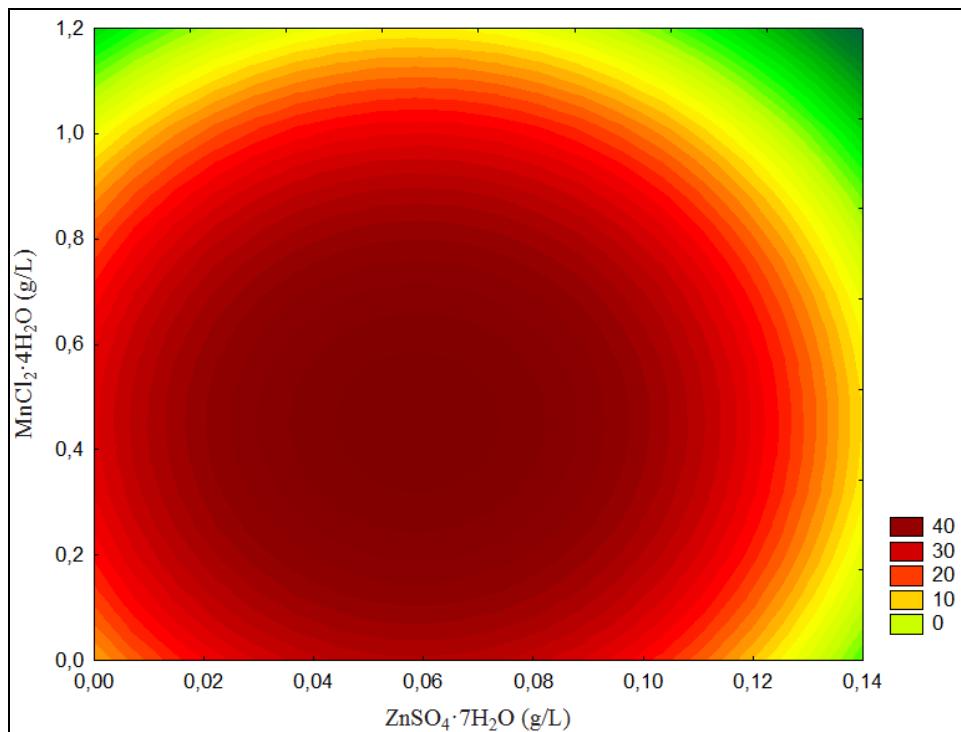


Fig. 5.16 - Curvas de contorno para o teor de lipídeos em relação à concentração  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e concentração de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Com a superfície de resposta e a curva de contorno, respectivamente apresentados nas Figuras 5.15 e 5.16 tem-se que a faixa para os melhores resultados para a maiores teores de lipídeos está aproximadamente entre 0,04 a 0,08 g/L de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  e 0,3 a 0,6 g/L de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ . Estas faixas também são visualizadas na curva de contorno para a quantidade de óleo produzido, que apresentou comportamento semelhante, conforme Figura 5.17.

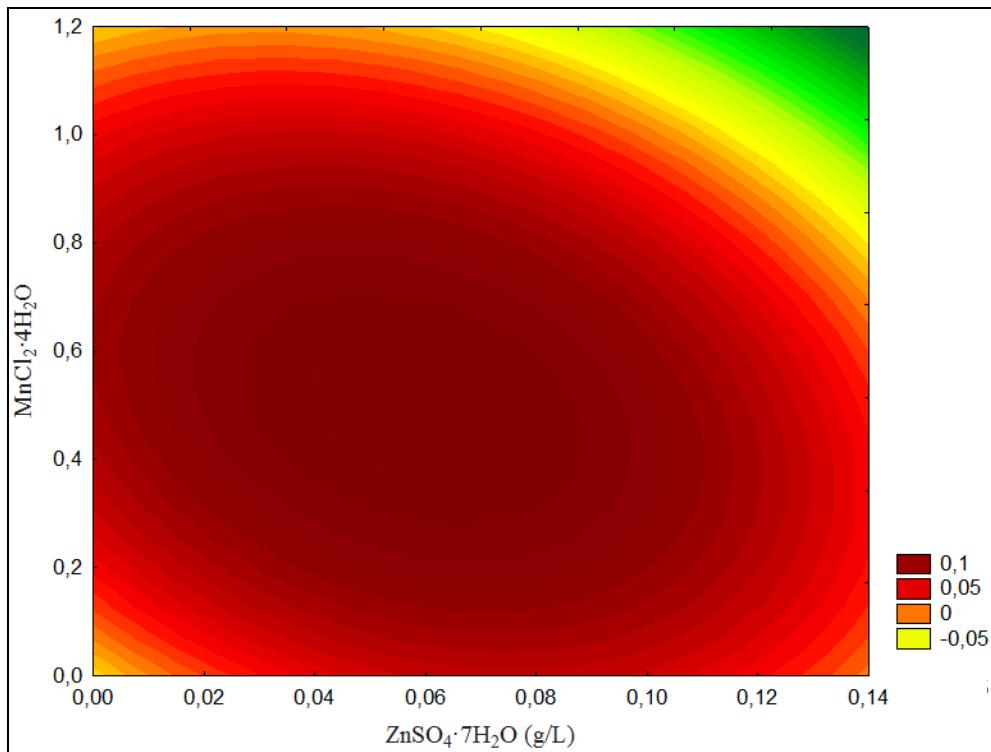


Fig. 5.17 - Curvas de contorno para a quantidade de óleo produzido em relação à concentração  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  e concentração de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$

Schroeder *et al.* (2012) obtiveram um rendimento de 12,3% de teor de lipídeos (ácidos graxos) após processo de hidrólise da microalga, em relação a massa seca utilizando a *Scenedesmus sp.* Este baixo valor pode estar relacionado a utilização de esterificação ácida para a retirada dos lipídeos e não otimização de melhores condições experimentais dos nutrientes.

O efeito das variáveis concentração de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  e concentração de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  para a biomassa pode ser visualizado nas superfícies de resposta mostrado nas Figuras 5.18 e 5.19.

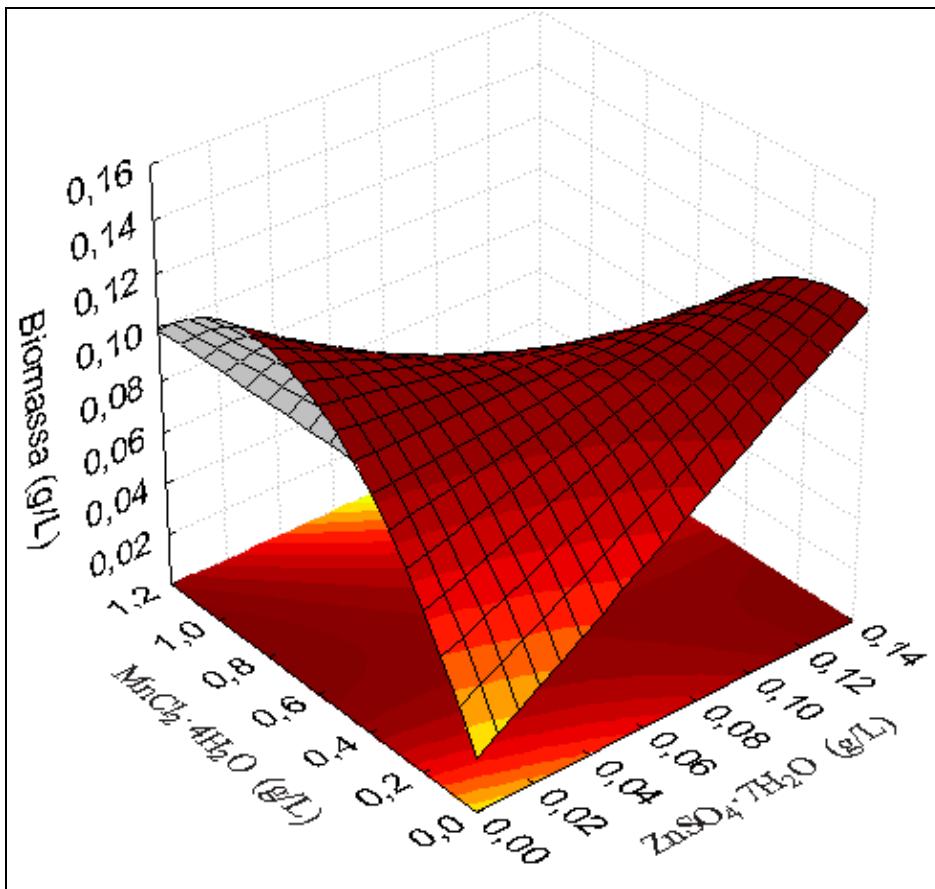


Fig. 5.18 - Superfície de resposta para a biomassa em relação à concentração  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e concentração de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

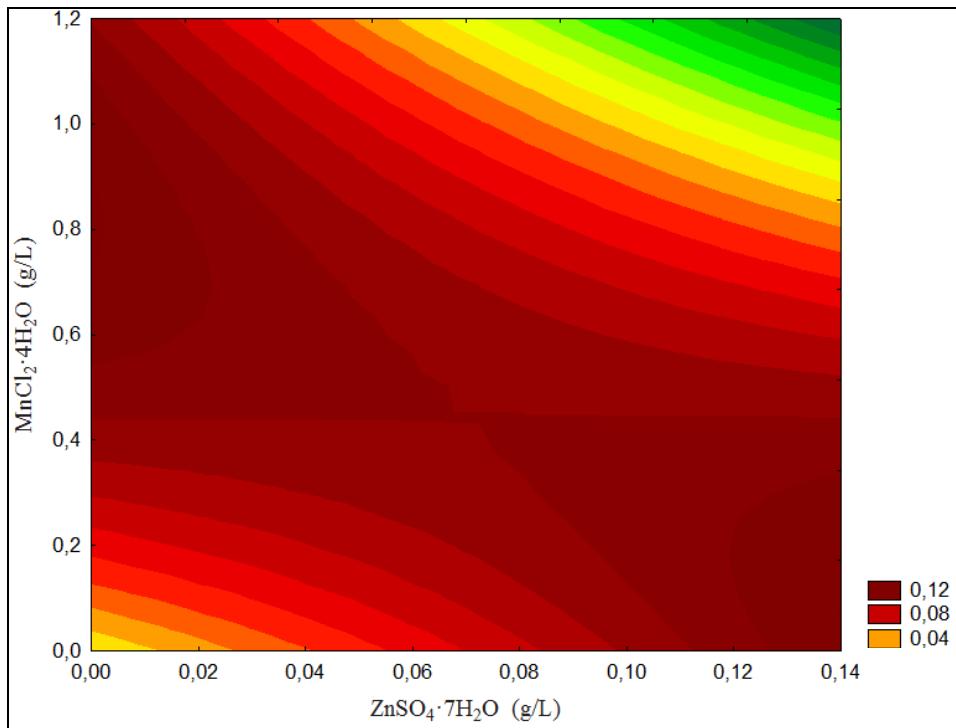


Fig. 5.19 - Curvas de contorno para a biomassa em relação à concentração  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e concentração de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Nas Figuras 5.18 e 5.19, para a resposta concentração de biomassa seca, observou-se que há duas regiões em que há maior concentração de biomassa. Observou-se que o ponto onde se encontra as concentrações de 0,058 g/L de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  e 0,467 g/L  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  está localizado próximo a estas duas regiões. Este resultado mostra que maiores teores de lipídeos foram obtidos com uma quantidade de resíduo que não foram as máximas apresentadas na Tabela 5.9.

A maior produção de óleo ocorreu quando se obteve uma menor produção da biomassa. Segundo Lemos *et al.* (2012), isso pode ocorrer porque houve limitação de nutrientes no meio, assim as microalgas reduziram sua multiplicação celular e passaram a armazenar reservas nutricionais.

Na avaliação conjunta das variáveis, foi possível observar que quando se obteve maior quantidade de óleo produzido nos experimentos obteve-se também maior crescimento da biomassa, embora isso não aconteça necessariamente em todos os experimentos, como no experimento 6, em que a quantidade de óleo produzida foi pequena (teor de lipídeos 17,58% e 0,045 g de óleo produzido) se comparada com as demais onde houve crescimento celular significativo (0,086 g/L).

Analizando a região de otimização (obtida por meio das superfícies de resposta), e os resultados determinados na condição central do PCC, foi considerado como sendo as melhores condições em relação a resposta teor de lipídeos: concentração de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0,06 g/L e concentração de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  de 0,5 g/L.

#### ***5.10.2 - Reprodutibilidade nas melhores condições experimentais do PCC***

A reproduzibilidade do processo foi feita objetivando confirmar os resultados obtidos nos pontos centrais do PCC (experimentos 9, 10 e 11 da Tabela 5.9) e a condição selecionada (0,06 g/L de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  e 0,5 g/L de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ). A Tabela 5.10 mostra os resultados em um comparativo com os pontos centrais do PCC.

Resultados e Discussão

Tab. 5.10 - Comparativo entre os resultados dos pontos centrais do PCC e reprodução do melhor ponto na condição otimizada.

Exp.	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (g/L)	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O (g/L)	Biomassa (g/L)	Teor de Lipídeos extraído das células (%)	Quantidade de óleo produzido por reator (g)
Melhor ponto	0,06	0,5	0,099	47,50	0,141
9	0,066	0,54	0,103	47,32	0,146
10	0,066	0,54	0,095	50,01	0,143
11	0,066	0,54	0,097	48,32	0,141

De acordo com as respostas obtidas na condição selecionada pode-se dizer que a escolha da condição foi satisfatória. Os resultados mostraram que a análise conjunta das variáveis empregando planejamento de experimentos e utilizando uma faixa adequada para as variáveis de processo proporcionaram uma melhora de 161,7% no teor de lipídeos e de 16,9% na quantidade de óleo produzida e redução de 55,32% na concentração de biomassa seca. Segundo Oliveira (2013), o teor de lipídios da *Scenedesmus* sp. pode variar de 11 a 20 %, em cultivos padrões, quando não há otimização das variáveis de processo. Verifica-se que o teor de lipídeos obtido neste trabalho foi superior à faixa definida pelo autor supracitado.

---

## CAPÍTULO 6

### CONCLUSÕES

---

A partir dos resultados, foi possível concluir que:

- Entre as microalgas *Scenedesmus sp.*, *Spirulina platensis*, *Nannochoropsis oculata* e *Chlorella sp*, a microalga mais viável para a produção de bio-óleo na região de Uberlândia foi a *Scenedesmus sp.*, em reatores verticais em acrílico, com 12 dias de experimento.
- A otimização dos nutrientes do meio de cultivo da *Scenedesmus sp*, mostrou que a produção de lipídeos é favorecida quando se trabalha com 0,06 g/L de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O e 0,5 g/L de MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, representando uma melhora de 161,7% no teor de lipídeos e de 16,9% na quantidade de óleo produzida e redução de 55,32% na concentração de biomassa seca.
- O aprimoramento do processo de produção de lipídeos e utilização da microalga para tratamento de efluentes industriais, torna-se uma questão tecnológica e de engenharia, buscando reduzir custos dos sistemas heterotróficos e sendo uma alternativa interessante na produção de bio-óleo a partir da biomassa de microalgas.

---

## CAPÍTULO 7

### SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

---

- Cultivar as microalgas *Spirulina platensis*, *Nannochoropsis oculata* e *Chlorella sp*, em meio com efluentes industriais, verificando crescimento celular e lipídeos produzidos;
- Analisar a produção de lipídeos pelas *Spirulina platensis*, *Nannochoropsis oculata* e *Chlorella sp*, utilizando 20% de volume de inóculo;
- Verificar a remoção de carga orgânica da *Nannochoropsis oculata* quando cultivada em soro de leite ou algum outro efluente;
- Analisar o perfil de absorção e desorção de CO<sub>2</sub> pelas *Spirulina platensis* e *Nannochoropsis oculata*;

---

## CAPÍTULO 8

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABDEL-RAOUF, N.; A.A. AL-HOMAIDAN, A. A.; IBRAHEEM, I. B. M. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 19, p. 257-275, 2012.

ABIQ, Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. Disponível em:< <http://www.abiq.com.br/>>. Acesso em: 30/12/13

AHMAD, A.L.; YASIN, N.H.M.; DEREK, C.J.C.; LIM, J.K. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: a review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 15, p. 584-593, 2011.

AMARO, H. M., GUEDES, A. C; MALCATA, F.X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. Applied Energy, v.88, p.3402-3410, 2011.

AMIN, S. Review on biofuel and gás production process from microalgae. Energy Conversion and Management. Indonesia, 50, 1834-1840, 2009.

ANDRADE, R. L. P. de; MARTINS, J. F. P. Influência da adição da fécula de batata-doce sobre a viscosidade do permeado de soro de queijo. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 22, n. 3, p. 249-253. 2002.

ANTUNES, Aloísio José. Funcionalidade de Proteínas do Soro de Leite Bovino. Barueri: Manole, 137 p., 2003.

APHA (American Public Health Association); AWWA (American Water Works Association); WEF (Water Environment Federation). Standard Methods for the examination of water and wastewater; 21 ed. APHA, Washington, DC, 1998.

ARNOLD, F. H.; HAYMORE, B. L. Engineered metal-binding proteins: purification to protein folding. Science (Washington DC) 252: 1796-1797. 1991.

AZEREDO, V. B. S. Produção de Biodiesel a partir do cultivo de microalgas: estimativa de custos e perspectivas para o Brasil. 188 f. Dissertação (Mestrado em Planejamento Energético) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

BALSASSO, C.. Concentração, purificação e fracionamento das proteínas do soro lácteo através da tecnologia de separação por membranas. 179 f. Dissertação Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. In: RICHMOND, A. (Ed). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. London: Blackwell Science. P.312-351. 2004.

---

Referências bibliográficas

---

- BEER, L. L.; BOYD, E. S.; PETER, J. W. & POSEWITZ, M.C. Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. Current Opinion in Biotechnology, 20: 264-271. 2009.
- BEHERENS, P. W. Photobioreactor and fermentors: the light and dark sides of growing algae. In ANDERSEN, R. A. Algal Culturing Techniques. United States of America: Elsevier, Inc, 2005, p.189-203.
- BENEDET, H. D.; MOURA, J. P.; OLIVEIRA, M. C. Caracterização química e avaliação sensorial de bebida hidroelectrolítica fermentada obtida a partir de permeado de leite tipo C. Revista Analytica. n. 23, p. 78-83. 2006
- BLATTI, J. L.; MICHAUD, J.; BURKART, N. D. Engineering fatty acid biosynthesis in microalgae for sustainable biodiesel. Curr. Opin. Chem. Biol. 17. 2013.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, T. S. Statistics for Experimenters. United States of America and Canada, John Wiley & Sons, Inc., 1978.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae – a review of Technologies for production, processing, and extractions of biofuels and coproducts. Renewable and sustantable energy reviews. Irland, 14, 557-577, 2010.
- BRONSTEIN, V. MONTE ALEGRE, R. Estudo dos parâmetros de ultrafiltração de permeado de soro de queijo fermentado por *Lactoccoccus lactis* subsp. *lactis*. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, vol. 18, n.I, 1998.
- BROWN, R.; JEFFREY, S. W.; VOLKMAN, J.K., DUNSTAN, G.A. Nutritional properties of microalgae for mariculture. Aquaculture. Australia, 51, 315-331, 1997.
- CARMINATTI, C. A. Ensaios de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando beta-galactosidase Kluyveromyces lactis. 2001. 79 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances. New Zeland, 25, 294-306, 2007.
- CHIU, Sheng-YI.; KAO, Chien-Ya; TSAI, Ming-Ta; ONG, Seow-Chin; CHEN, Chiun-Hsun; LINM Chih-Sheng.. Lipid accumulation and CO<sub>2</sub> utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO<sub>2</sub> aeration. Bioresoure Technology, v.100, p. 833 – 838, 2009
- CHOI, J.-A.; HWANG, J.-H.; DEMPSEY, B. A.; ABOU-SHANAB, A. I. R.; MIN, B.; SONG, H.; LEE, D. S.; KIM, J. R.; CHO, Y.; HONG, S.; JEON, B.-H. Enhancement of fermentative bioenergy (ethanol/hydrogen) production using ultrasonication of *Scenedesmus obliquus* YSW15 cultivated in swine wastewater effluent. Energy Environmental Science, v. 4, p. 3513–3520, 2011.
- CONSTANTOPOULOS, G. Lipid metabolism of manganese-deficient algae: Effect of manganese deficiency on the greening and the lipid composition of *Euglena grailis*. Plant physiology. January. 45: 0032-0889. 1970

---

Referências bibliográficas

---

- CUARESMA, M.; GARBAYO, I.; VEGA, J.M.; VÍLCHEZ, C. Growth and photosynthetic utilization of inorganic carbon of the microalga Chamydomonas acidophila. isolated from Tinto river. Enzyme and Microbial Technology.n.40.p.158-162, 2006.
- DAY, J. G.; THOMAS, N. J.; ACHILLES, U. E. M.; RAYMOND, J. G.; Leakey R. J. G.. Early detection of protozoan grazers in algal biofuel cultures. Bioresour. Technol. 114, 715–719 10.1016/j.biortech.2012.03.015. 2012
- DERNER, Roberto Bianchini; OHSE, Silvana; VILLELA, Maurício . Microalgas, produtos e aplicações. Ciência Rural, v. 36, n.6, p.1959-1967, 2006.
- FALKOWSKI, P. G.; RAVEN, J. A. Aquatic photosynthesis. Blackwell Science, Oxford, UK, 375p., 1997.
- FAY, P. The blue greens (cyanophyta – cyanobacteria), 5° Ed. London, Ed. Edward Arnold, 88pp, 1983.
- FENG, Y.; LI, C.; ZHANG, D. Lipid production of Chlorella vulgaris cultured in artificial wastewater medium. Bioresource Technology, v. 102, p. 101-105, 2011.
- FIERKE, C. A.; McCALL, K. A.; HUANG, C. C. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. Journal of Nutrition. 130: 1237-1226. 2000.
- FOLCH, J; LEES, M. STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Che,v. 22, p. 497-509, 1957.
- GÄNZLE, G. M.; HAASE, G.; JELEN, P. Lactose: Crystallization, Hydrolysis and Value-added Derivates. International Dairy Journal Elsevier. Canadá, p. 685 – 694, 2008.
- GRIS, Lara Regina Soccol. Produção de microalga Nannochloropsis oculata em fotobioreatores Airlift. Porto Alegre, Universidade Federal de Rio Grande do Sul. 148 p. 2010.
- GRIS, L. R.. S.; PAIM, A. C.; FARENZENA, M.; TRIERWILER, J. O. Laboratory apparatus to evaluate microalgae production. Brazilian Journal of Chemical Engineering. Vol. 30, n. 03, pp 487-497, 2013.
- GODOS, I.; VARGAS, V. A.; BLANCO, S.; GONZÁLEZ, M. C. G.; SOTO, R.; GARCÍA-ENCINA, P. A.; BECARES, E.; MUÑOZ, R. A comparative evaluation of microalgae for the degradation of piggery wastewater under photosynthetic oxygenation. Bioresource Technology, v. 101, p. 5150–5158, 2010
- GODOY, Hânia, Cardamoni; CAMARGO, Janina Zanoni; CARVALHO, Emerson Machado; NAKAGAKI, Jelly Makoto; FONSECA, Gustavo Graciano; MINILLO, Alessandro. Desempenho no crescimento de microalgas potencialmente produtoras de biodiesel em exposição ao CO<sub>2</sub>. Anais do 7º Congresso Internacional de Bioenergia. São Paulo. 2012.
- GUILLARD, R. R. L. Culture of marine invertebrate animals. Plenum, New York, USA, p. 29-6. 1975.

---

*Referências bibliográficas*

- GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. Yellow-green algae with chlorophyllid-c. *Journal of Phycology*, 8: 10-14. 1972.
- GÜVEN, G; PERENDECI, A; TANYOLAÇ, A. Electrochemical treatment of deproteinated whey wastewater and optimization of treatment conditions with response surface methodology. *Journal of Hazardous Materials*, v. 157, n. 1, p. 69-78, 2008.
- HARRIS, D.C. *Análise Química Quantitativa*, 6<sup>a</sup> ed. Brasil: LTC, 2005.
- HARWOOD, J. L.; GUSCHINA, I. A. Guschina. "The versatility of algae and their lipid metabolism." *Biochimie* 91(6): 679-684. 2009.
- HO, S-H.; LU, W-B; CHANG, J-S. Photobioreactor strategies for improving the CO<sub>2</sub> fixation efficiency of indigenous *Scenedesmus obliquus* CNW-N: Statistical optimization of CO<sub>2</sub> feeding, illumination, and operation mode. *Bioresource Technology*, v. 105, p. 106-113, 2012.
- HOEKMAN, S.K.. Biofuels in the U.S. – Challenges and Opportunities. *Renewable Energy*, 34:14–22, 2009.
- HUANG, G., CHEN, F., WEI, D., ZHANG, X. & CHEN, G. 2010. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy*, 87: 38- 46.
- JAISWAL, P.; KASHYAP, A. 2002. Isolation and characterization of mutants of two diazotrophic cyanobacteria tolerant to high concentrations of inorganic carbon. *Microbiol. Res.* 157, 83-91. 2002.
- JANAUN, J. E; ELLIS, N. Perspectives on biodiesel as a sustainable fuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(4): 1312-1320. doi:10.1016/j.rser.2009.12.011. 2010.
- JOVENTINO, I.P.; ALVES, H.G.; NEVES, L.C.; PINHEIRO-JOVENTINO, F.; LEAL, L.K.; NEVES, S.A.; FERREIRA, F.V.; BRITO, G.A.; VIANA, G.B. The microalga *Spirulina platensis* presents anti-inflammatory action as well as hypoglycemic and hypolipidemic properties in diabetic rats. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, v. 9, 2012. DOI: 10.1515/1553-3840.1534.
- KITTO, M. R. Is erthen unmixed pond culture technology for Dunaliella, the only way to beat hight natural B-carotene prices? Disponível em <<http://en.ergomix.com/MA-aquaculture/articles/earthen-unmixed-pond-culture-t2283/p0.HTM>>. Acesso em 16/02/2013., 2012
- LAVÍN, P.L.; LOURENÇO, S.O. . An evaluation of the accumulation of intracellular inorganic nitrogen pools by marine microalgae in cultures. *Brazilian Journal of Oceanography*, São Paulo, v. 53, n.1/2, p. 55-68, 2005.
- LEE, R. E. *Phycology*. 4<sup>a</sup> ed. Cambridge University Press. 547p. 2008.

---

Referências bibliográficas

---

- LEMOS, Jacqueline de Souza; MARIANO, André Bellin; VARGAS, José Viriato Coelho. Análise econômica da produtividade de microalgas *Scenedesmus sp.* Voltada à produção de biodiesel. Anais do 7º Congresso Internacional de Bioenergia. São Paulo. 2012.
- LOBBAN, C. S; HARRISON, P. J. Seaweed Ecology and Physiology. Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge. 366 p. 1994.
- LOPERA, Jesús Emilio Pinto; ALFARO, Sadek C. Absi; MOTTA, José Mauricio S. T. Empirical modeling of projected spray transfer in GMAW processes. Soldag. Insp. Vol.17. no4. São Paulo. 2012.
- LOPES, Eduardo Jacob; SCOPARO, Carlos Henrique Gimenes; FRANCO, Telma Teixeira. Rates of CO<sub>2</sub> removal by *Aphanethece microscopica Nageli* in tubular photobioreactors, Chem. Eng. Process. (2007), doi:10.1016/j.cep.2007.06.004
- LOURENÇO, S. de O. Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações. Brasil: Rima, 2006.
- LOURENÇO, S. O.; BARBARINO, E.; LAVÍN, P. L.; LANFER, M. U. M. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: Calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. European Journal of Phycology, 39(1), 17-32. 2004.
- LUNDQUIST, T. J.; WOERTZ, I.C.; QUINN, M. W. T.; BENEMANN, J. R. A Realistic Technology and Engineering Assessment of Algae Biofuel Production. Berkeley: Energy Biosciences Institute, Universidade da California, 2010. 178 p. Relatório técnico.
- MAGALHÃES, K. T.; PEREIRA, M. A.; NICOLAU, A.; DRAGONE, G.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J. A.; SILVA, J. B. A.; SCHWAN, R. F. Production of fermented cheese whey-based beverage using kefir grains as starter culture. Evaluation of morphological and microbial variations. Bioresource Technology, v. 101, p. 8843-8850, 2010.
- MARTINEZ, M.E.; SANCHEZ, S.; JIMENEZ, J.M.; YOUSFI, F.E.; MUÑOZ, L. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalgae *Scenedesmus obliquus*. Bioresource Technology, v. 73, p. 263–272, 2000.
- MALLICK, N. *et al.* Green microalgas *Chorella vulgaris* as a potential feedstock for biodiesel. J. Chem. Technol. Biotechnol., v.87, p.137-145, 2012.
- MASOJÍDEK, J.; KOBLÍZEK, M.; TORZILLO, G. Photosynthesis in microalgae. In: Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology, 1 ed.; Oxford, Ed. Blackwell Science Ltd., 2004, p. 19-20.
- MATA, T. M., A. A. MARTINS E N. S. CAETANO. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14(1): p. 217-232, 2010.
- MIAO, X. & WU, Q. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. Bioresource Technology, 97: 841-846.

---

Referências bibliográficas

---

MIZUBUTI, I. Y. Soro de Leite: Composição, Processamento e Utilização na Alimentação. In: Semana Ciências Agrárias, 1994. v. 15, n. 1.

MORAES, Luiza; ROSA, Gabriel Martins; SOUZA, Michele da Rosa Andrade Zimmermann; COSTA, Jorge Alberto. Biofixação de CO<sub>2</sub> e produção de biomassa por Spirulina sp. LEB-18 em diferentes biorreatores. Anais do 7º Congresso Internacional de Bioenergia. São Paulo. 2012.

MORAIS, M.; COSTA, J. Biofixation of carbon dioxide by Spirulina sp. and Scenedesmus obliquus cultivado in a three-stage serial tubular photobioreactor. Journal of Biotechnology. v. 129, p. 439-445, 2007.

MOREIRA, A; SILVA, A.; ANTUNES, M. Soro de Leite: de resíduo a alimento. Alim. Nutr., v. 4, p.32-35. 2000

MUÑOZ, R. T.; KÖLLNER, C.; GUIEYSSÉ, B.; MATTIASSEN, B. Photosynthetically oxygenated salicylate biodegradation in a continuous stirred tank photobioreactor. Biotechnology and Bioengineering. n.87. p.797-803, 2004.

OHSE, S.; DERNER, R. B.; OZÓRIO, R. A.; CUNHA, P. C. R; LAMARCA, C. P.; DOS SANTOS, M. E.; MENDES, L. B. B. Revisão: sequestro de carbono realizado por microalgas e florestas e a capacidade de produção de lipídios pelas microalgas. INSULA, v.36, p. 39-74, 2007.

OLIVEIRA, Amanda Cristina. Produção de biomassa de microalgas Scenedesmus sp. em efluente de bovinocultura biodigerido. Universidade Federal do Paraná. Engenharia e Ciência dos materiais. Dissertação de mestrado, 2013.

POSTBEITENMILLER, D.; ROUGHAN G; OHLROGGE, J. D. Regulation of plant fatty acid biosynthesis : Analysis of acyl-coenzyme A and acyl-acyl carrier protein substrate pools in spinach and pea chloroplasts. Plant Physiol. 100(2): 923-930. 1992.

RANJBAR, R.; INOUE, R.; KATSUDA, T.; YAMAJI, H.; KATOH, S. High efficiency production of astaxanthin in an airlift photobioreactor. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 106, n. 2, p. 204–207, 2008.

RAMIREZ, N. N. V.; BRESOLIN, J.; TRIERWEILER, O.; FARENZENA, M. Avaliação do uso de vinhaça para cultivo de Scenedesmus sp. XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos. Foz do Iguaçu-PR. 2013.

RAVEN, P. H.; EVERET, R. F.; EICHHORN, S. E.; Biologia Vegetal. 7a ed. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 830 pp. 2007.

RICHMOND, A. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Science, 2004.

RODRIGUES, Maria Izabel; IEMMA, Antônio Francisco. Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos. 1a Ed. Campinas-SP. Casa do Pão Editora. 2005.

---

Referências bibliográficas

---

- SCHMIDT, C. J. B.. Aislamiento, purificación, y mantenimiento de cepas de microalgas. In: VEGA, B.O.A.; VOLTOLINA, D.. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. 1. ed. La Paz: Centro de Investigaciones biológicas Del Noroeste (CIBNOR) p 1 – 16. 2007
- SHENG-YI, C.; CHIEN-YA, K.; MING-TA, T; SEOW-CHIN, O.; CHIUN-HSUN, C.; CHIH-SHENG, L. Lipid accumulation and CO<sub>2</sub> utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO<sub>2</sub> aeration. Bioresource Technology. Taiwan, 100, 833-838, 2009.
- SCHROEDER, Luiza; ROCHA, Cassiana Batista da; BAUMGARDT, Francis Josiane Liana; MARIANO, Luiz Pereira Ramo André; VAR, José Viriato Coelho. Avaliação da extração de ácidos graxos da microalga *Scenedesmus* sp. para a produção de biodiesel. Anais do 7º Congresso Internacional de Bioenergia. São Paulo. 2012
- SILVA, D. J. P., PEREIRA, V. F., BARROS, F. A. R., MOTTA, F. B., ARAÚJO, M. A., PASSOS, F. J. V.; Gerenciamento de resíduos em uma indústria de produtos lácteos. Revista Leite e Derivados. Ano XV. n. 91, p. 26-37, Maio/Junho 2006.
- SINGH, J.; GU, S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. Renewable Sustainable Energy Reviews, v. 14, p. 2596-2610, 2010.
- SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E; ISAMBERT, A. Commercial Applications of Microalgae. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 101, n.2, p. 87-96, 2006.
- STANKIEWICZ, E. H.; ANDRADE, L. F.; DOMINGUES, L. L.. Levantamento ficológico do Rio Iguaçu, algas unicelulares – I. 1. ed. Curitiba: SURHEMA, 1981.
- SUBRAMANIAN, G.; THJUDDIN, N. Cyanobacterial Biodiversity and potential application in Biotechnology. Current Science 89(1): 47-57. 2005.
- SUNDA, W.G., PRICE, N.M. & MOREL, F.M.M. 2005. Trace metal ion bufferes and their use in culture studies. In Algal Culturing Techniques (R.A. Andersen, ed.). Elsevier Academic Press, London, p.35-64.
- TOMASELLI, L. The microalgal cell. In RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. England: Blackwell Publishing, p. 3-19, 2004.
- TREDICI, M. Mass production of microalgae: photobioreactors. In RICHAMOND, A. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. England: Blackwell Publishing, 2004, 0. 178 – 214.
- TREMARIN, A. Condições operacionais na hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, p.11. 2007.
- VALLEE, B; L. A synopsis of zinc biology and pathology in zinc enzymes. (Bertini, I. & Gary, H. B., eds.) Birkhauser, Boston. 1986

---

*Referências bibliográficas*

- VONSHAK, A.; TORZILLO, G. Environmental stress physiology. In RICHMOND, A. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. England: Blackwell Publishing, 2004, p. 57-82.
- WIDJAJA, A.; CHIEN, C.C.; JU, Y.H.. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, v. 40, p. 13-20, 2009
- WILLIAMS, P. J.; LAURENS, L. M. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & Analysis of the biochemistry energetic & economics. 3, 554-590. 2010
- XIONG, W.; LI, X.; XIANG, J.; WU, Q. High-density fermentation of microalga Chlorella protothecoides in bioreactor for microbio-diesel production. Applied microbiology and biotechnology, v. 78, p.29-36, 2008.
- YEN, H-W.; CHIANG, W.-C.; SUN, C.-H. Supercritical fluid extraction of lutein from Scenedesmus cultured in an autotrophical photobioreactor. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, v. 43, p. 53–57, 2012.
- YUAN-KUN, L.; HUI, S. Basic culturing techniques. In RICHMOND, A. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. England: Blackwell Publishing, 2004, p. 40-56.
- ZHENG, Y.; CHI, Z.; LUCKER, B.; CHEN, S. Two-stage heterotrophic and phototrophic culture strategy for alga biomass and lipid production. Bioresource Technology, v. 103, p. 484-4889, 2012.
- ZIMMER, T. R. Influência da carga orgânica e do tempo de enchimento sobre o desempenho do reator anaeróbio em batelada seqüencial com biomassa granulada tratando soro de queijo. 2006. 160f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

---

## CAPÍTULO 9

### APÊNDICES

---

#### APÊNDICE 1

##### ESPECTROSCOPIA VISÍVEL - RELAÇÃO ENTRE ABSORBÂNCIA E PESO SECO – CURVA DE CALIBRAÇÃO *Scenedesmus sp*

A Figura 9.1 apresenta a relação entre valores de absorbância em monitoramento das amostras e peso seco. Com a equação de reta obtida, a leitura em absorbância pode ser transformada em concentração de biomassa, em g/L.

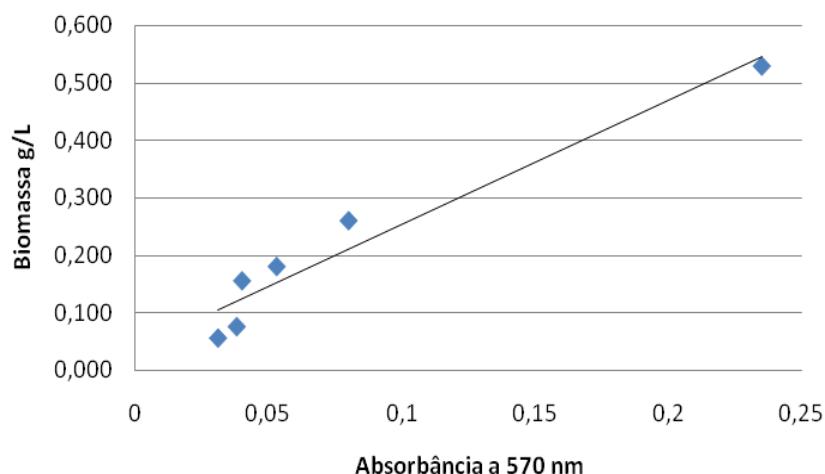


Fig. 9.1 – Relação entre a absorbância e peso seco para a alga *Scenedesmus sp.*

Pela Figura 9.1 obtém-se as curva de calibração para concentração de biomassa. Assim, a Equação 9.1 apresenta a concentração de biomassa (g/L) em função da absorbância, com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,941.

$$\text{Biomassa. (g/L)} = 2,158 \cdot X + 0,037 \quad (\text{Eq. 9.1})$$

Em que:

X = valor da leitura em Absorbância no comprimento de onda adotado

**APÊNDICE 2**  
**ESPECTROSCOPIA VISÍVEL - RELAÇÃO ENTRE ABSORBÂNCIA E PESO**  
**SECO – CURVA DE CALIBRAÇÃO *Nannochloropsis oculata***

A Figura 9.2 apresenta a relação entre valores de absorbância em monitoramento das amostras e peso seco da microalga *Nannochloropsis oculata*. Com a Equação de reta obtida, a leitura em absorbância pode ser transformada em concentração de biomassa, em g/L.

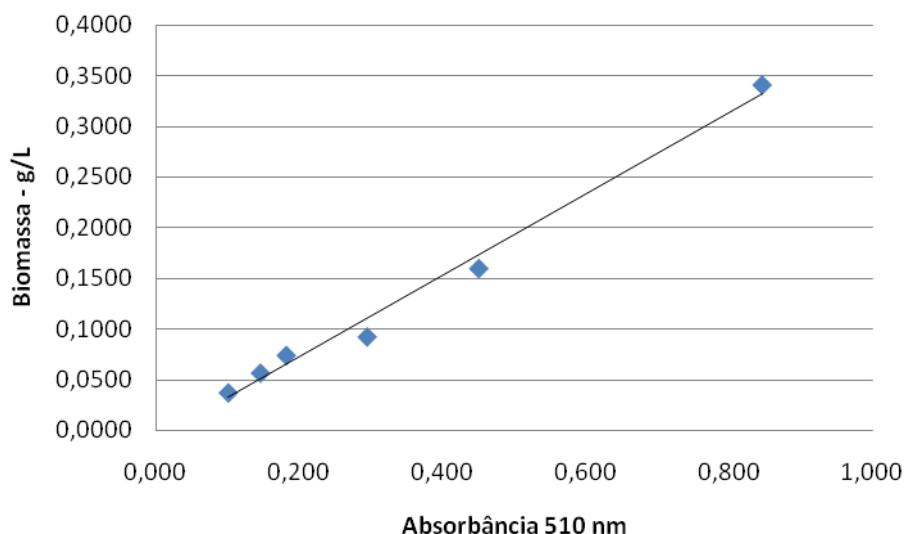


Fig. 9.2 – Relação entre a absorbância e peso seco para a alga *Nannochloropsis oculata*

Pela Figura 20 obtém-se as curva de calibração para concentração de biomassa. Assim, a Equação 9.2 apresenta a concentração de biomassa (g/L) em função da absorbância, com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,988.

$$\text{Biomassa. (g/L)} = 0,402 \cdot X - 0,008 \quad (\text{Eq. 9.2})$$

Em que:

X = valor da leitura em Absorbância no comprimento de onda adotado

**APÊNDICE 3**  
**ESPECTROSCOPIA VISÍVEL - RELAÇÃO ENTRE ABSORBÂNCIA E PESO**  
**SECO – CURVA DE CALIBRAÇÃO *Chlorella sp.***

A Figura 9.3 apresenta a relação entre valores de absorbância em monitoramento das amostras e peso seco da microalga *Chlorella sp.* Com a equação de reta obtida, a leitura em absorbância pode ser transformada em concentração de biomassa, em g/L.

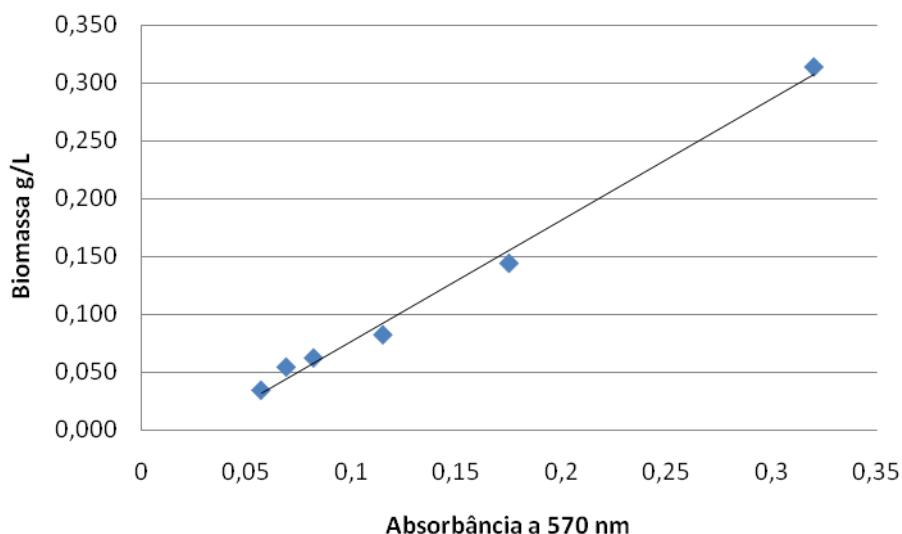


Fig. 9.3 – Relação entre a absorbância e peso seco para a alga *Chlorella sp.*

Pela Figura 9.3 obtém-se a curva de calibração para concentração de biomassa. Assim, a Equação 9.3 apresenta a concentração de biomassa (g/L) em função da absorbância, com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,992.

$$\text{Biomassa. (g/L)} = 1,047 \cdot X - 0,027 \quad (\text{Eq.9.3})$$

Em que:

X = valor da leitura em Absorbância no comprimento de onda adotado

**APÊNDICE 4**  
**ESPECTROSCOPIA VISÍVEL - RELAÇÃO ENTRE ABSORBÂNDIA E PESO**  
**SECO – CURVA DE CALIBRAÇÃO *Spirulina platensis***

A Figura 9.4 apresenta a relação entre valores de absorbância em monitoramento das amostras e peso seco da microalga *Spirulina platensis*. Com a equação de reta obtida, a leitura em absorbância pode ser transformada em concentração de biomassa, em g/L.

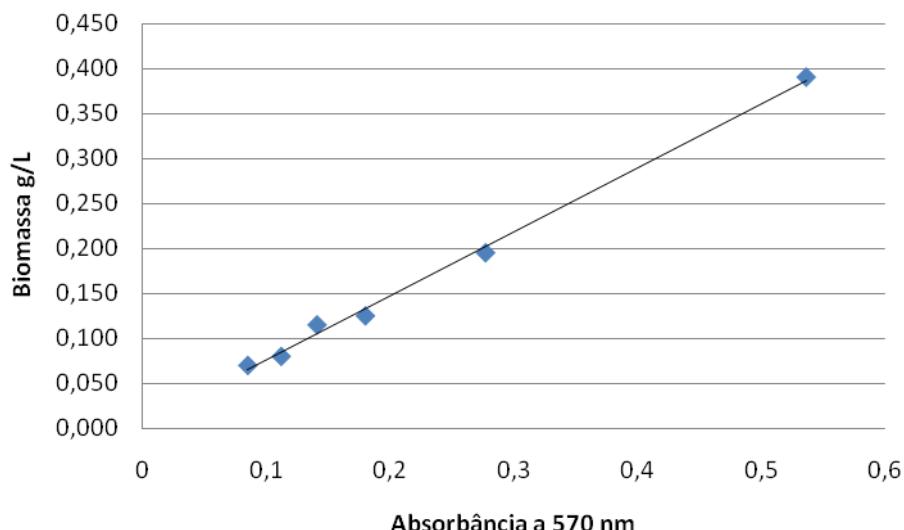


Fig. 9.4 – Relação entre a absorbância e peso seco para a alga *Spirulina platensis*

Pela Figura 9.4 obtem-se a curva de calibração para concentração de biomassa. Assim, a Equação 9.4 apresenta a concentração de biomassa (g/L) em função da absorbância, com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,996.

$$\text{Biomassa. (g/L)} = 0,712 \cdot X + 0,004 \quad (\text{Eq. 9.4})$$

Em que:

X = valor da leitura em Absorbância no comprimento de onda adotado