

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO – MESTRADO EM TECNOLOGIA
AMBIENTAL
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM GESTÃO E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

Thiago Rodrigues Bjerk

**CULTIVO DE MICROALGAS EM FOTOBIORREATOR E REATOR MISTO
VISANDO A BIORREMEDIAÇÃO E PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS**

Santa Cruz do Sul

2012

Thiago Rodrigues Bjerck

**CULTIVO DE MICROALGAS EM FOTOBIORREATOR E REATOR MISTO
VISANDO A BIORREMEDIAÇÃO E PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Tecnologia Ambiental – Mestrado, Área de Concentração em Gestão e Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

Orientadora: Prof. Dra. Rosana de Cassia de Souza Schneider

Santa Cruz do Sul

2012

Thiago Rodrigues Bjerk

**CULTIVO DE MICROALGAS EM FOTOBIORREATOR E REATOR MISTO
VISANDO A BIORREMEDIAÇÃO E PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS**

Esta Dissertação foi submetida ao Programa de Pós Graduação – Mestrado em Tecnologia Ambiental, Área de Concentração em Gestão e Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

Dra. Rosana de Cassia de Souza Schneider

Professora orientadora - UNISC

Dr. Valeriano Antonio Corbellini

Professor Examinador - UNISC

Dr. Henry Reyes Pineda

Professor Examinador - Universidad del Quindío (Colômbia)

Santa Cruz do Sul

2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Oscar Celenir Lopes Bjerk e Santa Margarida Rodrigues Bjerk, a minha maninha Camila Rodrigues Bjerk e demais familiares pelo apoio, carinho e incentivo. Vocês são meus primeiros professores, meu porto seguro o qual tornaram esta conquista possível, me acompanhando com amor e compreensão a cada dia. As maravilhosas demonstrações de força, respeito e determinação que vivenciei ao lado de todos, com certeza me tornou a pessoa que sou hoje, muito obrigado.

Aos meus amigos companheiros de pesquisa Pablo Gressler parceiro de todas as horas, dividindo ideias encarando desafios e literalmente metendo a mão na massa, a Maiara Priscilla Souza sempre disposta a ajudar com muita eficiência e qualidade, a Ana Zappe e a Bruna Breidenbach pelo auxílio prestado no desenvolver do trabalho.

Aos meus colegas do Mestrado em Tecnologia Ambiental pela convivência e amizade formada, em especial aos grandes amigos Ramiro e Daniel.

A minha orientadora Rosana Schneider pela orientação, apoio, paciência, respeito e por ter acreditado na minha capacidade me proporcionando uma bolsa de estudos. Ao professor Valeriano Antonio Corbellini pelas ideias as quais contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigado a todos por dividirem um pouco de seus conhecimentos.

Agradeço a AES Uruguaiana pela concessão da bolsa e auxílio financeiro, ao CNPQ pelo auxílio financeiro e a Universidade de Santa Cruz do Sul, bem como ao curso de Química Industrial pela utilização dos laboratórios e equipamentos, e também pelo carinho sempre demonstrado pelos professores.

Em especial agradeço a minha noiva Daiane de Souza Franco, que me incentivou e apoia me dando suporte para lutar pelos meus sonhos.

*“Cada sonho que você deixa para trás, é um
pedaço do seu futuro que deixa de existir”*

STEVE JOBS

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo principal aperfeiçoar o fotobiorreator tubular do tipo coluna de bolhas de bancada e produzir um sistema misto para cultivo de microalgas, visando a biorremediação e produção de biocombustíveis. Como meio de cultivo, foi utilizado o efluente oriundo da Estação de Tratamento de Efluentes-UNISC. Para o acompanhamento da densidade celular e peso seco, padronizou-se um método utilizando espectrofotômetro ($\lambda=682$ nm) com coeficiente de correlação de $R^2>0,98$. Na recuperação da biomassa avaliou-se o método de eletroflotação e confeccionou-se um eletrodo de placas de ferro. Após o aperfeiçoamento do fotobiorreator tubular de bancada houve um aumento na densidade celular e biomassa seca de aproximadamente 1,80 vezes. Utilizando o método de transesterificação enzimática *in situ* foi possível verificar a bioconversão de todo material lipídico extraído, confirmado pela análise em HPLC e CG-MS. Para a produção de bioetanol foram utilizados fungos filamentosos para a hidrólise da biomassa de microalgas, seguido de fermentação com *Saccharomyces cerevisiae*. Com a construção de um protótipo para o sistema misto de cultivo de microalgas, verificou-se o desenvolvimento de diversas cepas de microalgas, obtendo densidade celular máxima de $25,48 \times 10^6$ células mL^{-1} , biomassa seca de $0,62 \text{ g L}^{-1}$ e percentual lipídico de 1,36 % (sem aporte de CO_2). Já com aporte de CO_2 em 15 dias de cultivo, obteve-se densidade celular máxima de $26,97 \times 10^6$ células mL^{-1} , biomassa seca $0,72 \text{ g L}^{-1}$ e percentual lipídico de 6,07 %. Na avaliação da biorremediação do efluente utilizando sistema misto para o cultivo de microalgas sem aporte de CO_2 , houve uma expressiva redução nos parâmetros de alcalinidade, fósforo total, nitrogênio amoniacal e nitrogênio total Kjeldahl, entretanto, houve um aumento nos parâmetros DBO_5 e DQO. Com aporte de CO_2 os resultados foram: aumento de alcalinidade e DQO e decréscimo de nitrogênio amoniacal, nitrogênio total de Kjeldahl e DBO_5 . Neste último experimento a concentração de fósforo se manteve inalterada. Desta forma, pode-se concluir que os sistemas propostos são adequados para a produção de microalga, biorremediação de efluentes e consequente produção de biocombustíveis.

PALAVRAS CHAVE: Microalgas, transesterificação *in situ*, bioetanol, biorremediação.

ABSTRACT

MICROALGAE CULTIVE IN FOTOBIORREATOR AND JOINT REACTOR OBJECTIVING THE BIOREMEDIATION AND PRODUCTION OF BIOFUELS

This paper aimed to improve the tubular fotobiorreator type bubble column bench and produce a mixed system for cultivation of microalgae, aiming the bioremediation and biofuels production. As a way of cultivate it was used the effluent coming from the Wastewater Treatment Plant – UNISC. To monitor cell density and dry weight, it was standardized a method using a spectrophotometer ($\lambda=682$ nm) with a correlation coefficient $R^2>0,98$. In the biomass recovery, it was evaluated the electroflotation method and it was produced an electrode of iron plates. After improving the fotobiorreator tubular bench there was an increase in cell density and dry biomass of approximately 1.80 times. Using the method of enzymatic transesterification *in situ*, it was possible to verify all the bioconversion of lipid extracted material that was confirmed by analysis on HPLC and CG-MS. For the production of ethanol it was used fungi filamentous concerning the microalgae biomass hydrolysis, followed by fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. With the construction of a phototype system for the mixed culture of microalgae, there has been the development of various strains of microalgae, achieving maximum cell density of 25.48×10^6 cells mL⁻¹ dry biomass of $0,62$ g L⁻¹ and lipid percentage of 1.36 % (without contribution of CO₂). Already with CO₂ injection, in 15 days of cultivation, the maximum cell density was obtained up to 26.97×10^6 cells mL⁻¹, dry biomass 0.72 g L⁻¹ and lipid percentage of 6.07 %. In assessing the bioremediation of effluent using mixed system for the cultivation of microalgae without contribution of CO₂, there was significant reduction in the parameters of alkalinity, total phosphorus, ammonia nitrogen and total Kjeldahl nitrogen, however, there was an increase in the DBO₅ and DQO patterns. With the injection of CO₂, the results were: alkalinity and DQO increasing, ammonia nitrogen decreasing, total Kjeldahl nitrogen and DBO₅. In the last experiment, the phosphorus concentration remained unchanged. Thus, it can be concluded that the proposed systems are suitable for the production of microalgae, the bioremediation of waste and the consequent production of biofuel.

KEYWORDS: Microalgae, *in situ* transesterification, bioethanol, biorremediation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Sistema <i>Turf Scrubber</i> desenvolvido por Mulbry	19
Figura 2- Fotobiorreator tubular tipo coluna de bolhas.....	21
Figura 3- Reação de transesterificação de óleos vegetais.....	28
Figura 4- Fluxograma da metodologia realizada	33
Figura 5- Fotobiorreator tubular para manutenção da inóculo de <i>Desmodesmus subspicatus</i>	34
Figura 6- Localização do Município de Santa Cruz do Sul, no Vale do Rio Pardo e da UNISC	35
Figura 7- Vista geral da área construída da UNISC, a seta indica o local da ETE-UNISC	36
Figura 8- Vista geral da ETE-UNISC, no canto inferior direito o detalhe para a caixa de inspeção, de onde foram retiradas as amostras de efluente.	36
Figura 9- Vista geral do fotobiorreator tubular de coluna de bolhas construída por Gressler 2010.....	37
Figura 10- Vista geral do Fotobiorreator de bancada modificado.....	38
Figura 11- Reservatório após a adição de lâmpadas	38
Figura 12- Sistema misto para o cultivo de microalgas desenvolvido, onde engloba características de (1) sistema <i>turf scrubber</i> , (2) sistema em tanques e (3) fotobiorreator.....	39
Figura 13- Curva analítica de absorvância versus densidade celular para determinação de <i>Desmodesmus subspicatus</i>	51
Figura 14- Curva analítica de absorvância versus biomassa seca de microalga para determinação de <i>Desmodesmus subspicatus</i>	52
Figura 15- Curva analítica de absorvância versus densidade celular produzida para o sistema misto de crescimento de microalgas	52
Figura 16- Ensaio de eletroflotação da biomassa microalgais utilizando eletrodos de ferro.....	54
Figura 17– Biomassa de microalgas recuperada após filtração do material eletroflotado utilizando tecido de algodão	55

Figura 18- Eletrodo de placas de ferro produzido para recuperação de biomassa de microalgas	56
Figura 19- Curvas de crescimento de <i>Desmodesmus subspicatus</i> produzidas em fotobiorreator tubular de bancada antes e após modificação	57
Figura 20- Curvas de crescimento de <i>Desmodesmus subspicatus</i> produzidas em fotobiorreator tubular após modificação com e sem aporte de CO ₂	59
Figura 21- Avaliação de biomassa seca de <i>Desmodesmus subspicatus</i> com e sem aporte de CO ₂	60
Figura 22- Gráfico de loadings das interações entre os parâmetros físicos químicos e percentuais lipídico da biomassa de <i>D. subspicatus</i>	64
Figura 23- Análise de cromatografia em camada delgada da reação de transesterificação com total de 8 ensaios, onde o número representa o ensaio e as letra “b” refere-se ao padrão de biodiesel de soja	66
Figura 24- Sobreposição dos cromatogramas analisados em HPLC do ensaio 4 da reação de transesterificação enzimática <i>in situ</i> (rosa), padrão de biodiesel de girassol (preto) e óleo de girassol (azul)	66
Figura 25- Sobreposição dos cromatogramas das amostras analisados em CG-MS das reações de transesterificação enzimática <i>in situ</i>	67
Figura 26- Espectros de infravermelho sobrepostos representado área espectral utilizada para Análise Hierárquica de Cluster	70
Figura 27- Sobreposição dos espectros de infravermelhos de alguns componentes presentes nas células de microalgas	71
Figura 28- Dendograma dos espectros de infravermelho das amostras do ensaio de hidrólise da biomassa microalgais utilizando toda faixa espectral	72
Figura 29- Média dos espectros de infravermelho dos grupos selecionados pela HCA e teste <i>t-Student</i>	73
Figura 30- Dendograma dos espectros de infravermelho das amostras do ensaio de hidrólise da biomassa microalgais utilizando a faixa espectral selecionada no teste <i>t-student</i>	74
Figura 31- Cromatogramas do material hidrolisado e fermentando utilizando o método de <i>headspace</i> , onde cromatograma preto <i>A. terreus</i> CMMI 233-3, rosa HSC-S458, azul <i>A. fumigatus</i> USP 2, marrom <i>A. niger</i> USP 9, verde <i>A. niger</i> CMMI 01, azul marinho <i>A. niger</i> CMMI 111 e amarelo <i>A. niger</i> CMMI 15	75

Figura 32- Acompanhamento do desenvolvimento no protótipo de sistema misto de cultivo microalgas nativas oriundas da estação de tratamento de efluentes da UNISC	76
Figura 33- Perfil de crescimento das microalgas que se desenvolveram no sistema misto sem aporte de CO ₂	77
Figura 34- Comportamento do pH e da divisão celular durante o cultivo de microalgas no sistema misto sem aporte de CO ₂	78
Figura 35- Perfil de crescimento das microalgas cultivadas no sistema misto com aporte de CO ₂	80
Figura 36- Avaliação da radiação solar média diária obtida junto ao Instituto Nacional de Metrologia sobre densidade celular diária.	80
Figura 37- Desenvolvimento de microalgas no sistema misto de cultivo utilizando efluente da Estação de Tratamento de Efluentes - UNISC como meio de cultura. ...	81
Figura 38- Acompanhamento do pH e divisão celular durante o cultivo de microalgas no sistema misto com aporte de CO ₂	82
Figura 39- Cromatogramas dos ésteres metílicos referentes aos ácidos graxos presentes no óleo de microalgas produzidas em efluente com e sem aporte de CO ₂	83
Figura 40- Proporção de ácidos graxos presentes nas biomassas de microalgas analisadas	85
Figura 41- Eficiência de depuração do efluente da estação de tratamento da UNISC utilizando o sistema misto para o cultivo de microalgas com e sem aporte de CO ₂	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características das condições de cultivo de microalgas	17
Tabela 2- Perfil de ácidos graxos (%) das microalgas <i>Spirulina sp.</i> , <i>Scenedesmus obliquus</i> , <i>Synechococcus</i> e <i>Chlorella vulgaris</i> , cultivadas em 12% de CO ₂	29
Tabela 3- Geratriz do planejamento fatorial 3 ² para otimização do processo de eletroflotação.....	42
Tabela 4- Geratriz do planejamento fatorial 2 ³ para a produção de biodiesel via reação de transesterificação enzimática <i>in situ</i>	43
Tabela 5- Acompanhamento de parâmetros iniciais e finais encontrados em cada teste	54
Tabela 6– Comparação de testes de eletroflotação de biomassa de microalgas com diferentes densidades de corrente utilizadas	56
Tabela 7- Biomassa seca média gerada durante o período de cultivo.....	58
Tabela 8– Comparação entre efluentes com e sem aporte de CO ₂ e dos seus respectivos ácidos graxos.	62
Tabela 9- Análise por componentes principais (ACP) da composição físicoquímica dos efluentes juntamente com os perfis de ácidos graxos encontrados nas microalgas.....	63
Tabela 10- Seleção de micro-organismos para hidrólise de biomassa microalgais ..	69
Tabela 11- Bandas do espectro de infravermelho médio atribuídas a grupos funcionais	71
Tabela 12- Determinação de biomassa e lipídios das microalgas cultivadas no sistema misto sem aporte de CO ₂	79
Tabela 13- Determinação de biomassa e lipídios das microalgas cultivadas no sistema misto com aporte de CO ₂	82
Tabela 14- Proporção relativa (%) dos ésteres de ácidos graxos encontrados para na biomassa de microalgas após cultivo em efluente, com e sem aporte de CO ₂	84
Tabela 15- Resultados obtidos quanto aos parâmetros da caracterização analítica do efluente da ETE-UNISC antes e após o cultivo utilizando o sistema misto com e sem aporte de CO ₂	86

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo geral	16
2.2	Objetivos específicos.....	16
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
3.1	Microalgas – abordagem geral	17
3.2	Cultivo de microalgas	18
3.2.1	Sistema <i>Turf scrubber</i>	19
3.2.2	Fotobiorreator	20
3.3	Biorremediação.....	23
3.4	Recuperação de biomassa	25
3.5	Produção de biocombustíveis.....	27
3.5.1	Biodiesel	27
3.5.2	Bioetanol.....	30
4	METODOLOGIA	32
4.1	Delineamento da pesquisa	32
4.2	Amostragem	33
4.3	Área de origem do efluente de estudo.....	34
4.4	Modificação do fotobiorreator tubular tipo coluna de bolhas.....	37
4.5	Construção do sistema misto para o cultivo de microalgas	39
4.5.1	Seleção de micro-organismos no sistema misto de cultivo de microalgas ...	40
4.6	Otimização do método de determinação da densidade celular e peso seco por espectrofotômetro UV/Visível	41
4.7	Produção de microalgas de <i>Desmodesmus subspicatus</i> em fotobiorreator tubular utilizando efluente urbano como meio de cultivo	41

4.8	Avaliação do método de eletroflotação para a separação da biomassa da microalga <i>Desmodesmus subspicatus</i>	41
4.9	Produção de biodiesel via reação de transesterificação enzimática <i>in situ</i> ..	42
4.9.1	Determinação de biodiesel utilizando cromatografia em camada delgada ...	43
4.9.2	Determinação de biodiesel utilizando cromatógrafo a gás acoplado a espectrometria de massas (CG-MS)	43
4.9.3	Cromatografia líquida de alta eficiência HPLC	44
4.10	Produção de bioetanol.....	44
4.10.1	Análise exploratória da hidrólise de biomassa microalgais utilizando fungos filamentosos	44
4.10.2	Monitoramento da hidrólise por espectrometria do infravermelho	45
4.10.3	Hidrólise enzimática de biomassa microalgais utilizando cepas de fungos filamentosos	45
4.10.4	Processo fermentativo	46
4.10.5	Determinação de produção de etanol utilizando GC-MS e acessório para <i>Headspace</i>	46
4.11	Análise do crescimento das microalgas no sistema misto.....	46
4.11.1	Curvas de crescimento	47
4.11.2	Velocidade de crescimento (k)	47
4.11.3	Tempo de cultivo (T).....	48
4.11.4	Densidade celular máxima (DCM).....	48
4.11.5	Análise cromatográfica do óleo extraído da biomassa de microalgas produzido no sistema misto.	48
4.12	Caracterização analítica do efluente da ETE-UNISC	50
4.13	Delineamento experimental e análise dos dados	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	51
5.1	Padronização do método de determinação da densidade celular e peso seco por espectrofotômetro UV/Visível	51
5.2	Avaliação do método de eletroflotação para a separação da biomassa da microalga <i>Desmodesmus subspicatus</i>	53
5.3	Produção de <i>Desmodesmus subspicatus</i> em fotobiorreator tubular utilizado efluente urbano como meio de cultivo.	57
5.3.1	Parâmetros físico-químicos que influenciam na produção de lipídios utilizando efluente como meio de cultura.....	60
5.4	Reação de transesterificação enzimática <i>in situ</i>	65

5.4.1	Determinação de biodiesel utilizando cromatografia em camada delgada, HPLC e GC-MS	65
5.5	Produção de bioetanol utilizando biomassa de microalgas	68
5.5.1	Análise exploratória da degradação de biomassa microalgais utilizando fungos filamentosos.....	68
5.5.2	Hidrólise de biomassa microalgais para produção de bioetanol.....	75
5.6	Seleção, identificação e análise de crescimento das microalgas cultivadas no protótipo de sistema misto de cultivo.....	76
5.7	Caracterização analítica do efluente da ETE-UNISC	86
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	90
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	92
8	REFERÊNCIAS	93
9	ANEXOS.....	100
Anexo A	- Vista isométrica e posterior da planta do sistema misto para o cultivo de microalgas	100
Anexo B	- Vista superior da planta do sistema misto para o cultivo de microalgas.	101
Anexo C	- Laudo Analise efluente saída do decantador	102
Anexo D	- Laudo análise efluente após tratamento com microalgas.....	103
Anexo E	- Laudo análise efluente início tratamento com microalgas com aporte de CO ₂ ao meio	104
Anexo F	- Laudo análise efluente após tratamento com microalgas com aporte de CO ₂ ao meio	105

1 INTRODUÇÃO

As microalgas são as principais produtoras primárias de oxigênio no mundo, sendo assim, mostram-se imprescindíveis para todos os seres vivos. Estes micro-organismos possuem grande potencialidade em âmbito biotecnológico e comercial devido à importância dos compostos resultantes da sua biomassa. A biodiversidade proveniente destes micro-organismos possibilita a inserção de novas pesquisas e conseqüentemente no auxílio de novas tecnologias que possam trazer benefícios ainda hoje desconhecidos (RICHMOND, 2004).

O cultivo de microalgas têm se mostrado uma opção eficiente na biorremediação de efluentes devido à capacidade que possuem em se desenvolver rapidamente em ambientes com elevadas cargas de nitrogênio e fósforo inorgânico e na mitigação de CO₂; além destes fatores, a utilidade da biomassa resultante, a qual detém compostos de valor e interesse comercial, como pigmentos e lipídios, agrega aspectos positivos como a obtenção de alimentos e produção de energia renovável (DERNER et al., 2006).

Outro aspecto relevante oriundo da produção de microalgas é o fato das mesmas serem uma opção plausível na produção do biodiesel convencional, visto que, possuem uma quantidade relativa de lipídios em sua composição (CHISTI, 2007). Além disto, a biomassa residual após hidrólise apresenta potencial para a produção de bioetanol (HARUN et al., 2010). Estas alternativas mostram-se promissoras para reduzir impactos ambientais, porém, deve-se enfatizar a otimização de alguns parâmetros, como por exemplo, a elevação da produção lipídica bem como a disponibilidade de recursos (JIANG et al., 2011).

As microalgas podem ser cultivadas tanto em ambientes abertos (sistema *turf scrubber*, *race way*, e tanques) como em ambientes fechados (fotobiorreatores). Este último, portanto, é um dos mais utilizados devido a eficácia no controle do crescimento destes micro-organismos além de promover um melhor acompanhamento dos parâmetros físico-químicos (BOROWITZKA, 1999).

Devido a grande necessidade de fontes energéticas renováveis, juntamente com a incessante busca por sistemas de tratamentos de efluentes eficientes e de baixo

custo, este trabalho visou aperfeiçoar um fotobiorreator de bancada e também avaliar a potencialidade da associação de sistemas para o cultivo de microalgas, evidenciando a aplicação da tecnologia ambiental para obter a biorremediação de efluentes juntamente com a produção de biocombustíveis a partir da biomassa de microalgas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Aperfeiçoar o fotobiorreator tubular tipo coluna de bolhas de bancada e produzir um sistema misto para cultivo de microalgas, visando a biorremediação e produção de biocombustíveis.

2.2 Objetivos específicos

- Otimização do método de quantificação da densidade celular e peso seco por espectroscopia na região visível
- Avaliação do método de eletroflotação para a recuperação de biomassa de microalgas
- Aperfeiçoamento do fotobiorreator tubular do tipo coluna de bolhas de bancada para produção de *Desmodesmus subspicatus* utilizando efluente líquido como meio de cultura.
- Produzir biodiesel a partir do óleo das microalgas empregando sistema de transesterificação enzimática *in situ*.
- Analisar o biodiesel produzido empregando métodos cromatográficos.
- Aproveitamento da biomassa residual para a produção de bioetanol via hidrólise microbiana seguida de fermentação clássica (*Sacharomyces cereviseae*)
- Desenvolver um sistema misto para o cultivo de microalgas que englobe características de cultivo do sistema de tanque, fotobiorreator tubular e *turf scrubber*.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Microalgas – abordagem geral

As algas estão entre as formas mais antigas de vida do planeta, surgindo como precursoras das plantas. Estes organismos podem apresentar estrutura procariótica ou eucariótica, sendo que a primeira se assemelha às bactérias (cianobactérias). As eucarióticas compreendem diversos tipos de algas comuns, sendo classificadas em classes, a qual é definida principalmente pela sua pigmentação, ciclo de vida e estrutura celular básica. Dentre as classes mais importantes destacam-se as algas verdes (*Chlorophyta*), algas vermelhas (*Rhodophyta*) e as diatomáceas (*Bacillariophyta*) (BRENNAN e OWENDE, 2010).

As microalgas possuem capacidade de se adaptar a diversos ambientes, podendo ajustar ou alterar sua estrutura interna para excretar uma gama de compostos que podem atuar como inibidores de outros organismos. Podem assumir vários tipos de metabolismos, sendo capazes de uma mudança metabólica como resposta às mudanças das condições ambientais (MATA, MARTINS e CAETANO, 2010).

O crescimento e a composição das microalgas são definidos pelas condições de cultivo, as principais formas são: fotoautotrófica, heterotróficas, mixotróficas e foto-heterotrófica. Na tabela 1 encontram-se as principais características de cada condição de cultivo (CHEN et al., 2011).

Tabela 1 - Características das condições de cultivo de microalgas

Condição de cultivo	Fonte de energia	Fonte de carbono
Fototrófico	Luz	Inorgânico
Heterotrófico	Composto orgânico	orgânico
Mixotrófico	Luz ou composto orgânico	Inorgânico ou orgânico
Foto-heterotrófico	Luz	Orgânico

Fonte: CHEN et al., 2011

Grande parte das microalgas são fototróficas, sendo assim, necessitam de uma fonte de luz, água e nutrientes básicos para o crescimento. Dentre estes nutrientes destacam-se o carbono (inorgânico), nitrogênio e fósforo, sendo vitais para o desenvolvimento das algas, bem como, o equilíbrio entre alguns parâmetros operacionais como: controle de dióxido de carbono, remoção de oxigênio, pH, temperatura e intensidade luminosa (MATA, MARTINS e CAETANO, 2010).

Em condições ambientais desfavoráveis ou de estresse, muitas algas alteram suas vias biossintéticas para a formação e acúmulo de lipídios, principalmente na forma de triacilgliceróis que servem principalmente como armazenamento de carbono e energia. A composição de ácidos graxos de óleo de microalgas típico é composta principalmente de mistura de ácidos graxos insaturados, como o palmitoléico (16:1), oléico (18:1), linoléico (18:2) e linolênico (18:3). Ácidos graxos saturados, palmítico (16:0) e esteárico (18:0) também estão presentes, porém, em menor proporção (KHAN et al., 2009).

3.2 Cultivo de microalgas

O cultivo de microalgas pode ser executado em diversos sistemas com volumes e características diferentes, dentre os quais se destacam sistema aberto *race way*, em águas naturais (lagos, lagoas), em lagoas artificiais, tanques, sistema *turf scrubber* ou sistemas fechados como fotobiorreatores. Uma das vantagens do cultivo em sistema aberto é a facilidade de sua construção e operação se comparado aos sistemas fechados. Entretanto, alguns fatores devem ser considerados antes da escolha do sistema como: a biologia da alga, área de implantação do sistema, energia, água, nutrientes, clima e tipo de produto final desejado (BOROWITZKA, 1999).

A produção comercial de biomassa microbiana é limitada a poucas espécies de microalgas que podem ser cultivadas em sistemas abertos, por meio de um ambiente seletivo ou altas taxas de crescimento. A maioria das algas não pode ser mantida por muito tempo em sistemas abertos devido a riscos de contaminação por fungos, bactérias, protozoários e competição por outras microalgas que tendem a dominar a espécie original usada como inóculo (RICHMOND, 2004).

Entre as limitações do cultivo de microalgas em sistema aberto destacam-se a utilização de pouca luz pelas células, perdas por evaporação, a difusão do CO₂ para a atmosfera e a exigência de grandes áreas de terra. Além disto, suas taxas de transferência de massa são muito pobres, devido aos mecanismos de agitação em sistemas de cultivo aberto ser menos eficientes, resultando em uma baixa produtividade de biomassa (UGWU, AOYAGI e UCHIYAMA, 2008).

3.2.1 Sistema *Turf scrubber*

O Sistema *Turf Scrubber* consiste na utilização de uma comunidade de espécies de algas filamentosas, bactérias, fungos entre outras associadas, que se desenvolvem sobre uma tela por onde flui uma solução com excesso de nutrientes. Este sistema permite o tratamento de diversas classes de efluentes como água de escoamento agrícola, esgoto doméstico e efluente industrial (PIZARRO et al., 2006).

O sistema pode ser construído em distintas conformações e tamanhos deve-se ter uma inclinação para que o efluente escorra sobre a tela para fixação da comunidade de micro-organismos. Na Figura 1 é possível verificar o sistema desenvolvido por Mulbry et al. (2008) com área de 30 m², inclinação de 1 a 2% com iluminação natural. O efluente foi recirculado com a utilização de uma bomba submersa.



Figura 1- Sistema *Turf Scrubber* desenvolvido por Mulbry

Fonte: MULBRY et al., 2008

O metabolismo do sistema pode ser controlado e intensificado através da manipulação da coluna de água, vazão do meio nutriente, utilização de fontes luminosas naturais ou artificiais, controle de herbívoros e frequência de colheita. Este último é o processo principal, pois rejuvenesce a comunidade e eleva as taxas de crescimento. Se os poluentes não forem tóxicos, a biomassa pode ser utilizada como fertilizantes ou até mesmo na alimentação (PIZARRO et al., 2006).

3.2.2 Fotobiorreator

O fotobiorreator pode ser definido como um recipiente fechado (ou parcialmente fechado) que visa de maneira fototrófica, fornecer energia a partir de iluminação solar ou artificial (ANDERSEN, 2005). A utilização deste sistema tem como intuito a produção de biomassa e extratos microalgais para posterior produção de compostos de interesse comercial.

Os fotobiorreatores tubulares são considerados os únicos tipos de sistemas fechado plausíveis para produção de culturas em alta escala (CHISTI, 2007). Se comparados com os sistemas de cultivo aberto, os fotobiorreatores apresentam características mais vantajosas sendo que auxiliam no controle de pH e temperatura, fornece melhor proteção da cultura contra contaminações, a agitação é mais eficiente, há menor perda por evaporação e a densidade celular atingida é maior (MATA, MARTINS e CAETANO, 2010; CHRISTENSON e SIMS, 2011).

Vários modelos de fotobiorreatores podem ser encontrados, contudo, devem-se priorizar os protótipos que forneçam as condições ideais para o tipo de cultura que está sendo analisada. Em geral, os fotobiorreatores constituídos por uma estrutura mais sofisticada são mais versáteis, porém, apresentam maior custo de produção (ANDERSEN, 2005).

Na Figura 2 pode ser verificado um fotobiorreator tubular de bancada tipo coluna de bolhas com crescimento de *Desmodesmus subspicatus* com fotoperíodo de 24 horas produzido por Gressler (2011).



Figura 2- Fotobiorreator tubular tipo coluna de bolhas.

Fonte: Gressler 2010

Os fotobiorreatores possuem propriedades biológicas altamente eficientes uma vez que tornam possível a conversão do dióxido de carbono em biomassa (CHIU et al., 2008). A instalação de fotobiorreatores necessita de subsistemas que aprimorem a produção da cultura microalgais como a inclusão do reator, unidade de iluminação, dióxido de carbono, microalgas, parâmetros de acompanhamento físico-químicos, sistemas de troca de calor, nutrientes entre outros (Al et al., 2008).

O alto rendimento de biomassa microalgais pode ser obtido tanto em sistemas de fermentação quanto em fotobiorreatores. Algumas microalgas podem também ser cultivadas em fermentadores sem a presença de luz agindo como micro-organismos heterótrofos e exigindo como suprimentos, açúcares e carbono. Estas condições mostram-se essenciais para atingir uma maior quantidade de biomassa, pois a partir de testes de cultivo realizados em fotobiorreatores abertos e fechados foi possível a obtenção de um maior rendimento de biomassa em volumes mais baixos de cultura (WALKER, PURTON e BECKER, 2005).

Além de contribuir para a produção da biomassa de microalgas, os fotobiorreatores podem também ser designados para a remoção de inúmeros compostos presentes na água (AN e KIM, 2000), produção de vesículas de gás em cianobactérias (SUNDARARAJAN e JU, 2000), remoção de CO₂ (CHIU et al., 2009), tratamento de efluentes (CHRISTENSON e SIMS, 2011), produção de hidrogênio (ZHANG, C. et al., 2010) e cultivo de macroalgas (KRICHNAVARUK et al., 2005).

Conforme Ai et al. (2008) o cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fotobiorreatores apresentou bons resultados visto que houve um bom desempenho fotossintético. Os parâmetros pH, temperatura, oxigênio dissolvido foram controlados de maneira eficaz, promovendo assim, uma melhor remoção de dióxido de carbono e de oxigênio. Porém, observa-se que é necessária uma operação contínua para garantir confiabilidade do desempenho fotossintético no fotobiorreator.

O cultivo da diatomácea *Chaetoceros calcitrans* em fotobiorreatores com o intuito de acompanhar o crescimento das mesmas foi descrito por Krichnavaruk et al. (2005). Este experimento mostrou bons resultados uma vez que foi alcançado um alto crescimento da cultura com elevada densidade celular, mesmo com uma menor incidência de luz.

Segundo Chiu et al. (2008) cuja pesquisa baseou-se na redução de CO₂ a partir da microalga *Chlorella sp.*, cultivada em um fotobiorreator semicontínuo, foi possível observar que houve uma conversão satisfatória de dióxido de carbono em biomassa. Além disto, percebe-se que o crescimento, a produtividade e a quantidade de CO₂ removido permaneceram constantes, visto que o fotobiorreator proporciona um controle mais eficiente da cultura.

Apesar dos inúmeros protótipos de fotobiorreatores desenvolvidos para o cultivo de microalgas ainda há aspectos a serem analisados para fornecer melhores condições de cultura tais como: otimização de fotobiorreatores em sistemas abertos, produção de maiores volumes de cultura em menor espaço, iluminação elevada, altas taxas de transferência de massas, maior rendimento da produção de biomassa entre outros. Além disto, deve-se levar em consideração o produto alvo, a localização geográfica bem como o custo global de produção (UGWU, AOYAGI e UCHIYAMA, 2008).

3.3 Biorremediação

Muitos micro-organismos utilizam os poluentes como fonte nutricional, entretanto em alguns casos se torna necessário a sua suplementação. Outro fator importante são as condições ambientais para seu desenvolvimento entre eles se destacam a temperatura, pH, salinidade e presença de inibidores (FARHADIAN et al., 2008).

Efluentes secundários provenientes de esgotos contêm nutrientes que quando em excesso, podem ocasionar o fenômeno de eutrofização de rios, lagos e mares. Os nutrientes responsáveis por este problema são principalmente o fósforo e o nitrogênio sendo o restante, outros poluentes característicos destes tipos de águas residuárias (BASHAN e BASHAN, 2010).

Tendo em vista este problema, surgem algumas alternativas para o tratamento de efluentes como a oxidação (MASROOR, MEHRVAR e EIN-MOZAFFARI, 2009), coagulação e floculação (FUCHS, THEISS e BRAUN, 2006), filtração (CHANG e KIM, 2005), ozonização (ALMEIDA, REGINA e APARECIDA, 2004), cloração (DALY, HO e BROOKES, 2007), osmose reversa (CARON et al., 2010) dentre outros. O tratamento por estes meios mostra-se, na maioria das vezes, eficiente na remoção dos poluentes, no entanto, deve-se optar por métodos que sejam mais práticos, ambientalmente corretos e com menor geração de resíduos.

Neste contexto, as microalgas mostram-se uma alternativa plausível para o tratamento biológico na remoção de poluentes, pois possuem a capacidade de utilizar o nitrogênio inorgânico e o fósforo para seu crescimento. Além disto, estes micro-organismos também auxiliam na retirada de metais pesados e de produtos químicos e orgânicos contaminantes (NOIE, LALIBERT e PROULX, 1992).

Muitas espécies de microalgas induzem um crescimento efetivo mesmo em condições inóspitas; tendo em vista este fator, estuda-se cada vez mais a possibilidade de cultivo destes micro-organismos em escala industrial, todavia, algumas aplicações ainda são limitantes. A biorremediação é um dos fatores preferenciais de aplicação devido à significância que este processo tem para o meio

ambiente, logo o tratamento de efluentes em pequena escala é predominante (PITTMAN, DEAN e OSUNDEKO, 2010).

O tratamento via fotobiorreatores é um dos mais utilizados para este fim devido à capacidade de controle e acompanhamento da produção de microalgas bem como dos parâmetros físico-químicos que constituem o sistema. Além disso, este sistema fechado promove uma redução efetiva dos poluentes presentes em efluente, principalmente na remoção de dióxido de carbono (CHIU et al., 2008; CHIU et al., 2009; MUÑOZ, KÖLLNER e GUIEYSSE, 2009).

Segundo Mulbry, Kangas e Kondrad, (2010) cuja pesquisa baseou-se na análise de taxas de remoção de nutrientes e da produção de ácidos graxos em três rios em Chesapeake Baya a partir de um sistema de *turf scrubber*, verificou-se a remoção de fósforo e nitrogênio, porém, observa-se que o período sazonal é culminante para uma biorremediação mais efetiva destes efluentes.

Já a biorremediação utilizando o sistema HRAPs (*High Rate Algal Pounds*) é outra alternativa que vem sendo analisada devido à viabilidade econômica para o tratamento de águas residuais. Contudo, conforme Park, Craggs e Shilton (2011) este processo deve ser otimizado devido à dificuldade de controlar parâmetros como a adição de CO₂, espécies de microalgas presentes no efluente, aparecimento de parasitas e também da biofloculação natural.

A biorremediação de efluentes a partir de microalgas é uma opção promissora uma vez que a possibilidade de controle de autofloculação e biofloculação pode beneficiar o crescimento e reduzir a adição de compostos químicos exigidos em métodos mecânicos convencionais como centrifugação, sedimentação gravitacional, flotação e filtração tangencial (CHRISTENSON e SIMS, 2011).

O tratamento de efluentes pode variar dependendo da sua composição. Um efluente rico em dióxido de carbono fornece um meio propício para o crescimento de microalgas sendo que o CO₂ causa um equilíbrio no sistema contendo fósforo e nitrogênio fazendo com que haja uma alta taxa de produção de microalgas. Devido a este fator, ocorre uma redução dos níveis de nutrientes, diminuição dos custos de produção e ainda uma maior obtenção de extratos lipídicos (BRENNAN e OWENDE, 2010).

Apesar das inúmeras vantagens provenientes da produção de microalgas para o tratamento de efluentes, a implantação e a integração de sistemas de grande escala de produção destes micro-organismos trazem dificuldade na obtenção de biodiesel e de bioprodutos, o tempo de crescimento é longo, o custo de produção é alto, a concentração da biomassa obtida é baixa e deve-se ter um controle minucioso de luz, temperatura, pH, CO₂, nutrientes e de seres patogênicos que possam afetar o desenvolvimento da cultura microalgais (NOIE, LALIBERT e PROULX, 1992; MARIN, ESPINOSA e STEPHENSON, 2010; PARK, CRAGGS e SHILTON, 2011).

3.4 Recuperação de biomassa

Uma das etapas mais difíceis enfrentadas durante a produção de microalgas é a separação da biomassa uma vez que a adoção de metodologias convencionais para esta situação torna-se ineficiente. Deve-se, portanto, adequar novos meios que possam auxiliar na separação sem interferir nas propriedades da fase concentrada. Devido a esta situação, as microalgas são comumente removidas utilizando os seguintes métodos: pré-oxidação, coagulação e floculação, clarificação ou sedimentação seguida de uma filtração granular e ozonização (HENDERSON et al., 2008; ROCHA, GARCIA e HENRIQUES, 2003).

A maioria destas técnicas possui desvantagens não somente pelo alto custo, mas também devido à separação ser lenta e de difícil recuperação. Outro fator a ser ponderado é que a separação microalgais deveria ser um processo aplicado a todas as espécies de algas, obter um produto com um percentual de peso seco elevado, exigir um investimento simples e com pouco gasto de energia e manutenção (POELMAN, PAUW e JEURISSEN, 1996).

A eletrocoagulação/flotação é uma das alternativas que vem sendo utilizada para recuperação da biomassa microalgais. Segundo Gao et al. (2010) cujo estudo baseou-se na separação da alga *Microcystis aeruginosa* a partir de um sistema de eletroflotação comparando a eficiência de um eletrodo de ferro e outro de alumínio, pode-se observar que este método foi válido no ponto de vista técnico e econômico. Além disto, foi também possível observar que o eletrodo de alumínio apresentou

melhores resultados se comparado ao ferro. Ressalta-se ainda que a densidade celular inicial e a temperatura da água podem influenciar no processo de separação.

Conforme descrito por Henderson et al. (2008) a pré-oxidação como opção para a separação da biomassa de microalgas mostra-se muitas vezes inconclusiva uma vez que algumas espécies respondem bem à oxidação enquanto outras são ineficientes neste processo. Entretanto, pode-se analisar a partir deste estudo que os fatores que causam impacto neste tipo de tratamento são a morfologia, motilidade, superfície de contato, densidade celular e a composição e concentração da matéria orgânica extracelular.

O método de separação das células microalgais por eletroforese também tem sido contemplado visto que as cargas negativas provenientes destes microorganismos são concentradas pelo movimento do campo elétrico. Uma das vantagens desta técnica é a exclusão de reagentes químicos, contudo, o custo deste método não se aplicaria a um processo de grande escala (CHRISTENSON e SIMS, 2011).

Outra alternativa destinada à recuperação da biomassa microalga é a centrifugação seguida da filtração, segundo relatado por Huang et al. (2009). Este método foi testado na separação das algas *Anabaena flos-aquae* e *Microcystis aeruginosa*, mostrando-se plausível uma vez que foi possível dar segmento as outras etapas sem interferências nos resultados.

Quando comparadas com outros tipos de partículas em suspensão, as microalgas possuem desvantagens. Este fator é ocasionado devido à variabilidade na composição da biomassa a qual é constituída de diferentes características como o tamanho, forma e motilidade. Sendo assim, é difícil selecionar uma única técnica de recuperação de biomassa que contemple todos estes parâmetros e que ainda, possa vir a se tornar um método padrão para ser adotado em escala industrial (UDUMAN et al., 2010).

3.5 Produção de biocombustíveis

O termo biocombustível refere-se a combustíveis sólidos, líquidos ou gasosos provenientes de matérias primas renováveis. A utilização de biomassa microalgais para a produção de energia engloba os mesmos processos utilizados para a biomassa terrestre. Entre os fatores que influenciam na escolha do processo de conversão incluem: o tipo e a quantidade de matérias-primas de biomassa, a forma desejada da energia e o ganho econômico desejado sobre o produto (BRENNAN e OWENDE, 2010).

Microalgas têm sido investigadas para a produção de inúmeros biocombustíveis, incluindo biodiesel pela extração e transformação do material lipídico, bioetanol produzido a partir de material celulósico, hemiceluloses, açúcares amido e resíduos, bem como para a produção de biogás, bio-hidrogênio e outros (DEMIRBAS, 2011).

Microalgas potencialmente podem ser utilizadas para a produção de biocombustíveis de uma forma economicamente eficaz e ambientalmente sustentável. Podendo produzir de 3-10 vezes mais energia por hectare em comparação com culturas terrestres, e ainda podem ser acoplados a sistemas de mitigação de CO₂ e ao tratamento de águas residuais (DEMIRBAS, 2010).

3.5.1 Biodiesel

Uma das principais alternativas aos combustíveis fósseis é o biodiesel sendo um dos primeiros combustíveis renováveis a se tornarem conhecidos. O termo “biodiesel” refere-se a um biocombustível equivalente ao diesel produzido a partir de material biológico renovável, o qual necessita de um processo para transformá-lo em combustível, definido como os ésteres de monoalquila de cadeia longa de ácidos graxos, o qual é produzido pela reação de transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais e álcool, com ou sem catalisador (AHMAD et al., 2011).

A reação de transesterificação é uma reação de múltiplas etapas, composta por três etapas reversíveis em série Figura 3, onde os triacilgliceróis são convertidos

para diacilgliceróis, em seguida os diacilgliceróis são convertidos à monoacilgliceróis e finalmente os monoacilgliceróis são convertidos à ésteres (biodiesel) e glicerol (coproduto)(MATA, MARTINS e CAETANO, 2010).

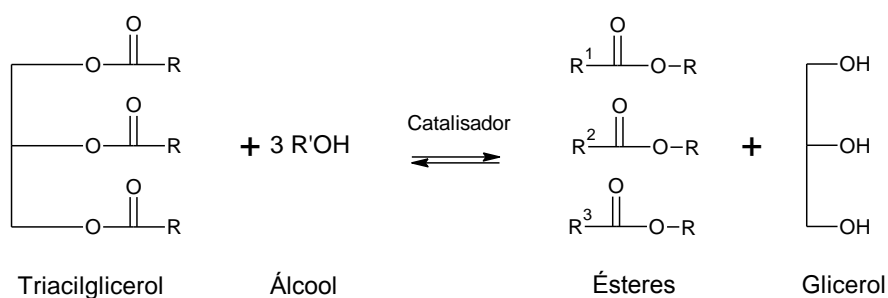


Figura 3- Reação de transesterificação de óleos vegetais.

A reação de transesterificação pode ser realizada via catálise ácida, básica ou enzimática (lipase). A reação via catálise básica, ocorre cerca de 4000 vezes mais rápida do que a reação via catálise ácida, desta forma, a catálise básica com a utilização hidróxido de sódio e potássio são mais utilizadas. Alcóxidos (base conjugada de um álcool) como metóxido de sódio são catalisadores ainda mais eficientes. Já o uso de lipases oferece vantagens importantes, mas ainda não é viável devido ao seu custo relativamente alto (FUKUDA, KONDO e NODA, 2001).

Óleos de algas contêm um alto grau de ácidos graxos polinsaturados (RADMANN e COSTA, 2008) Tabela 2, quando comparado aos óleos vegetais, o que o torna suscetível à oxidação em armazenamento, no entanto, o biodiesel de algas também apresenta propriedades físicas e químicas semelhantes ao diesel de petróleo (BRENNAN e OWENDE, 2010).

Tabela 2- Perfil de ácidos graxos (%) das microalgas *Spirulina sp.* , *Scenedesmus obliquus*, *Synechococcus* e *Chlorella vulgaris*, cultivadas em 12% de CO₂.

	<i>Spirulina sp.</i>	<i>S. obliquus</i>	<i>S. nidulans</i>	<i>C. vulgaris</i>
Ácidos graxos saturados				
C 15:0	0,08	2,14	0,08	0,14
C 16:0	2,54	3,22	0,73	4,36
C 17:0	1,92	1,02	8,18	1,26
C 18:0	0,33	0,91	0,78	1,20
C 20:0	12,60	0,70	0,13	29,10
C 22:0	nd	nd	nd	0,15
C 23:0	nd	2,06	1,15	0,97
C 24:0	nd	0,58	0,09	nd
Ácidos graxos monoinsaturados				
C 14:1	0,26	0,57	0,36	0,21
C 15:1	1,26	1,57	0,09	2,30
C 16:1	41,02	37,01	36,04	23,47
C 17:1	2,45	6,28	2,73	1,80
C 18:1	8,04	18,27	16,9	21,81
C 20:1	0,14	0,67	nd	0,37
C 24:1	nd	1,64	2,85	1,00
Ácidos graxos polinsaturados				
C 18:2	2,71	3,98	3,53	6,26
α – C 18:3	7,61	3,52	0,10	nd
γ – C 18:3	18,12	5,42	17,72	3,12
C 20:2	0,08	4,99	7,64	0,31
C 20:3	0,36	0,69	0,19	0,57
C 20:4	0,49	nd	0,12	0,49
C 20:5	nd	nd	0,10	0,13
C 22:2	nd	1,16	0,11	0,89
C 22:6	nd	3,60	0,13	0,10

nd=não detectado

Fonte: RADMANN E COSTA, 2008

Portanto, o biodiesel de microalgas pode trazer um benefício líquido para a sociedade com base numa análise de ciclo de vida que inclui, entre outros fatores, seus efeitos sobre o fornecimento de energia líquida, o sistema alimentar global, as emissões de gases de efeito estufa, o carbono do solo e da fertilidade do solo, água e da qualidade do ar e da biodiversidade (AHMAD et al., 2011).

3.5.2 Bioetanol

A busca por energias de fontes renováveis ganham força com o bioetanol o qual apresenta potencial para a substituição de combustíveis de petróleo em motores à gasolina de forma bastante viável. O bioetanol é produzido através do processo de fermentação de açúcar e amido, a qual, por sua produção, surgiu a partir de diferentes fontes como em cana-de-açúcar, milho ou grãos (HARUN e DANQUAH, 2011b).

A produção de bioetanol envolve processos que variam dependendo do tipo de biomassa utilizado como o pré-tratamento da biomassa, sacarificação, fermentação e recuperação do produto. O pré-tratamento da biomassa é um processo crucial, pois é essencial para a formação de açúcares a serem utilizados no processo fermentativo (HARUN e DANQUAH, 2011a).

A inserção de ácido é uma das mais utilizadas no processo de pré-tratamento da biomassa, pois este auxilia a converter os carboidratos que são presos na parede celular em açúcares simples, antes de iniciar o processo de fermentação. O pré-tratamento com ácido ainda oferece vantagens como a melhoria na produção do bioetanol, eficiência e baixo consumo de energia se comparado a outros métodos (HARUN e DANQUAH, 2011a).

Uma das opções para a produção de bioetanol é a utilização da biomassa da lignocelulose. Conforme descrito por Balat (2011) a biomassa desta amostra pode ser convertida em bioetanol por meio de uma hidrólise seguida de fermentação. Esta matéria-prima é usualmente hidrolisada em meio ácido; o hidrolisado obtido é utilizado para a fermentação do bioetanol que posteriormente é fermentado por micro-organismos. A biomassa da lignocelulose é considerada a matéria-prima mais propícia para a produção do bioetanol devido a sua grande disponibilidade e baixo custo de produção, contudo, a implantação de um sistema em escala industrial ainda não foi desenvolvida.

Segundo Yoon et al. (2011) a utilização de radiação gama é uma alternativa interessante a hidrólise de biomassa de microalgas do que a digestão química ou enzimática. O uso de radiação gama eleva a concentração de açúcares redutores e do rendimento de sacarificação.

A produção de bioetanol derivada da biomassa de microalgas é uma das alternativas que se mostra promissora. Segundo John et al. (2011) cujo estudo baseou-se na avaliação deste tipo de biomassa como matéria-prima para a produção do bioetanol, pode-se observar que esta é uma abordagem sustentável para a produção de biocombustíveis renováveis. Entretanto, ressalta-se a importância da confecção de um sistema elaborado e eficiente para o cultivo destes micro-organismos e que possa eliminar compostos que causem impureza no produto final; além disto, deve-se haver mais estudos, principalmente da engenharia genética, para que sejam selecionadas cepas que sejam consistentes a condições adversas.

Além das microalgas, as macroalgas também são uma opção para produzir o bioetanol de terceira geração, conforme apresentado por Goh e Lee (2010). Neste estudo, foi sugerida a utilização da macroalga vermelha *Eucheuma* sp. uma vez que esta espécie é uma das mais abundantes ao longo da zona costeira além de possuir uma alta capacidade regenerativa e de crescimento rápido. Outro aspecto enfatizado foi que o aumento da demanda de energia pode ser suplementado com o auxílio das macroalgas, porém, devem-se enfatizar estudos que investiguem as espécies que forneçam uma maior quantidade de carboidratos para uma qualidade de produção mais satisfatória.

A composição de carboidratos de microalgas é principalmente de polissacarídeos que varia entre cepas podendo atingir até 70% de seu peso seco. Desta forma, apresenta potencial para ser usado como matéria-prima para a produção de bioetanol agregando ainda outras vantagens como altas taxas de crescimento e de assimilação de CO₂ durante a fotossíntese (HARUN e DANQUAH, 2011b).

A demanda de biocombustíveis está cada vez maior tendo em vista que outros recursos de energias agregam alto custo além de trazerem impactos ambientais. Neste contexto, o bioetanol mostra-se com grande potencial tendo em vista que é ambientalmente favorável; outra opção que vem sendo questionada é a possível inserção do bioetanol como aditivo em gasolinas (BALAT, 2011).

4 METODOLOGIA

4.1 Delineamento da pesquisa

A metodologia está dividida em duas etapas. A primeira refere-se à otimização do fotobiorreator tubular de bancada, padronização do método de determinação de densidade e biomassa seca, recuperação de biomassa, produção de biodiesel e bioetanol utilizando biomassa de *Desmodesmus subspicatus*. A segunda etapa refere-se à construção de um sistema misto que engloba três sistemas: tanques, fotobiorreator e *turf scrubber*, o qual consistirá no crescimento de uma comunidade de micro-organismo associados. Será avaliado o perfil de crescimento, o percentual lipídico da biomassa e a potencialidade para o uso na biorremediação do efluente gerado na Universidade de Santa Cruz do Sul-UNISC.

O fluxograma da Figura 4 representa esquematicamente a metodologia utilizada para o pleno desenvolvimento deste trabalho.

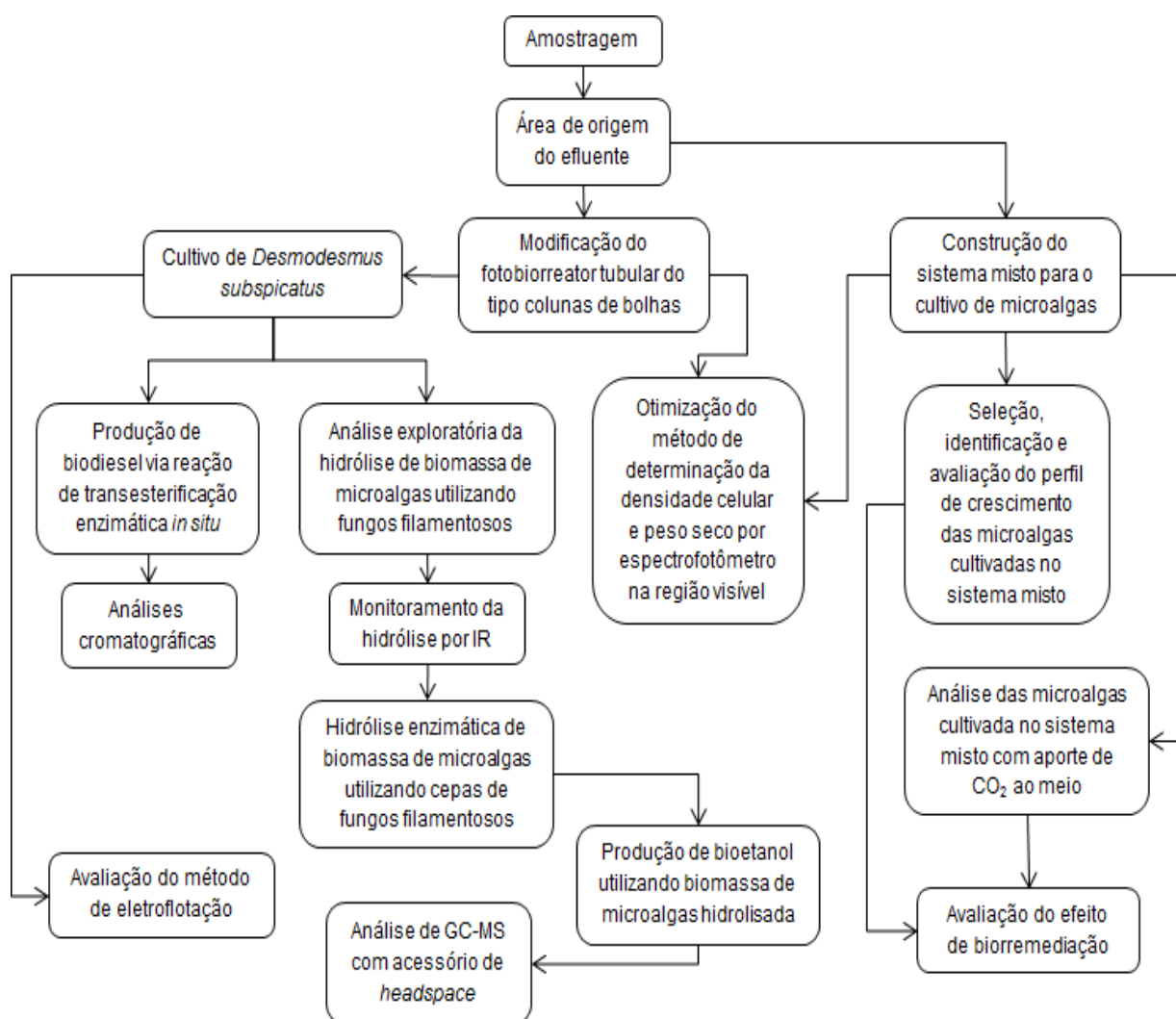


Figura 4- Fluxograma da metodologia realizada

4.2 Amostragem

Para a primeira etapa, a cepa utilizada foi a de *Desmodesmus subspicatus* proveniente do Laboratório de Ecotoxicologia da UNISC. A microalga é mantida em fase exponencial e meio N:P:K (18:6:18) 3g L⁻¹ em fotobiorreator conforme Figura 5.

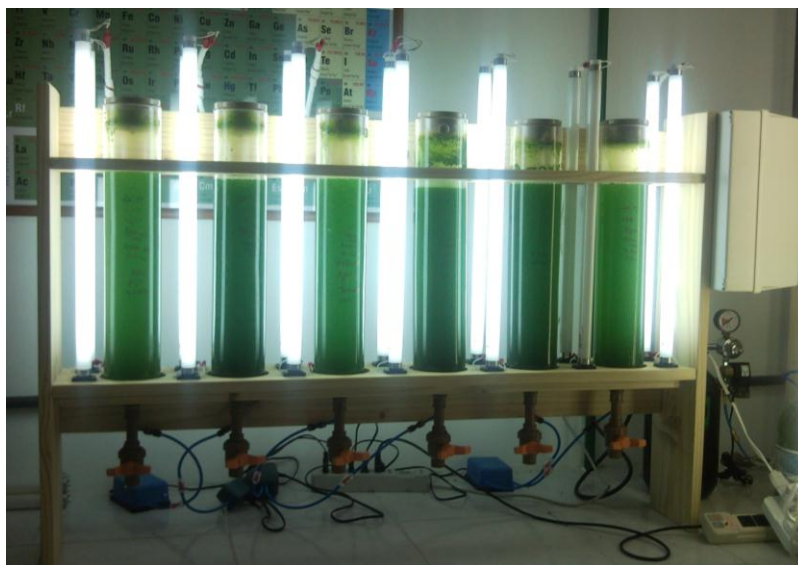


Figura 5- Fotobiorreator tubular para manutenção da inóculo de *Desmodesmus subspicatus*

Os repiques são alimentados com CO₂ do ambiente através de bombas diafragmáticas e mantidos sob iluminação artificial por 24 h dia⁻¹. Estes repiques foram utilizados no fotobiorreator como inóculo.

4.3 Área de origem do efluente de estudo

O efluente utilizado neste trabalho foi coletado na Estação de Tratamento de Esgoto da Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC (ETE – UNISC), no Município de Santa Cruz do Sul, RS, Brasil (Figura 6). A ETE – UNISC encontra-se localizada no campus Santa Cruz do Sul, ao lado direito na entrada principal do campus universitário, município de Santa Cruz do Sul, RS, Brasil. A área total do campus compreende 414.667 m², tendo uma área construída de 51.614 m². As Figuras 7 e 8 mostram uma vista geral da área construída da Universidade de Santa cruz do Sul e da ETE-UNISC.

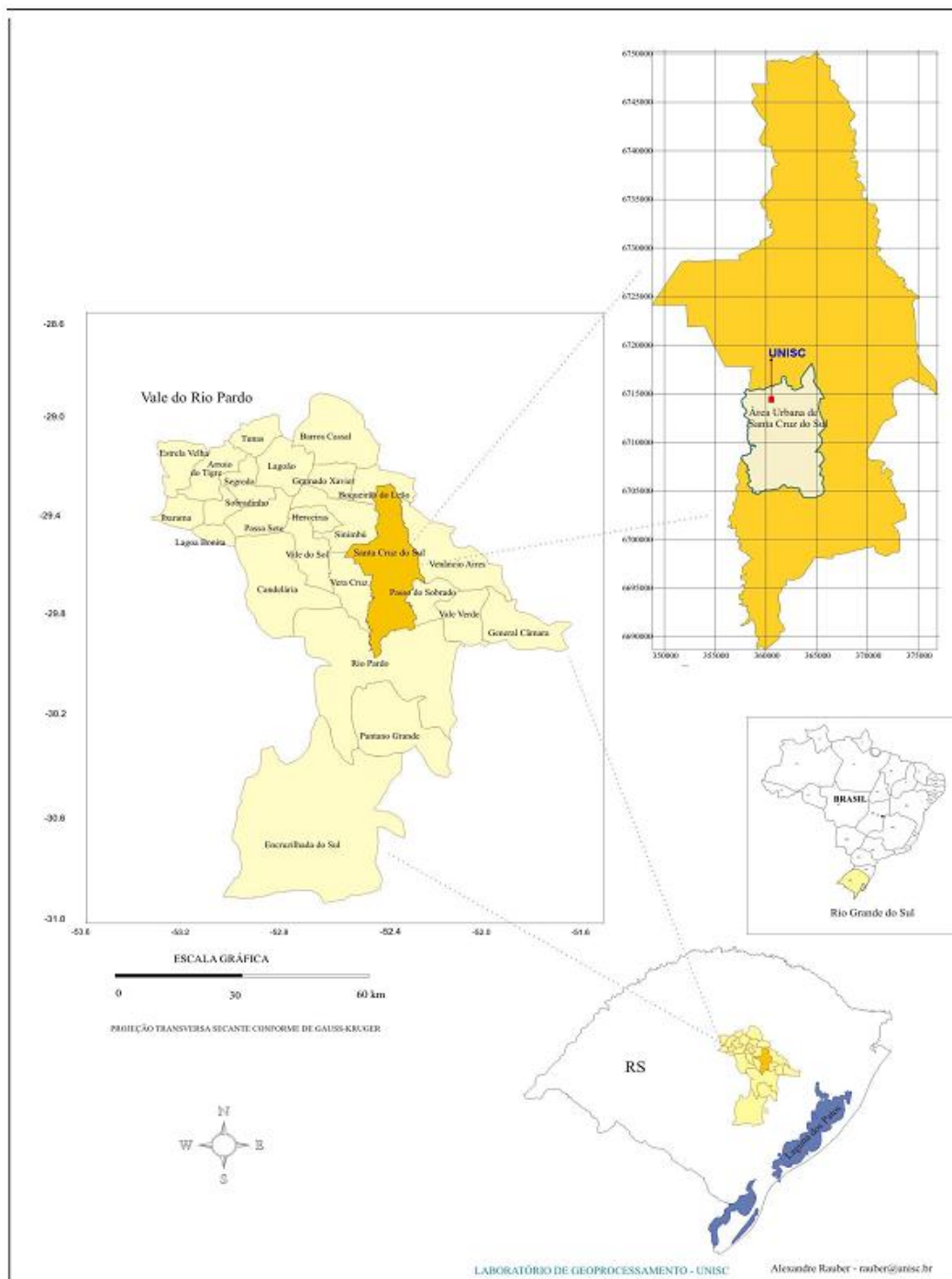


Figura 6- Localização do Município de Santa Cruz do Sul, no Vale do Rio Pardo e da UNISC

Fonte: GRESSLER 2011



Figura 7- Vista geral da área construída da UNISC, a seta indica o local da ETE-UNISC

Fonte: Google Earth, 2011



Figura 8- Vista geral da ETE-UNISC, no canto inferior direito o detalhe para a caixa de inspeção, de onde foram retiradas as amostras de efluente.

4.4 Modificação do fotobiorreator tubular tipo coluna de bolhas

O fotobiorreator construído por Gressler (2010) Figura 9, foi modificado visando aumentar a recirculação no sistema. Os tubos foram ligados em paralelo e não mais em série, desta forma foi possível aumentar a vazão de recirculação do meio nutriente utilizado na produção de microalgas.

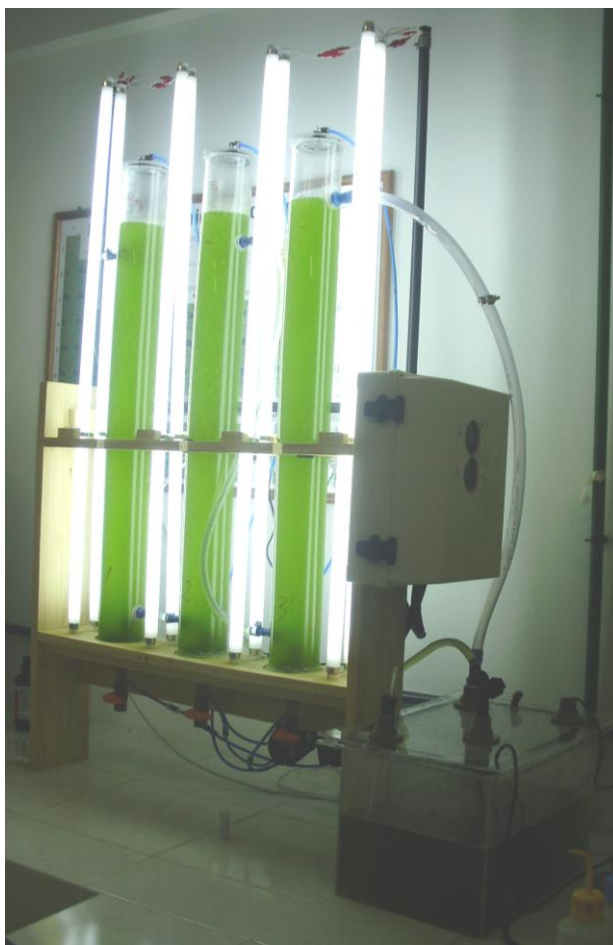


Figura 9- Vista geral do fotobiorreator tubular de coluna de bolhas construída por Gressler 2010

Fonte: Gressler 2010

Os pontos de coleta de amostra do sistema foram colocados acima do fluxo de ar da pedra porosa, desta forma foi possível obter uma amostra mais homogênea.



Figura 10- Vista geral do Fotobiorreator de bancada modificado

Visando diminuir as zonas com baixa iluminação, também foi adicionado duas lâmpadas nas laterais do reservatório, e modificado o controle de fluxo do sistema (Figura 11).



Figura 11- Reservatório após a adição de lâmpadas

4.5 Construção do sistema misto para o cultivo de microalgas

De acordo com Demirbas (2011), sistemas abertos associados com biorreatores fechados formando um sistema híbrido possibilitam obter melhores resultados. A combinação dos dois sistemas é provavelmente a escolha mais lógica para oferecer um melhor custo benefício.

Desta forma o modelo proposto partiu da união de três sistemas amplamente utilizados para a produção de microalgas: sistemas de tanques, fotobiorreator tubular e *turf scrubber* com o intuito de agregar as qualidades de cada sistema. Na Figura 12 é possível visualizar o sistema confeccionado.

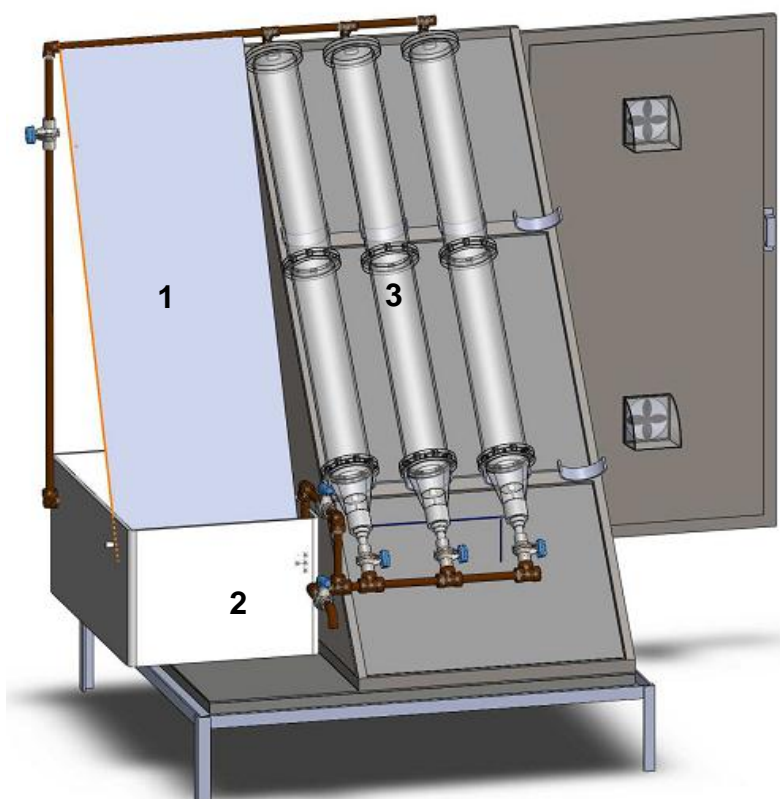


Figura 12- Sistema misto para o cultivo de microalgas desenvolvido, onde engloba características de (1) sistema *turf scrubber*, (2) sistema em tanques e (3) fotobiorreator.

O sistema construído possui capacidade de 100 L, onde uma bomba submersa com vazão de $5 \times 10^{-3} \text{ m}^3 \text{ min}^{-1}$ é responsável pela circulação e homogeneidade do sistema. O líquido é bombeado do tanque até entrada dos tubos de acrílico de base cônica, após a saída dos tubos o líquido terá sua passagem pela tela, e retornará ao tanque fechando o ciclo.

A alimentação de gases do sistema ocorre através de três compressores de ar (ambiente) diafragmático, com vazão de 0,22 vvm cada um e um cilindro de CO_2 conectado por mangueira até um difusor localizado no centro da base cônica dos tubos. O cilindro de CO_2 é equipado com uma solenoide a qual é programada para a injeção do mesmo a vazão de 3 L h^{-1} por hora durante o período de maior intensidade luminosa (07:00 as 19:00 hrs).

A troca de calor e de gases do sistema é efetuada de forma mais eficiente na tela e no tanque onde é liberada também a porção de CO_2 não fixado bem como o oxigênio liberado pelas microalgas. O sistema recebeu iluminação natural com fotoperíodo de aproximadamente 12 horas. Diariamente o volume de água evaporado foi repostado ao sistema.

4.5.1 Seleção de micro-organismos no sistema misto de cultivo de microalgas

O sistema misto foi alimentado com 100 litros de efluente da saída do decantador, o qual recirculou no sistema até observar o desenvolvimento de microalgas, acompanhando a densidade celular e acompanhado o perfil de crescimento da comunidade de microalgas através da densidade óptica.

4.6 Otimização do método de determinação da densidade celular e peso seco por espectrofotômetro UV/Visível

Para a obtenção da densidade celular (célula mL⁻¹) foi adaptado o método descrito por Chiu et al. (2008). Em balões de 10 mL, realizou-se a diluição da amostra para atingir uma absorvância entre 0,1-1,0. Após, a densidade celular (células mL⁻¹) foi quantificada em Câmara de Neubauer e a amostra foi medida no Espectrofotômetro UV/visível em λ de 682 nm, construindo-se assim curvas analíticas. Após a otimização, as amostras foram analisadas considerando a equação obtida com a padronização do método.

4.7 Produção de microalgas de *Desmodesmus subspicatus* em fotobiorreator tubular utilizando efluente urbano como meio de cultivo

O desenvolvimento da cultura de *Desmodesmus subspicatus* foi avaliado em efluente autoclavado (20 minutos à temperatura de 121°C) da estação de tratamento da Universidade de Santa Cruz do Sul com e sem aporte de CO₂ ao meio. A alimentação do CO₂ ao meio foi de 6,2% em relação à vazão de gás do meio (0,04 vvm). O fotobiorreator foi iluminado por oito lâmpadas de 32 W totalizando 42,3 K lux durante 24 horas por dia.

Foi avaliado o perfil de crescimento (densidade celular e biomassa seca) durante 7 dias de incubação.

4.8 Avaliação do método de eletroflotação para a separação da biomassa da microalga *Desmodesmus subspicatus*

Para a realização deste experimento foi utilizada uma fonte de alimentação de corrente contínua modelo INSTRUTHERM FA-3003, e os eletrodos utilizados foram compostos por uma liga de 50 % de ferro com diâmetro de 8 mm e comprimento de 150 mm. A densidade da microalga *Desmodesmus subspicatus* empregada neste ensaio foi padronizada em 20×10^6 células mL⁻¹.

Para a otimização do processo de eletroflotação foi testada a variação da concentração de NaCl e a variação da densidade da corrente, as quais foram alternadas simultaneamente segundo um planejamento fatorial 3^2 . Para a confecção da matriz de dados, foram consideradas duas variáveis independentes, divididas em três níveis: máximo (+), médio (=) e mínimo (-), sendo que as densidades de corrente utilizadas foram de 1,0; 2,5 e 5,0 mA cm⁻² e a concentração de NaCl foi de 0,1; 1,0 e 3,0 g L⁻¹ constituindo no total de 9 experimentos tabela 3.

Tabela 3- Geratriz do planejamento fatorial 3^2 para otimização do processo de eletroflotação.

Ensaio	Densidade de corrente	[] eletrólito
1	-	-
2	-	=
3	-	+
4	+	-
5	+	=
6	+	+
7	=	-
8	=	=
9	=	+

(+) nível máximo, (=) médio, (-) nível mínimo.

4.9 Produção de biodiesel via reação de transesterificação enzimática *in situ*

Em erlenmeyer de 125 mL de boca esmerilhada, foram adicionados 1 g de biomassa seca de microalgas e 30 mL de hexano. A adição de água, enzima e metanol seguiu um planejamento fatorial 2^3 . Para a constituição da matriz de ensaios, foram consideradas 3 variáveis independentes, nos níveis máximo (+) e mínimo (-): água 0,1 e 1,0 mL, enzima (lipase comercial) 2,0 e 4,0 g, e metanol 0,05 e 1,0 mL, constituindo um total de 8 experimentos conforme Tabela 4.

Tabela 4- Geratriz do planejamento fatorial 2³ para a produção de biodiesel via reação de transesterificação enzimática *in situ*

Ensaio	Água	Enzima	Metanol
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

(+) nível máximo, (-) nível mínimo.

As amostras foram incubadas à temperatura de 55 °C por um período de 48 horas. Após foram acompanhadas as reações utilizando a técnicas de cromatografia em camada delgada, HPLC e GC-MS.

4.9.1 Determinação de biodiesel utilizando cromatografia em camada delgada

Com o auxílio de um tubo capilar, foi coletado o extrato da camada orgânica das amostras, e aplicadas em uma cromatoplaça de sílica utilizando como padrão biodiesel de soja B100. A placa foi eluída em uma mistura de hexano:acetato de etila 9:1. A placa foi revelada em câmara de iodo para a coloração dos analitos e avaliada se ocorreu a produção de biodiesel.

4.9.2 Determinação de biodiesel utilizando cromatógrafo a gás acoplado a espectrometria de massas (CG-MS)

Para a análise qualitativa as amostras foram analisadas por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas. Para as análises foi utilizado um equipamento Shimadzu QP 2010 Plus equipado com Injetor Automático AOC 20i. Os

padrões de referência de ésteres metílicos de ácidos graxos (SULPECO), bem como as amostras de ésteres do óleo extraído das microalgas foram realizados nas seguintes condições: coluna DB5 MS (30m x 0,25 mm x 0,25 μm); temperatura de aquecimento da coluna 150°C (0,1min) aquecendo até 250°C (3°C min^{-1}), continuando o aquecimento a 30°C min^{-1} até 300°C; no detector de massas a temperatura da fonte de ionização e a temperatura de interface em 280°C; sistema de injeção do tipo split de 1:5, modo SCAN de detecção.

4.9.3 Cromatografia líquida de alta eficiência HPLC

As análises por Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em equipamento da Shimadzu foram realizadas com as amostras de biodiesel produzidas pelo método de transesterificação enzimática *in situ* e comparadas com padrões de biodiesel e óleo vegetal de girassol. Para as condições de estudo incluíram-se uma temperatura de 40°C para o forno, fluxo de fase móvel de 0,8 mL min^{-1} , detector de arranjo de diodo e gradiente de fase móvel conforme a seguinte forma: 100% Fase móvel A até 2,5 min, passando para 34% de Fase móvel A e 66% de Fase móvel B de (25,5 a 35min) e retornando aos 40 min a 100% de Fase móvel A. As amostras foram solubilizadas na fase móvel B e injetados volumes de 10 μL .

Fase móvel A – Acetonitrila : Metanol (4:1)

Fase móvel B – Hexano : Isopropanol (8:5)

4.10 Produção de bioetanol

4.10.1 Análise exploratória da hidrólise de biomassa microalgais utilizando fungos filamentosos

Foi realizada a extração dos lipídios presentes na biomassa de microalgas utilizando a metodologia descrita por Gressler (2011). Após a evaporação dos

solventes, foi adicionado em tubos de ensaio, 10 mg de biomassa e 1 mL de água deionizada e esterilizada em autoclave a 121°C por 20 min. Inoculou-se uma alçada de esporos de diversas cepas pertencentes à Coleção de Micro-organismos de Microbiologia Industrial da Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC. Os tubos foram então incubados por 7 dias a temperatura de 30 °C em estufa bacteriológica e acompanhado diariamente o crescimento superficial visual e degradação da biomassa microalgais.

4.10.2 Monitoramento da hidrólise por espectrometria do infravermelho

Foram recolhidas 100 µL de amostra após o período de incubação de 7 dias e transferidas para Eppendorf contendo 100 mg de brometo de potássio previamente liofilizado. As amostras foram secas em estufa a 50 °C e liofilizadas por 2 horas. A aquisição dos espectros no infravermelho foi realizada em um espectrofotômetro do tipo FT-IR/FT-NIR (infravermelho próximo com transformada de Fourier) marca Perkin Elmer modelo Spectrum 400 series. A leitura foi executada na região do infravermelho médio que corresponde à faixa espectral de 400 a 4000 cm⁻¹, com 12 varreduras com resolução de 4,0 cm⁻¹, após ser realizada a leitura do branco. Os dados foram processados utilizando o software PIROUETTE (3.1) para a realização da Análise Hierárquica de Cluster; após os espectros foram normalizados e realizados o teste *t-student* para a comparação das médias dos dois grupos formados onde $t < 0,05$ utilizando Excel 2007.

4.10.3 Hidrólise enzimática de biomassa microalgais utilizando cepas de fungos filamentosos

Para o ensaio foram adicionados 2 g de biomassa de microalgas e 200 mL de água deionizada em erlenmeyers de 500 mL e esterilizada em autoclave a 121°C por 20 min. Inoculou-se uma alçada de esporos das cepas selecionadas no item

4.10.2. Os erlenmeyers foram incubados por 7 dias à temperatura de 30 °C em agitador orbital, após o sobrenadante foi filtrado e transferido para erlenmeyers de 250 mL previamente esterilizados.

4.10.4 Processo fermentativo

Para o ensaio de fermentação alcoólica foi utilizada a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* liofilizada Fleischmann® adquirida comercialmente. Foram transferidas 3 g de levedura para um erlenmeyer de 250 mL contendo o substrato preparado no item anterior e incubado em estufa por 7 dias a temperatura de 30°C

4.10.5 Determinação de produção de etanol utilizando GC-MS e acessório para *Headspace*

A determinação de bioetanol foi realizada usando cromatografia gasosa (Shimadzu QP 2010 Plus) equipado com detector de massas e auto injetor do tipo *headspace* usando uma seringa própria. Num frasco de vidro com capacidade de 10 mL, adicionou-se 2 mL da amostra do material fermentado. Este frasco foi lacrado e incubado por 10 min a temperatura de 80 °C. Após este período, a fase gasosa foi injetada no cromatógrafo em volume de 500 µL. As condições de aquecimento da coluna DB5 MS (30m x 0,25 mm x 0,25 µm) iniciaram em 50°C (0,1min) aquecendo até 100°C (4°C min⁻¹); no detector de massas a temperatura da fonte de ionização e a temperatura de interface foram de 280°C e a injeção foi do tipo splitless e a detecção foi no modo SCAN.

4.11 Análise do crescimento das microalgas no sistema misto

Para acompanhar o desenvolvimento da cultura foram avaliadas a densidade celular, pH, condutividade e a velocidade de crescimento, diariamente.

4.11.1 Curvas de crescimento

Para a obtenção da densidade celular (células mL⁻¹) foi realizado conforme método (4.3.1), as curvas de crescimento foram elaboradas com a densidade celular diária da média das alíquotas em triplicata. Portanto cada valor médio final de densidade celular é resultado de 3 observações dia⁻¹.

4.11.2 Velocidade de crescimento (k)

A velocidade de crescimento, a qual representa o número de divisões celulares da população por unidade de tempo (dia), foi determinada através da equação 01, citada em Stein (1973):

$$k = \frac{3,322}{T_2 - T_1} \text{Log} \frac{N_2}{N_1} \quad \text{Eq. 1}$$

Onde:

k = velocidade de crescimento.

3,322 = fator de conversão do logaritmo base 2 a base 10.

(T₂ - T₁) = intervalo de tempo em dias.

N₁ = densidade celular inicial.

N₂ = densidade celular final.

Log = logaritmo em base 10.

A velocidade de crescimento representa o número de divisões celulares por unidade de tempo (dias) e é específica de cada unidade experimental. A velocidade de crescimento foi determinada considerando o dia de cultivo no qual a população alcançou a densidade celular máxima.

4.11.3 Tempo de cultivo (T)

Este parâmetro foi determinado pelo número de dias transcorridos entre o início do cultivo até o dia em que foi alcançada a densidade celular máxima.

4.11.4 Densidade celular máxima (DCM)

Este parâmetro foi definido como o máximo valor obtido em número de células por mililitro, antes de a cultura alcançar a fase estacionária da curva de crescimento, independentemente do tempo transcorrido desde o início do cultivo.

4.11.5 Análise cromatográfica do óleo extraído da biomassa de microalgas produzido no sistema misto.

A extração dos lipídios de microalgas foi realizada conforme metodologia descrita por Gressler (2011). Foram pesados 1,0 g de amostra de microalga liofilizada em tubos de ensaio de 12 mL. Em seguida, adicionou-se 3 mL de uma mistura de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1 v/v) e 10 μL de uma solução de butil hidróxi tolueno (BHT). A seguir, as amostras foram submetidas ao ultrassom em um sonicador (USC 700, frequência 55 Hz) em banho de gelo por 3 ciclos de 15 min cada. Posteriormente, as amostras foram incubadas por 24 h a 4 °C e protegidas da luz (embrulhadas com papel alumínio para prevenir a fotoxidação das amostras) para posterior extração dos lipídios. Após, as amostras foram novamente submetidas por 3 ciclos de 15 minutos cada e centrifugadas por 10 minutos sendo que o sobrenadante foi recuperado com uma pipeta Pasteur e transferido a outro tubo reservado. Foram adicionados 2 mL de água destilada e 1 mL de clorofórmio ao tubo reservado.

As amostras foram mais uma vez centrifugadas; a fase inferior (clorofórmio: lipídio) foi recuperada, com uma pipeta de Pasteur, e transferida para um frasco de vidro pré-pesado. A fase aquosa foi lavada com 1 mL de clorofórmio e centrifugada novamente por 10 min. Então, a fase inferior foi recuperada e transferida para o

frasco de vidro seco e pré-pesado. A fração lipídica foi pesada e a quantidade de lipídios totais foi determinada em % (LB) de biomassa seca (teor de óleo) e em miligramas de lipídio por litro de cultura microalgais (LC) de acordo com as equações:

$$L_B = \frac{(F_2 - F_1) \cdot 100}{m} \quad \text{Eq. 2}$$

$$L_C = \frac{L_B \cdot B_L}{100} \quad \text{Eq. 3}$$

LB = lipídios totais (em % de biomassa liofilizada);

LC = lipídios totais (em mg por litro de cultura microalgais);

F1 = massa do frasco vazio (mg) ;

F2 = massa do frasco + lipídios totais (mg);

m = massa da amostra de biomassa liofilizada (mg);

BL = quantidade de biomassa seca por litro de cultura microalgais (mg L⁻¹).

Após foi realizado o método de derivatização, o qual utilizou 0,1g do óleo em um balão de fundo redondo de 125 mL. Neste, foi adicionado uma solução metanólica (hidróxido de sódio e metanol na proporção de 1:50). A solução foi aquecida a uma temperatura de aproximadamente 60°C em refluxo durante 20 minutos. Quando não foi mais possível a observação de gotas de óleo no balão, foram adicionados 7 mL de uma solução de trifluoreto de boro-metanol (BF₃/metanol), gota a gota, através do condensador e deixado em refluxo por mais 4 minutos. A seguir foi adicionado via condensador 5 mL de heptano e deixado em refluxo por mais 2 minutos.

Após alcançar a temperatura ambiente, foi adicionada uma solução saturada de NaCl. O balão foi levemente agitado. A fase superior da amostra foi coletada em um tubo de ensaio e no mesmo, foi adicionada uma ponta de espátula de sulfato de sódio anidro, o qual foi previamente ativado na estufa à 100°C durante uma hora. O extrato foi dissolvido com heptano e submetido à análise cromatográfica.

4.12 Caracterização analítica do efluente da ETE-UNISC

Todas as análises físico-químicas do efluente deste trabalho foram realizadas na Central Analítica da Universidade de Santa Cruz do Sul, cadastrada na Fundação Estadual de Proteção Ambiental FEPAM-RS como Laboratório de Análises Ambientais sob o certificado nº 17/2009-DL. Os parâmetros da qualidade da água avaliados foram:

- Alcalinidade (bicarbonatos)
- Alcalinidade (carbonatos)
- Alcalinidade hidróxidos
- Alcalinidade total
- DBO₅
- DQO
- Fósforo total
- Nitrogênio amoniacal
- Nitrogênio total Kjeldahl

4.13 Delineamento experimental e análise dos dados

No processamento das informações, utilizou-se a estatística descritiva (média e desvio-padrão) bem como análise multivariada para a caracterização analítica do efluente da ETE-UNISC bem como para a avaliação do crescimento das culturas utilizando os softwares ORIGIN 8.0 e PROUETTE 3.1.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Padronização do método de determinação da densidade celular e peso seco por espectrofotômetro UV/Visível

Para a padronização foi realizada a comparação do método de contagem em Câmara de Neubauer com o método de Espectrofotômetro UV/Visível. A curva analítica obtida pelo método espectrofotométrico para a determinação da densidade de *Desmodesmus subspicatus* está apresentada na Figura 13.

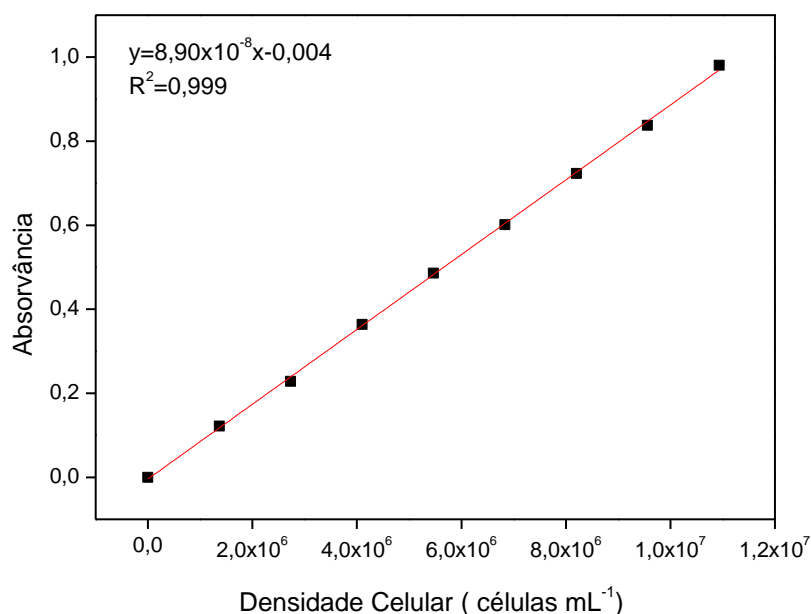


Figura 13- Curva analítica de absorvância versus densidade celular para determinação de *Desmodesmus subspicatus*

Observou-se que há uma concordância dos resultados dos dois métodos, uma vez que há correlação dos dados de absorvância com os dados de contagem. Rocha et al., (2003) descreve que a contagem direta de células é um método preciso, mas demorado se comparado com o método de densidade óptica.

Como estes dados indicam máxima produção de biomassa também foi correlacionada a absorvância com o teor de biomassa seca conforme Figura 14.

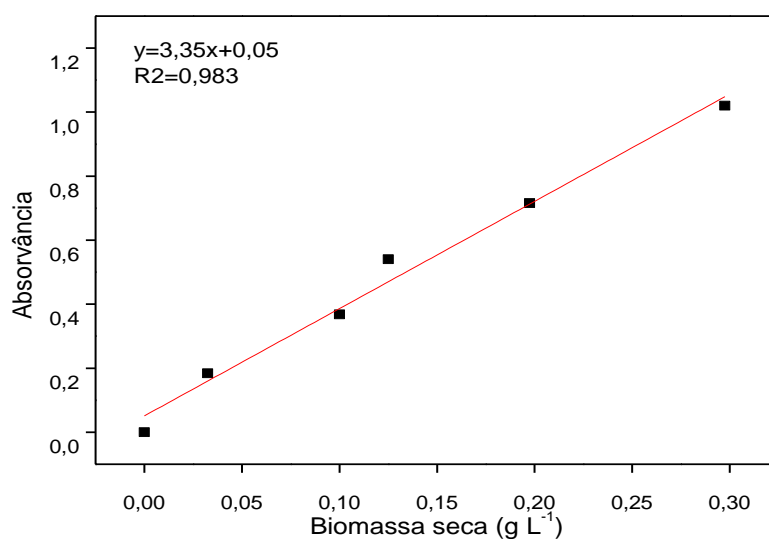


Figura 14- Curva analítica de absorvância versus biomassa seca de microalga para determinação de *Desmodesmus subspicatus*

Esta curva apresenta uma menor correlação, uma vez que há mais operações, logo, uma potencialidade maior para a inserção de erros no procedimento analítico.

Para cada conjunto de experimentos é necessário repetir a construção da curva, assim foi elaborada uma nova curva analítica para análise de densidade das microalgas produzidas no sistema de cultivo misto conforme pode ser observado na Figura 15 tendo-se novamente a confirmação da precisão do método.

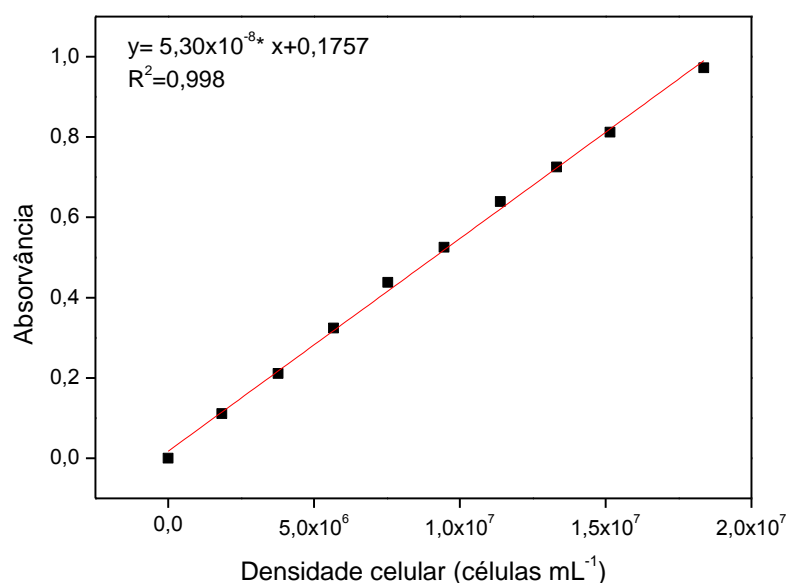


Figura 15- Curva analítica de absorvância versus densidade celular produzida para o sistema misto de crescimento de microalgas

Por outro lado, esta curva apresenta uma correlação um pouco menor se comparada a curva analítica elaborada para a determinação de densidade de *Desmodesmus subspicatus*, isto se deve ao fato de que no sistema misto há presença de diferentes gêneros de algas, entretanto esta variação não apresenta uma perda expressiva na capacidade de predição do método uma vez que obteve-se um valor de correlação muito próxima a 1,0.

Chiu et al. (2008) descreve que com a utilização do método de densidade óptica torna possível prever de forma bastante eficiente a densidade celular e biomassa seca de *Chlorella sp.*, a qual obteve coeficiente de correlação de $R^2= 0,997$ para densidade celular e $R^2= 0,991$ para biomassa seca. Muito semelhantes às obtidas neste experimento $R^2=0,999$ para densidade celular e $R^2=0,983$ para biomassa seca para avaliação de crescimento de *D. subspicatus* e $R^2=0,998$ para densidade celular do sistema misto.

5.2 Avaliação do método de eletroflotação para a separação da biomassa da microalga *Desmodesmus subspicatus*

A extração da biomassa é a etapa mais difícil do processo de produção de microalgas, uma vez que a adoção de métodos convencionais mostra-se ineficiente para este fim. Tendo em vista esta situação adversa, foi testado o processo de eletroflotação visando uma oxidação eletrolítica que recuperasse consideravelmente a biomassa microalgais. Na eletroflotação as microalgas são desestabilizadas por íons Fe^{2+} produzidos a partir dos ânodos e removidos por flotação com a liberação de hidrogênio $H_{2(g)}$ gerado nos cátodos na eletrólise. Encontra-se agregado à biomassa de microalgas grande percentual de óleo além de outros compostos e pigmentos de interesse comercial.

Poelman, Pauw e Jeurissen (1996) descrevem que a eletroflotação é uma excelente alternativa para separação de algas com um consumo energético relativamente baixo ($0.3kW h m^{-3}$).

Assim através dos experimentos realizados foi possível separar a biomassa como mostra a Figura 16.

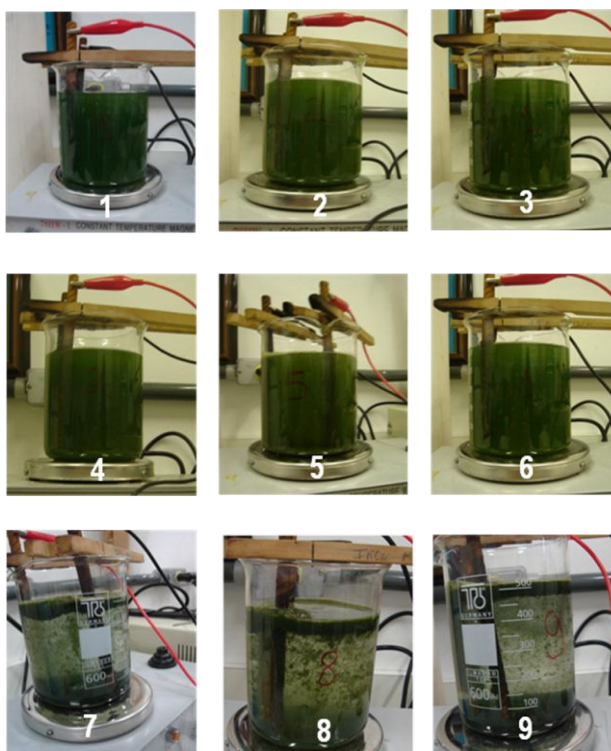


Figura 16- Ensaio de eletroflotação da biomassa microalgais utilizando eletrodos de ferro

Os resultados encontrados para pH, condutividade e turbidez finais e iniciais destes experimentos estão na tabela 5.

Tabela 5- Acompanhamento de parâmetros iniciais e finais encontrados em cada teste

Ensaio	Densidade da corrente (mA cm ⁻²)	NaCl (g L ⁻¹)	Tempo (min.)	pH		Condutividade (µs)		Turbidez (NTU)	
				Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
1	1	0,1	90	5,37	6,81	1928	1829	903	>1101
2	1	1	90	5,43	7,37	3420	3240	942	>1101
3	1	3	90	5,59	7,73	6380	6350	>1101	>1101
4	2,5	0,1	90	5,57	7,99	2680	2550	879	>1101
5	2,5	1	90	5,56	8,31	3990	3800	835	618
6	2,5	3	90	5,63	8,28	6760	6620	878	363
7	5	0,1	65	5,73	8,08	2700	2470	857	73
8	5	1	75	5,21	8,25	4050	3830	911	90
9	5	3	75	5,08	8,27	6920	6880	812	84

A eletroflotação mais eficiente ocorreu no experimento 7, uma vez que a concentração de sal e o tempo de flotação foram menores. Além destes fatores,

analisou-se que a turbidez inicial deste experimento baixou de 857NTU para 73 NTU, demonstrando assim, que no sobrenadante quase não há biomassa.

De acordo com Gao et al. (2010a) os eletrodos de ferro são menos eficientes se comparados com de alumínio obtendo diferenças de remoção de (78,9% para 100%) em 45min. Isto se deve provavelmente a maior corrente gerada por eletrodos de alumínio comparados aos de ferro.

Gao et al. (2010) afirmam que a separação de microalgas utilizando eletrodo de alumínio pode ser consideravelmente melhorada com a adição de cloro ao meio. O cloro aumenta a corrosão do eletrodo de alumínio, desta forma aumentando a quantidade de Al^{3+} .

Entretanto, de acordo com Bondy (2010) o mal de Alzheimer e outras disfunções cerebrais podem estar relacionados com a presença de alumínio na água. Em estudos utilizando ratos, após introdução via oral de pequenas doses de sulfato de alumínio proporcionais as que somos expostos, Ribes et al. (2008) descreve que foram observados déficit na aprendizagem e memória.

Para remover a biomassa eletroflotada em suspensão, foi utilizada a filtração em tecido de algodão, etapa que leva a perdas, mas é rápida e eficaz sendo realizada conforme Figura 17.



Figura 17– Biomassa de microalgas recuperada após filtragem do material eletroflotado utilizando tecido de algodão

Partindo dos resultados obtidos no item 5.2, foi construído um eletrodo de placas de ferro visando aumentar a área de contato com o meio, desta forma favorecendo a recuperação da biomassa microalgais (Figura 18).

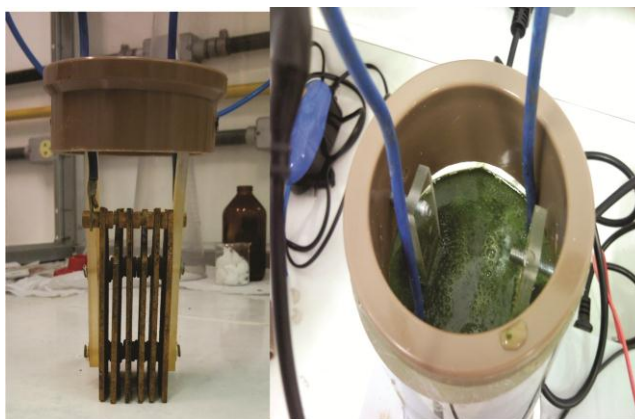


Figura 18- Eletrodo de placas de ferro produzido para recuperação de biomassa de microalgas

O eletrodo foi construído utilizando 6 placas de ferro de 100 mm x 60 mm com 3 mm de espessura, a distância entre as placas foram de 0,4 mm. Foi utilizada densidade de corrente de 5 mA cm^{-2} , e observou que não houve a necessidade da adição de eletrólito ao meio, e verificar um excesso de coagulante (Fe^{2+}) liberado pelo eletrodo.

Desta forma visando uma diminuição do gasto energético bem como uma maior vida útil do eletrodo foi avaliado novamente, a variação da densidade de corrente e monitorados o pH, condutividade e turbidez, conforme a tabela 6.

Tabela 6– Comparação de testes de eletroflotação de biomassa de microalgas com diferentes densidades de corrente utilizadas

Ensaio	Densidade de corrente (mA cm^{-2})	pH		Condutividade (μS)		Turbidez (NTU)		Tempo (min)
		Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	
1	0,4	5,89	8,82	1136	915	940	148	30
2	0,85	5,89	8,96	1136	876	940	91	15
3	1,9	5,89	8,69	1136	811	940	159	15

Com a análise da tabela 6 observa-se que o ensaio que apresenta melhores resultados foi o número 2, uma vez que foi utilizada corrente intermediária de 0,85

mA cm^{-2} , necessitando de menor tempo de eletroflotação e ainda apresentando menor turbidez final.

5.3 Produção de *Desmodesmus subspicatus* em fotobiorreator tubular utilizado efluente urbano como meio de cultivo.

O crescimento das microalgas foi avaliado pela densidade óptica analisada em espectrofotômetro em triplicata diariamente durante sete dias de cultivo visando avaliar o perfil de crescimento do sistema, o qual pode ser observado na Figura 19.

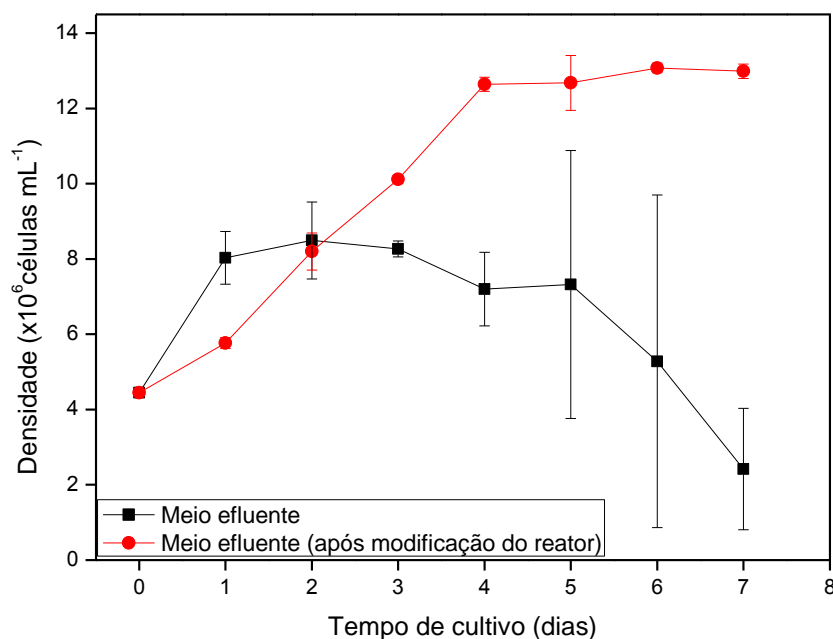


Figura 19- Curvas de crescimento de *Desmodesmus subspicatus* produzidas em fotobiorreator tubular de bancada antes e após modificação

Na Figura 19 observa-se que as curvas apresentaram uma fase exponencial, sendo estas as fases de maior interesse industrial e mais ativas metabolicamente.

Porém após a modificação do fotobiorreator de bancada foi possível verificar um aumento na fase Log, indicando maior eficiência no desenvolvimento das microalgas durante o processo. Em quatro dias de cultivo obteve-se densidade celular de $12,64 \times 10^6 \pm 0,19$ células mL^{-1} .

Segundo Ugwu, Aoyagi e Uchiyama (2008) o desenvolvimento e a modificação de fotobiorreatores são essenciais para promover a cultura de microalgas. Ou seja, a implantação de sistemas elaborados de fotobiorreatores é fundamental para aumentar a densidade celular das microalgas e, conseqüentemente, aprimorar novas tecnologias que impulsionem produções em maiores escalas.

A avaliação da produção de biomassa seca pode ser visualizada na tabela 7.

Tabela 7- Biomassa seca média gerada durante o período de cultivo

Tempo (dias)	Biomassa seca (g L ⁻¹)	Desvio padrão (g L ⁻¹)
0	0,10	0,00
1	0,12	0,00
2	0,22	0,01
3	0,26	0,01
4	0,33	0,01
5	0,33	0,02
6	0,35	0,00
7	0,34	0,01

A partir da tabela acima se observa que durante o tempo de cultivo de uma semana, houve o acréscimo da biomassa seca proveniente das microalgas obtendo a partir do quarto dia a fase estacionária com pouca variação. Outro fator relevante é o baixo valor de desvio padrão demonstrando a reprodutibilidade do método.

Da mesma forma, foi realizado o experimento com aporte de CO₂. Os dados foram comparados com os dados obtidos anteriormente. Na Figura 20 pode ser observada a curva de crescimento e comparadas aos resultados sem aporte de CO₂.

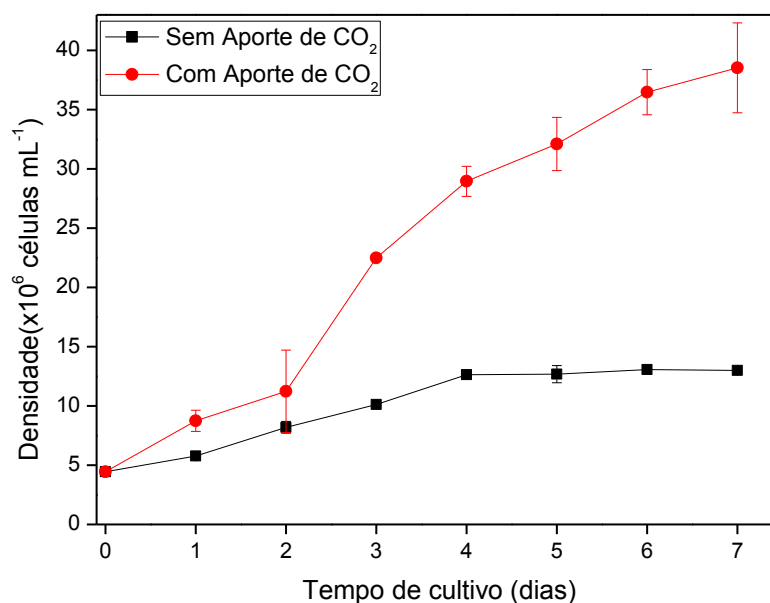


Figura 20- Curvas de crescimento de *Desmodesmus subspicatus* produzidas em fotobiorreator tubular após modificação com e sem aporte de CO₂

Na Figura 20 também podem ser observadas que ambas as curvas apresentaram uma fase exponencial, entretanto no ensaio com aporte de CO₂ é mais acentuada obtendo um aumento de células de aproximadamente 2,8 vezes.

A produção de microalgas em fotobiorreatores mostra-se bastante abrangente, principalmente com a inserção de CO₂ uma vez que se observam boas condições de cultivo e de produtividade de biomassa. Conforme Jiang et al (2011) a produção da microalga *Nannochloropsis* sp. em meio efluente e com aporte de CO₂ apresentou bons resultados sendo que a quantidade de biomassa aumentou de 0,71-2,23 gL⁻¹ em um período de 12 dias. A produção de biomassa pela cianobactéria *Aphanothece nãgeli*, descrita por Lopes et al. (2009) também apresentou eficácia na produtividade da biomassa, obtendo-se 5,1 g L⁻¹.

Sem aporte de CO₂ foi possível verificar que com 4 dias de cultivo obteve-se densidade de $12,64 \times 10^6 \pm 0,19$ células por mL atingindo a fase estacionária de crescimento, já com aporte de CO₂ com os mesmos período alcançou densidade de $22,50 \times 10^6 \pm 0,08$ células por mL estando ainda na fase log, ou seja, ainda estão assimilando nutrientes e se duplicando de forma que o número de células que se dividem é maior do que ao número de células que morrem. Assim, a avaliação da produção de biomassa seca pode ser visualizada na Figura 21.

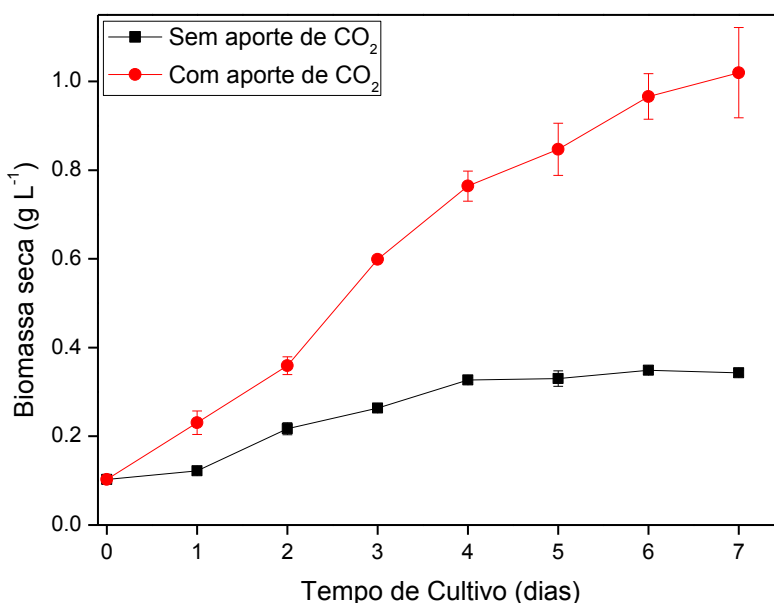


Figura 21- Avaliação de biomassa seca de *Desmodemus subspicatus* com e sem aporte de CO₂.

Avaliando a Figura 21 observa-se um aumento da proporção de biomassa seca durante todo o processo de cultivo, obtendo aproximadamente o triplo de biomassa com aporte de CO₂ se comparado com o mesmo período sem aporte de CO₂.

A análise em sistemas de produção de microalgas sem a inserção e CO₂ é bastante escassa na literatura tendo em vista que a produção com o aporte de dióxido de carbono mostra-se mais eficiente. As microalgas podem assimilar o CO₂ da atmosfera e de carbonatos solúveis, contudo, comprova-se que a absorção proveniente do aporte de CO₂ no sistema aumenta de forma relevante a produtividade (BRENNAN e OWENDE, 2010).

5.3.1 Parâmetros físico-químicos que influenciam na produção de lipídios utilizando efluente como meio de cultura

As condições de produção das microalgas podem afetar seu metabolismo e, portanto, o acúmulo de óleo na célula. A quantidade lipídica das microalgas varia de 1 a 70%, contudo, a maioria delas não ultrapassa a faixa de 40%. Os lipídios provenientes destes micro-organismos são comumente ésteres e ácidos graxos que

possuem cadeias entre 14 e 22 carbonos podendo estas ser saturadas ou insaturadas (RICHMOND, 2004).

Como houve variabilidade no efluente coletado, a composição de ácidos graxos foi comparada com os parâmetros analisados do efluente.

Com base na análise cromatográfica do óleo extraído da biomassa obtida nas melhores condições do fotobiorreator, observou-se o perfil de ácidos graxos resultantes de experimentos realizados com e sem aporte de CO₂. Na Tabela 8 observam-se as comparações entre parâmetros do efluente bruto e dos ácidos graxos encontrados para cada repetição.

Com base na análise estatística utilizando o teste *t-student*, foi possível observar que o valor de $t > 0,05$, o que indica que as médias diferem tanto nos parâmetros físico-químicos como nos percentuais lipídicos.

Considerando a variabilidade dos resultados, foram avaliados quais parâmetros (Nitrogênio, Alcalinidade, pH, DQO, DBO e Fósforo) podem ter alguma influência na produção de lipídios produzidos pela microalga *Desmodesmus subspicatus* cultivada em efluente urbano com e sem aporte de CO₂.

Tabela 8– Comparação entre efluentes com e sem aporte de CO₂ e dos seus respectivos ácidos graxos.

Análise	Efluente sem aporte de CO ₂					Efluente com aporte de CO ₂					
	Repetição			Media	Desv. Pad	Repetição			Média	Desv. Pad	Teste t
	1 ^a	2 ^a	3 ^a			1 ^a	2 ^a	3 ^a			
Alc. Bicarbonatos mg L ⁻¹ (CaCO ₃)	50,50	133,80	45,60	76,63	49,57	55,50	85,90	456,00	199,13	222,97	0,44
Alc. carbonatos mg L ⁻¹ (CaCO ₃)	282,80	0,00	307,80	196,87	170,95	262,60	0,00	0,00	87,53	151,61	0,45
Alc. total mg L ⁻¹ (CaCO ₃)	333,30	133,80	353,40	273,50	121,40	378,10	85,90	456,00	306,67	195,12	0,82
DBO5 mg L ⁻¹ (O ₂)	20,00	33,00	81,00	44,67	32,13	22,50	41,50	131,00	65,00	57,94	0,63
DQO mg L ⁻¹	114,00	283,00	200,00	199,00	84,50	82,00	103,00	131,00	105,33	24,58	0,19
Fósforo total mg L ⁻¹	10,10	11,30	4,30	8,57	3,74	11,20	3,75	1,60	5,52	5,04	0,45
Nitrogênio amoniaco mg L ⁻¹	36,10	54,30	45,60	45,33	9,10	56,40	19,10	65,80	47,10	24,70	0,92
Nitrogênio total Kjeldahl mg L ⁻¹	44,50	70,70	45,60	53,60	14,82	52,50	22,10	77,20	50,60	27,60	0,88
pH	7,85	7,78		7,82	0,05	7,47	6,79		7,13	0,48	0,29
Ácidos graxos (%)											
Mirístico (C14:0)	0,54	0,35	0,47	0,45	0,09	0,29	0,47	0,89	0,55	0,31	0,65
Palmítico(C16:0)	30,21	27,91	27,70	28,61	1,39	34,89	27,70	20,52	27,70	7,18	0,85
Estearico (C18:0)	9,10	6,72	9,01	8,28	1,35	0,00	9,01	13,18	7,40	6,74	0,84
Oleico (C18:1)	27,19	29,77	29,59	28,85	1,44	17,67	29,59	26,42	24,56	6,17	0,35
Linoleico (C18:2)	11,38	10,90	13,97	12,08	1,66	13,09	13,97	9,89	12,32	2,15	0,89
Ômega-3 (C18:3)	11,96	13,78	13,45	13,06	0,97	19,26	13,45	17,92	16,88	3,04	0,15
Eicosanóico (C20:0)	2,34	0,00	0,00	0,78	1,35	0,21	0,00	0,00	0,07	0,12	0,46

Ferrão et al. (2004) descreve que a quimiometria é uma área multidisciplinar do conhecimento, a qual é possível a utilização da matemática e da estatística para análise de dados relativos aos processos químicos, de natureza multivariada com

intuito de encontrar as relações existentes entre dados físico-químicos e o sistema em questão.

Os resultados da composição lipídica, bem como das análises dos efluentes utilizados para a produção das microalgas foram auto escalados e a Análise de Componentes Principais (ACP) foi realizada com o intuito de concentrar a maior parte das informações em poucas variáveis, sem que haja perda da informação química (Tabela 9).

Tabela 9- Análise por componentes principais (ACP) da composição físicoquímica dos efluentes juntamente com os perfis de ácidos graxos encontrados nas microalgas

Fatores	%	Acumulativo
1	40,63	40,63
2	23,01	63,64
3	14,27	77,92
4	12,43	90,34
5	9,66	100

Neste sentido, foi possível identificar que com quatro componentes é possível descrever 90,34% dos dados, sendo 40,63% da variância total descrita pela primeira componente principal.

De acordo com Neto e Moita (1998) a análise de componentes principais (PCA) consiste em reescrever as informações estatísticas de forma mais compacta e em ordem decrescente de máxima variância. Portanto a componente principal 1 detém mais informação estatística que a componente principal 2 e assim por diante, reduzindo a dimensionalidade dos pontos representativos das amostras.

Avaliando a Figura 22, é possível verificar os parâmetros que podem influenciar na produção de cada lipídio.

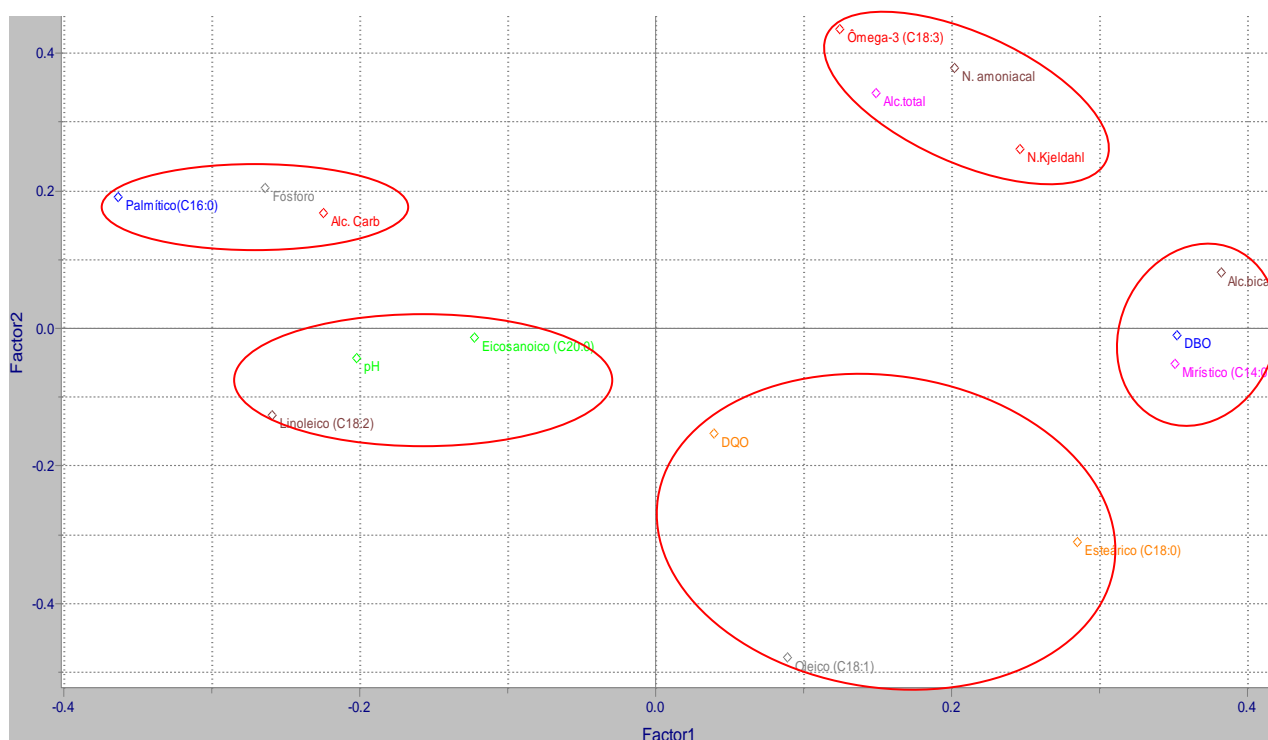


Figura 22- Gráfico de loadings das interações entre os parâmetros físicos químicos e percentuais lipídico da biomassa de *D. subspicatus*

Neto e Moita (1998) descrevem que através do gráfico de loadings é possível determinar a importância das próprias variáveis originais, ou seja, as variáveis originais com maior peso (loadings) na combinação linear dos primeiros componentes principais são as mais importantes do ponto de vista estatístico.

Avaliando somente a separação pela componente principal 1 é possível verificar a separação de dois grandes grupos, à esquerda encontra-se o ácido palmítico, eicosanoico e linoleico que apresentam maior interação com os parâmetros de fósforo, alcalinidade carbonatos e pH. À direita, encontra-se ácido oleico (C18:1), ácido linolêico (C18:3), esteárico (C18:0) e mirístico (C14:0) os quais apresentam maior interação com os parâmetros de alcalinidade total, nitrogênio amoniacal, nitrogênio total Kjeldahl, alcalinidade bicarbonatos, DBO, e DQO.

A partir da separação realizada pela componente principal 1 sobre a componente principal 2, é possível verificar que a variação de fósforo e alcalinidade devido a carbonatos influenciam de forma direta a concentração de ácido palmítico. Para os ácidos linoleico e eicosanoico essa interação sofre maior influência pela variação de pH do meio, o ômega 3 é influenciado pela variação de alcalinidade total, nitrogênio amoniacal e nitrogênio total Kjeldahl. A separação do ácido graxo

mirístico demonstra sofrer influência dos parâmetros de alcalinidade bicarbonatos e DBO, já os ácidos oleico e esteárico sofrem a influencia do parâmetro DQO.

Converti et al. (2009) destaca que a variação de temperatura e da concentração de nitrogênio influencia fortemente o teor de lipídios de *C. vulgaris*. Com uma redução de 30°C para 25 °C obteve-se um aumento do conteúdo lipídico em 2,5 vezes. Já com a redução de 75% de nitrato ao meio o conteúdo lipídico praticamente dobrou indicando na análise qualitativa a presença de cerca de 60% de ácido palmítico por fração de lipídios totais.

Resta em trabalhos futuros realizar estudos com controle das variáveis acima testadas, uma vez que a análise dos dados pode ser prejudicada pelo conjunto de variáveis que variam ao mesmo tempo. Os mecanismos de biossíntese não foram analisados até este momento e por isso consideramos que são resultados preliminares.

5.4 Reação de transesterificação enzimática *in situ*

5.4.1 Determinação de biodiesel utilizando cromatografia em camada delgada, HPLC e GC-MS

Este ensaio visou evidenciar a extração de lipídios intracelular de *D. subspicatus* e a biotransformação em biodiesel utilizando a método de transesterificação enzimática *in situ*. Na Figura 23 pode ser observado que todos os ensaios obtiveram sucesso na biotransformação.

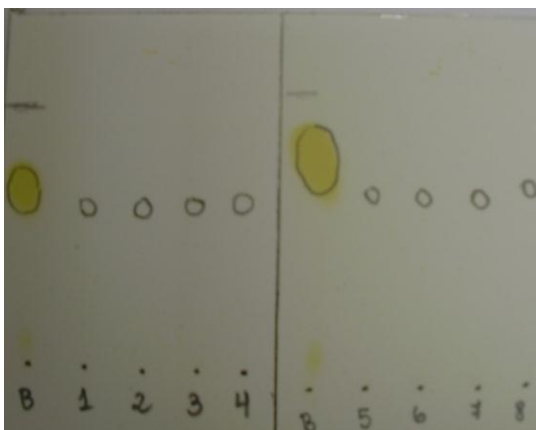


Figura 23- Análise de cromatografia em camada delgada da reação de transesterificação com total de 8 ensaios, onde o número representa o ensaio e as letra “b” refere-se ao padrão de biodiesel de soja

A avaliação das cromatoplasmas permite indicar a formação de éster metílico em todos os ensaios, que houve biotransformação do óleo extraído das células em biodiesel. Analisando a Figura 24 é possível reafirmar esta afirmação através das análises dos cromatogramas de HPLC.

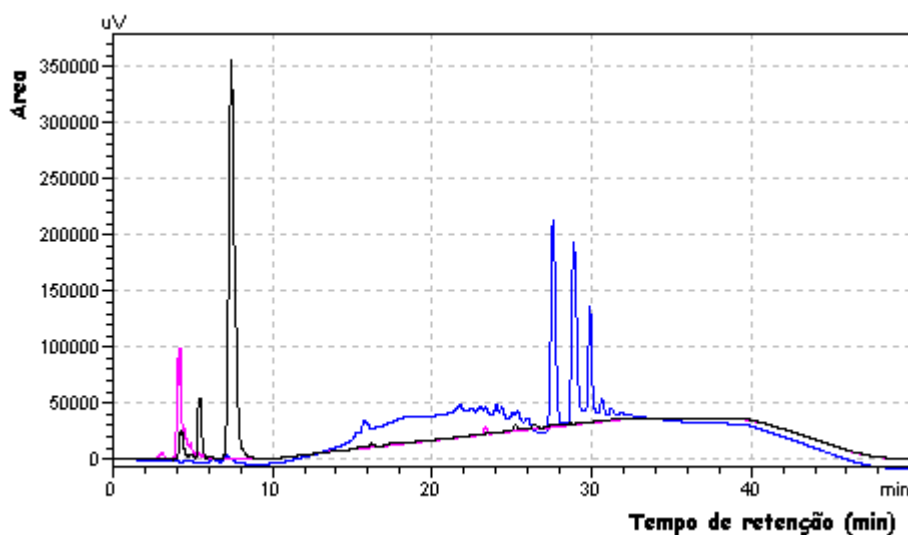


Figura 24- Sobreposição dos cromatogramas analisados em HPLC do ensaio 4 da reação de transesterificação enzimática *in situ* (rosa), padrão de biodiesel de girassol (preto) e óleo de girassol (azul)

É possível verificar que a amostra do ensaio 4 apresenta a conversão do material lipídico extraído do meio em biodiesel, não observando resquício sinal na região de triacilgliceróis. Desta forma é possível afirmar que houve bioconversão de

100%, ou seja, todo material lipídico extraído do meio foi diretamente transformado em ésteres metílicos, evidenciando a potencialidade deste método para a produção de forma ambientalmente correto.

Segundo Vyas, Verma e Subrahmanyam (2010) a transesterificação enzimática é uma técnica de produção de biodiesel bastante promissora. Testes realizados em óleo de soja utilizando enzimas *R. oryzae*, *C. rugosa*, *P. fluorescens*, *Novozym 435* e *B. cepacia* demonstram a viabilidade desta técnica, porém, ressalta-se a importância da água para uma conversão efetiva. Apesar do alto custo da enzima, a mesma pode ser reutilizada e ainda tem vantagem sobre outros catalisadores por causar menores impactos ambientais, além de o rendimento poder atingir facilmente 100% de conversão.

Velasquez, Lee e Harvey (2011) apontam que o método de transesterificação *in situ*, ou “extração reativa” de lipídios da biomassa de algas apresenta grande potencial devido reduzir operações o que acarreta a redução de custos de produção.

Na Figura 25 é possível verificar a sobreposição dos cromatogramas dos 8 ensaios para a produção de biodiesel via transesterificação enzimática *in situ*, indicando a formação de uma grande quantidade de ésteres metílicos.

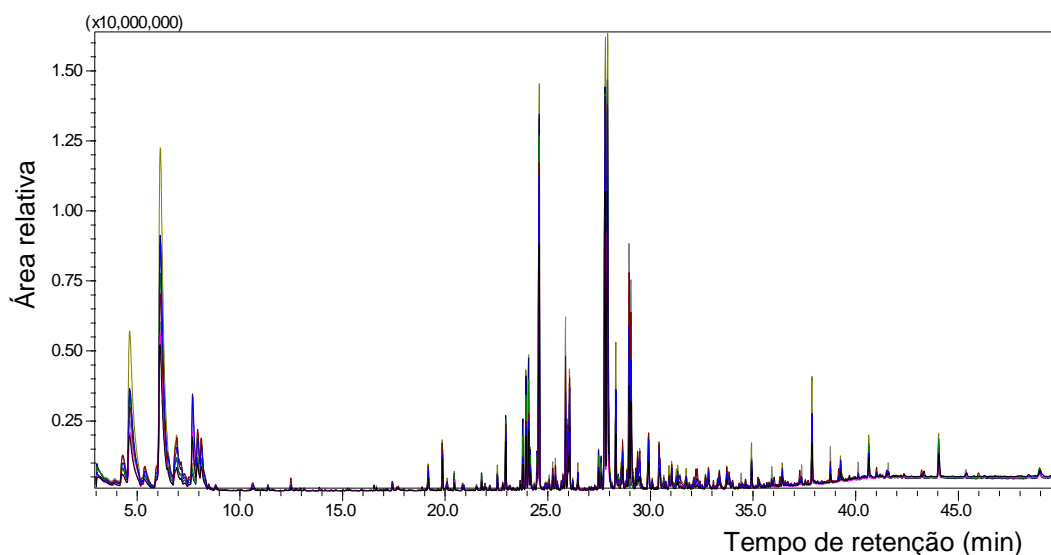


Figura 25- Sobreposição dos cromatogramas das amostras analisados em CG-MS das reações de transesterificação enzimática *in situ*

Velasquez, Lee e Harvey (2011) utilizando a microalga *Chlorella vulgaris* para a produção de biodiesel via transesterificação *in situ* utilizando catalisador ácido

obteve rendimento de até $96,8 \pm 6,3$ %, já utilizando catalisador alcalino o rendimento caiu para $77,6 \pm 2,3$ %.

Apesar da necessidade de mais estudos quanto à produção de biodiesel a partir de microalgas, pode-se dizer que estes micro-organismos apresentam grande potencial para suprir esta necessidade uma vez que são uma matéria-prima sustentável e ambientalmente plausível (AHMAD et al., 2011).

5.5 Produção de bioetanol utilizando biomassa de microalgas

5.5.1 Análise exploratória da degradação de biomassa microalgais utilizando fungos filamentosos

Foi realizada uma análise exploratória para verificar a capacidade de hidrólise da biomassa microalgais por fungos filamentosos em fermentação submersa utilizando micro-organismos isolados pertencentes ao laboratório de Microbiologia Industrial do Curso de Química Industrial da Universidade de Santa Cruz do Sul-UNISC em microescala Tabela 10.

Tabela 10- Seleção de micro-organismos para hidrólise de biomassa microalgais

Amostragem	Desenvolvimento
<i>A. niger</i> USP 898	++
LAL-01	-
<i>A. niger</i> CMMI 101	+
<i>A. niger</i> CMMI 111	+
<i>A. fumigatus</i> USP2	++
<i>A. niger</i> CMMI 10 A	++
MJV-1,127	-
HSC-S4-48	++
JVRP C3-2	+
HSC 55-50	++
C. 5 -2	++
VAC – 03	-
TOS-13	-
<i>A.niger</i> CMMI 15	++
<i>A. terreus</i> USP1	++
LAL-02	-
JVRP C3 – 3	++
LAL – 14	++
<i>A. niger</i> CMMI 01	++
GCB- 2	-
YG3	++
HSC – S2 – 11	+
<i>A. niger</i> USP 9	+
JVRP C2-4	-
HSC SR 2.1	++
USP 174	++
YAC- 02	+
CKC-01	++
<i>A. terreus</i> CMMI 233-3	++
Branco (biomassa+água)	-

(-) não apresentou crescimento micelar, (+) apresentou pouco crescimento micelar e (++) apresentou maior crescimento micelar

Foi possível verificar o desenvolvimento fúngico na maior parte dos ensaios, como pode ser verificado na Tabela 10, o que é um indicativo de consumo do substrato.

Após a análise visual, realizou-se análise dos hidrolisados por espectroscopia de infravermelho, os espectros foram utilizados para análise exploratória. A Figura 26 apresenta os espectros de infravermelho sobrepostos.

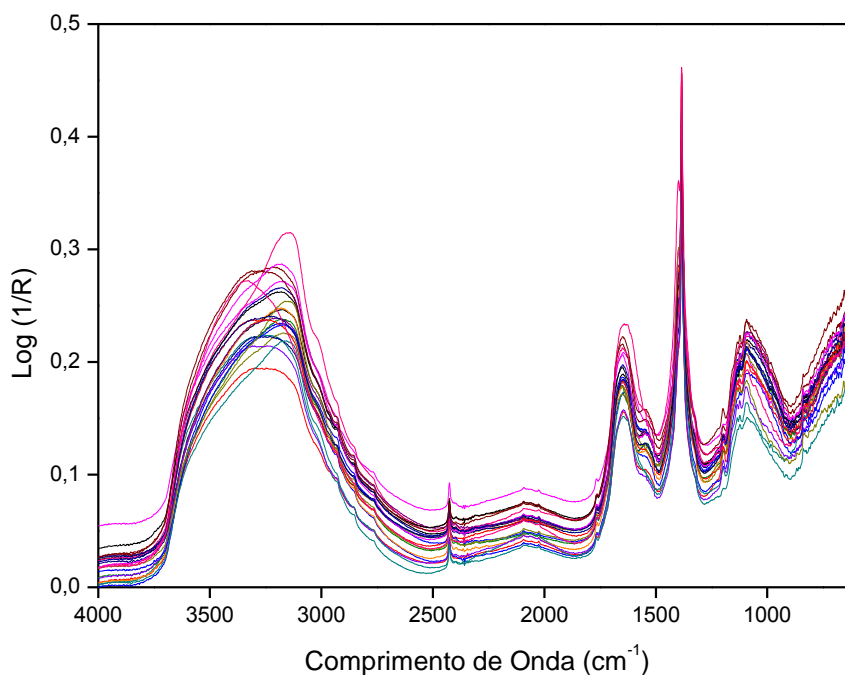


Figura 26- Espectros de infravermelho sobrepostos representado área espectral utilizada para Análise Hierárquica de Cluster

Segundo Stehfest, Toepel e Wilhelm (2005) há uma complexidade na avaliação dos espectros de infravermelho da biomassa de microalgas devido à sobreposição das macromoléculas celulares, proteínas, lipídios, ácidos nucleicos, carboidratos entre outros compostos presentes nas células como pode ser verificado na Figura 27.

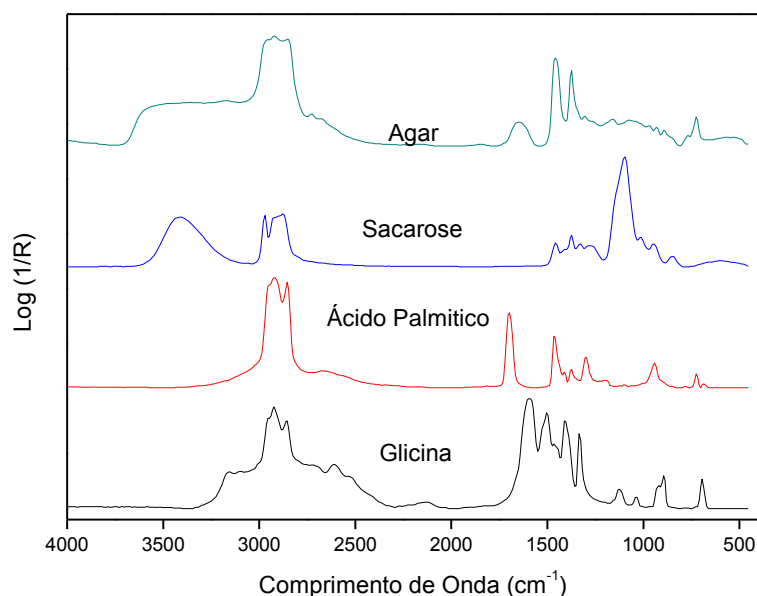


Figura 27- Sobreposição dos espectros de infravermelhos de alguns componentes presentes nas células de microalgas

Fonte: OMNIC 4.1 a

Giordano et al.(2001) destaca que a frequência exata de uma vibração depende da força das ligações envolvidas, a massa dos átomos dos componentes envolvidos e a química dos grupos moleculares. A maior parte das bandas de absorção observadas na região da impressão digital 1800-400 de um espectro pode ser atribuída aos grupos funcionais (Tabela 11).

Tabela 11- Bandas do espectro de infravermelho médio atribuídas a grupos funcionais

Comprimento de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
3000-2800	ν C-H da saturação CH
~1740	ν C=O de grupo éster, essencialmente a partir de lipídios de ácidos graxos
~1650	ν C=O de amidas a partir de proteínas
~1540	δ N-H de amidas a partir de proteínas
~1455	δ_{as} CH ₃ e δ_{as} CH ₂ de proteínas
~1398	δ_s CH ₃ e δ_s CH ₂ de proteínas, e ν_s C-O do grupo COO ⁻
~1250-1230	ν_{as} P=O de grupos fosfodiéster de ácidos nucleicos e fosfolipídios
~1200-900	ν C-O-C de sacarídeos
~1075	ν Si-O de silicato

ν_{as} estiramento assimétrico; ν_s estiramento simétrico; δ_{as} deformação assimétrica; δ_s deformação simétrica

Fonte: GIORDANO et al., 2001

Foi utilizada toda região espectral e os dados foram processados utilizando o software pirouette 3.11, realizando a Análise Hierárquica de Cluster (HCA), para verificar a formação de grupos que apresentem alguma similaridade química obtendo o dendograma como pode ser visualizado na Figura 28.

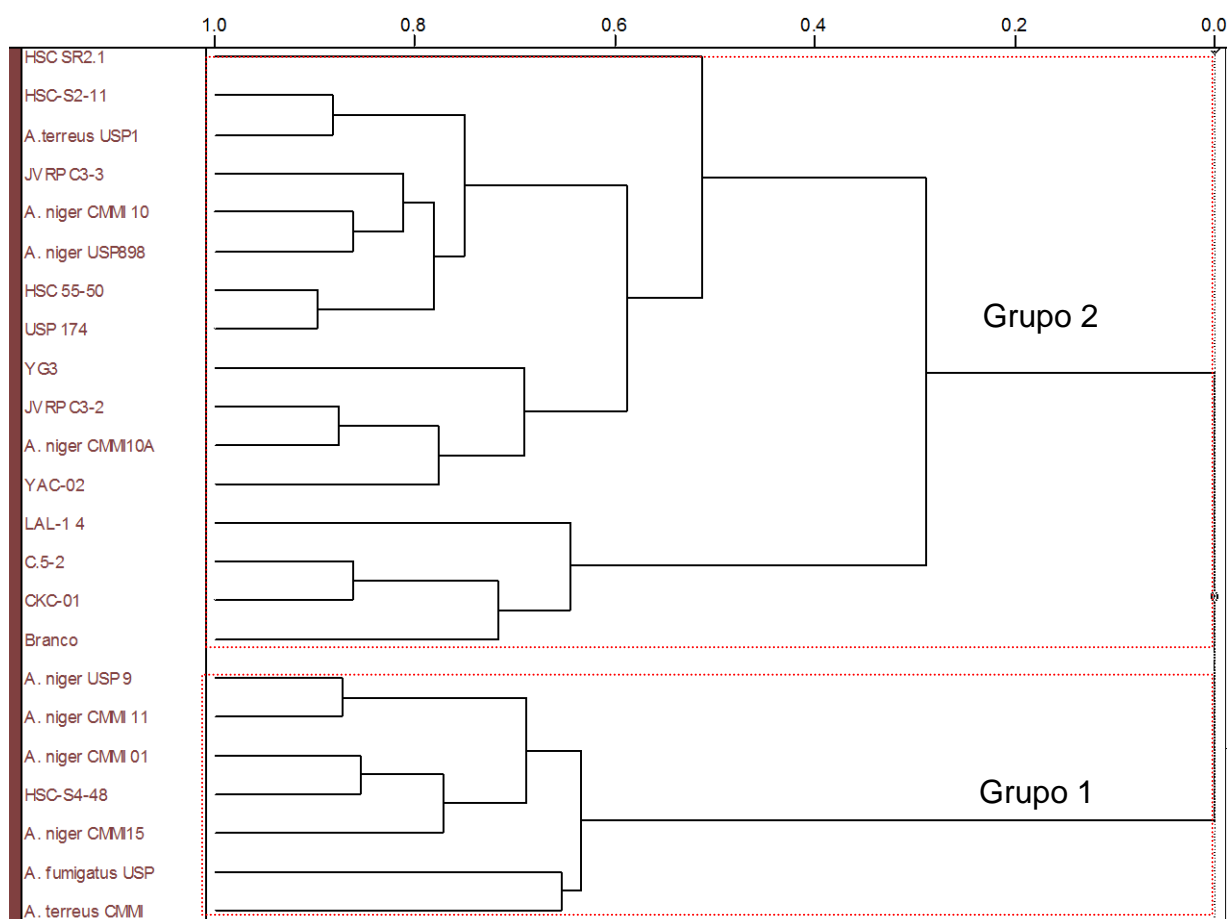


Figura 28- Dendograma dos espectros de infravermelho das amostras do ensaio de hidrólise da biomassa microalgais utilizando toda faixa espectral.

Foi possível verificar a formação de dois grandes grupos, sendo as amostras do grupo 2 são as que mais se assemelham com o branco (biomassa+água) indicando que a hidrólise da biomassa microalgais foi pouco eficiente.

Já as amostras do grupo 1 não apresentam nenhuma similaridade com o grupo 2 indicando que a hidrólise da biomassa microalgais é mais efetiva. Desta forma as cepas de interesse foram *A. terreus* CMMI 233-3, *A. fumigatus* USP2, HSC-S4-48, *A. niger* CMMI 01, *A. niger* CMMI 111, *A. niger* USP 9, *A. niger* CMMI 15.

Na Figura 29 é possível verificar as médias dos espectros do grupo 1 e 2 observando diferenças nas regiões entre 3500 à 2500, 2100 à 1900 e 1700 à 1500 cm^{-1} .

Entretanto, através da avaliação visual não é possível afirmar que essa variação é responsável pela separação dos grupos. Por este motivo foram realizadas as médias dos espectros dos grupos após normalização e aplicado o teste *t-Student* para determinar as regiões do espectro que apresentam $t < 0,05$ visando identificar a região espectral que apresenta maior contribuição para descrever a hidrólise da biomassa microalgais.

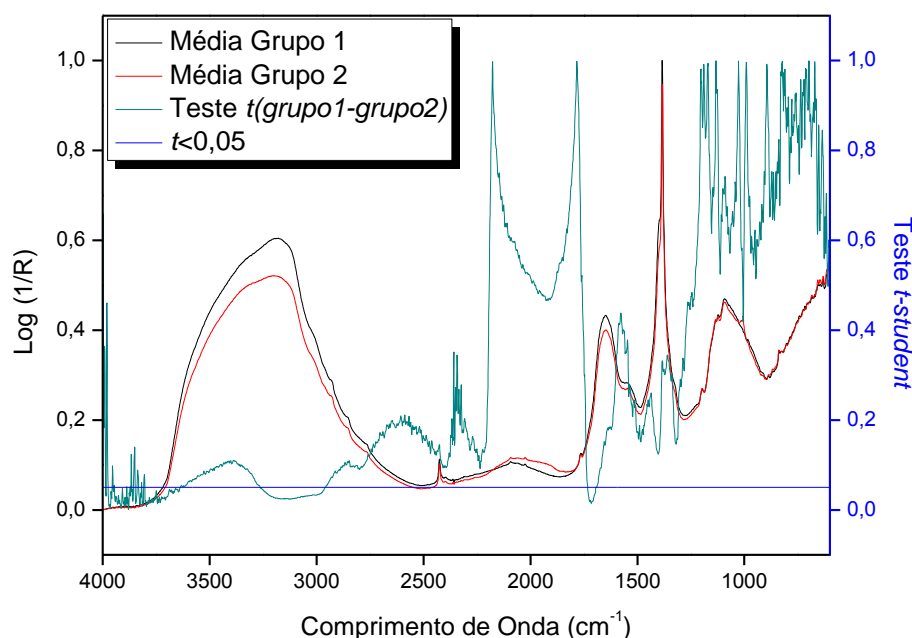


Figura 29- Média dos espectros de infravermelho dos grupos selecionados pela HCA e teste *t-Student*

Na Figura 29 é possível verificar que as regiões do espectro que apresentam informação química para a separação dos grupos são as de 1694 a 1732, 2961 a 3264 e 3638 a 3986 cm^{-1} . Estas regiões agregam a informação química responsável pela separação do grupo não hidrolisado ou parcialmente hidrolisado do grupo que apresenta vários graus de hidrólise.

Foi realizada novamente a HCA utilizando somente a região espectral selecionada no teste *t* visando verificar se ocorre perda de informação do sistema como pode ser observado na Figura 30.

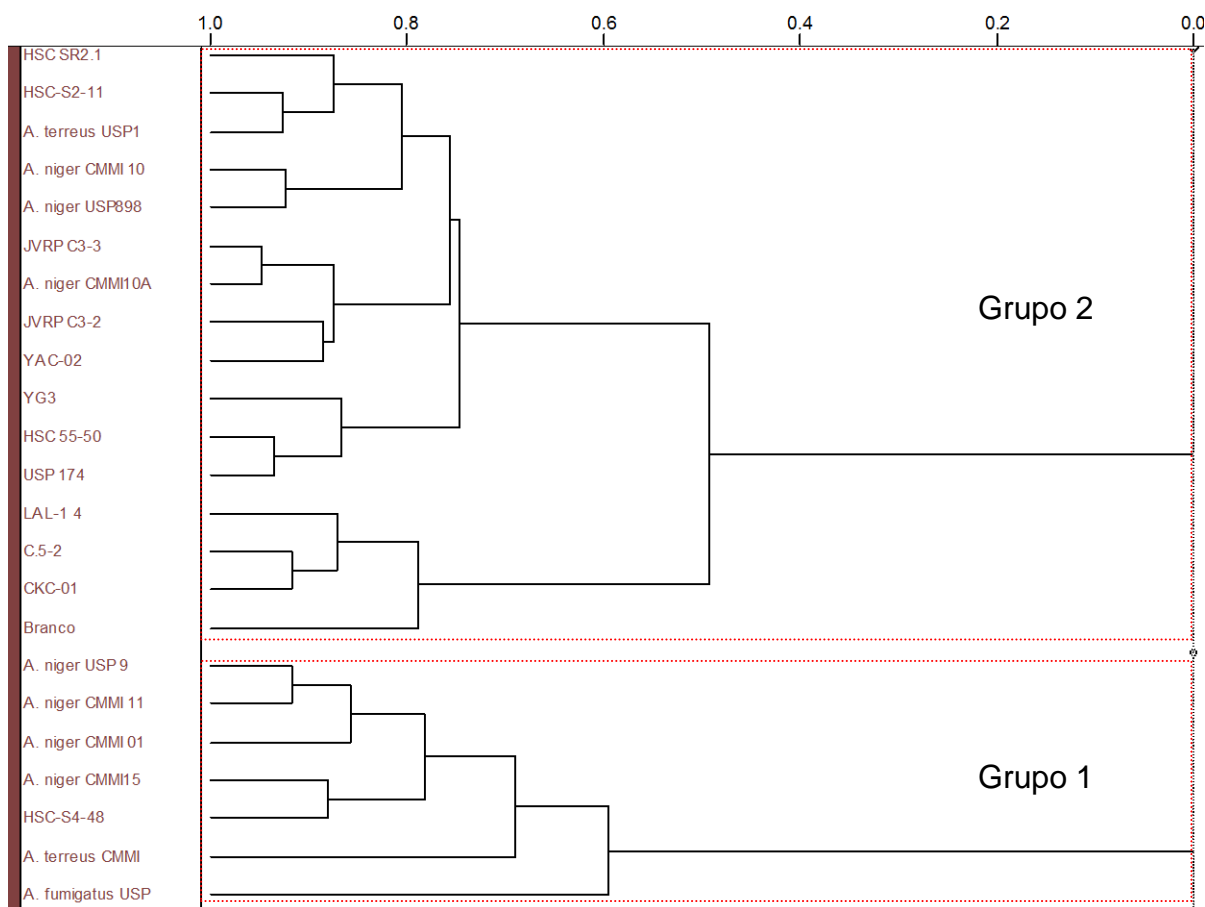


Figura 30- Dendograma dos espectros de infravermelho das amostras do ensaio de hidrólise da biomassa microalgais utilizando a faixa espectral selecionada no teste *t-student*

Analisando o novo dendograma gerado é possível verificar que não houve alteração das cepas pertencentes a cada grupo, somente aumentou a similaridade entre as mesmas de cada grupo, ou seja, através da exclusão das regiões selecionadas pelo teste *t*, o HCA tornou-se mais robusto representando de forma mais efetiva o efeito da hidrólise.

A hidrólise enzimática de *Chlorococcum sp.* usando celulase obtida a partir de *Trichoderma reesei* foi reportada por Harun e Danquah (2011b) o qual obteve eficiência de conversão a de glicose de 64,2%.

De acordo com Yang, Ding, e Chen (2009) as taxas de hidrólises enzimáticas são drasticamente reduzidas pela inibição do produto gerado, entretanto com a utilização de reatores com membrana é possível obter um acréscimo de até 200% através da remoção contínua de inibidores.

5.5.2 Hidrólise de biomassa microalgais para produção de bioetanol

Os fungos filamentosos selecionados no ensaio 5.5.1 foram utilizados para hidrolisar biomassa de microalgas para posterior ensaio de fermentação. Observou-se que todas as amostras apresentaram contaminação, exceto a amostra hidrolisada pelo *A. terreus* CMMI 233-3, este fato pode estar diretamente relacionado com a maior produção de etanol, uma vez que quando há contaminação por um micro-organismo ocorre à competição entre prejudicando o processo de fermentação executada pela levedura como pode ser verificado na Figura 31.

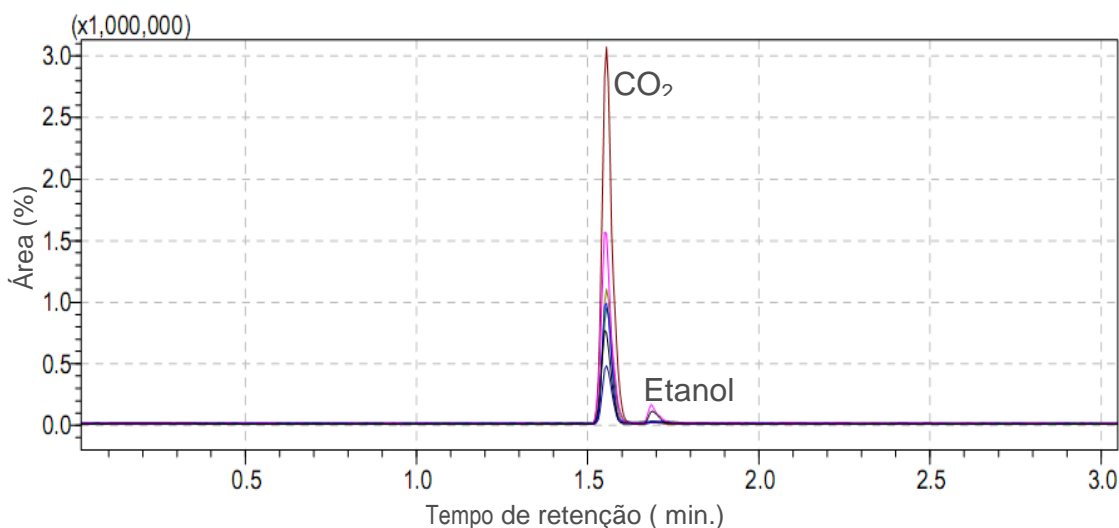


Figura 31- Cromatogramas do material hidrolisado e fermentando utilizando o método de *headspace*, onde cromatograma preto *A. terreus* CMMI 233-3, rosa HSC-S458, azul *A. fumigatus* USP 2, marrom *A. niger* USP 9, verde *A. niger* CMMI 01, azul marinho *A. niger* CMMI 111 e amarelo *A. niger* CMMI 15

Avaliando o cromatograma da Figura 31, é possível verificar a formação de etanol após fermentação do material hidrolisado por *A. terreus* CMMI 233-3 e HSC-S458, *A. niger* USP 9, *A. niger* CMMI 01 e *A. niger* CMMI 111. Já as amostras de *A. fumigatus* USP 2 e *A. niger* CMMI15 não apresentaram etanol no meio, no entanto, todas as amostras analisadas apresentaram área relacionada à produção de CO₂, indicando que houve consumo do material hidrolisado por micro-organismos para realização de processo fermentativo.

Em estudos anteriores, Khambhaty et al. (2012) utilizando a alga *Kappaphycus alvarezii* hidrolisada com H_2SO_4 , obteve conversão de 80 % do açúcar redutor em bioetanol.

Já Demirbas e Demirbas (2011) destacam que a utilização de biomassa de algas para a produção de bioetanol, bem como, para a produção de biodiesel é uma alternativa sustentável e ambientalmente correta para a produção de biocombustíveis renováveis, apresentando uma facilidade de cultivo podendo-se utilizar algas marinhas, de água doce ou até mesmo provenientes de efluentes, como foi realizado neste trabalho.

Assim, as microalgas podem ser utilizadas como fonte de alto rendimento para a produção de bioetanol, devido ao seu alto teor de açúcares, sem comprometer o abastecimento de alimentos, uso das florestas tropicais e terras aráveis (MIRANDA, PASSARINHO e GOUVEIA, 2012).

5.6 Seleção, identificação e análise de crescimento das microalgas cultivadas no protótipo de sistema misto de cultivo

Como forma de seleção de microalgas que se adaptassem a este sistema, adicionou-se efluente da saída do decantador da estação de tratamento de efluentes da UNISC e acompanhou-se o desenvolvimento de algas. Conforme pode ser observado na Figura 32.

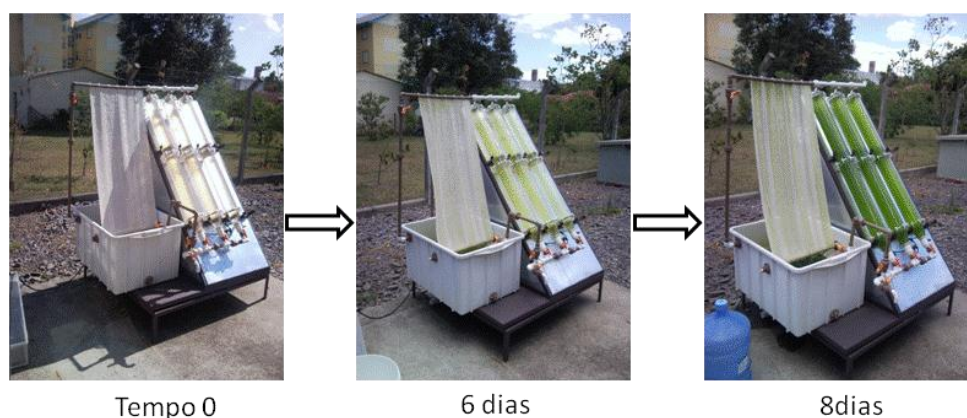


Figura 32- Acompanhamento do desenvolvimento no protótipo de sistema misto de cultivo microalgas nativas oriundas da estação de tratamento de efluentes da UNISC

Devido ao sistema ser aberto existe um conjunto de micro-organismos associados, o que aumenta a capacidade de biorremediação do sistema. As cepas então foram identificadas quanto ao gênero como *Chlorella cf*, *Euglena cf*, *Spirogyra cf*, *Scenedesmus cf*, *Desmodesmus cf*, *Pseudokirchneriella cf* (algas verdes-chlorophyta); *Phormidium cf* (cianobactéria); e *Nitzschia cf* (diatomácea). Cabe ressaltar que a identificação foi realizada através de comparação visual com as cepas catalogadas por Bicudo e Menezes (2006), utilizando microscópio óptico Bioval Model L2000A com aumento de 10 e 40 vezes.

Como o conjunto de algas desenvolvidas nestes sistemas pode ser diferente de um estudo para outro, é necessário maior aprofundamento, sendo este um resultado preliminar.

Quanto ao perfil de crescimento das algas que se desenvolveram no sistema misto sem aporte de CO₂ pode-se conforme Figura 33.

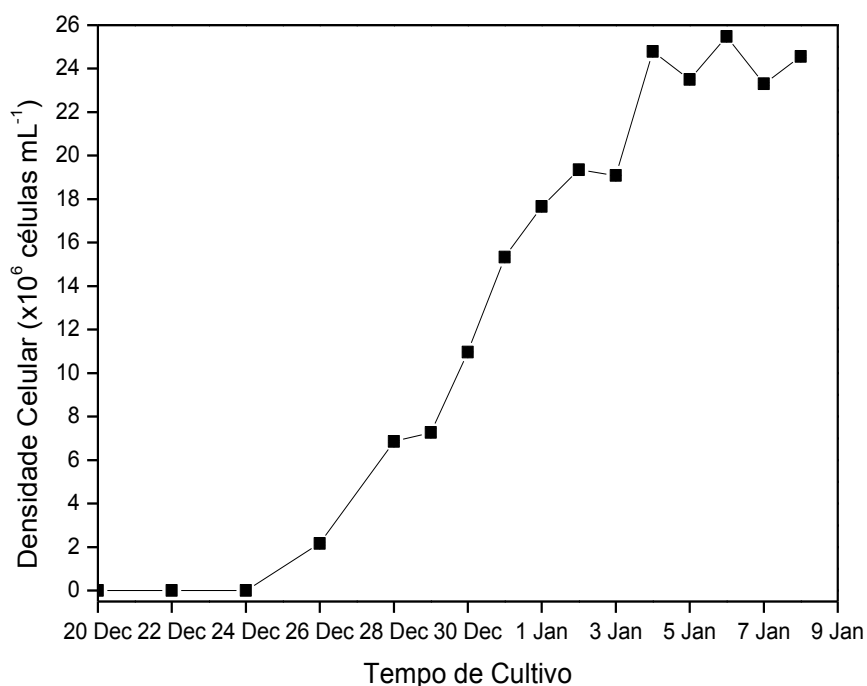


Figura 33- Perfil de crescimento das microalgas que se desenvolveram no sistema misto sem aporte de CO₂

Pode ser observada na Figura 33 que o período entre o 1º e o 5º dia de cultivo refere-se à fase de indução (Lag), fase esta de adaptação da cultura as condições de cultivo, a partir do 6º dia são observadas a fase log, fase de maior reprodução

celular, a partir do 15^o dia de cultivo foi observado à fase estacionária do sistema quando aumenta a morte celular devido a falta de nutrientes no meio provocada pelo aumento da população acarretando a liberação de compostos intracelulares prejudiciais ao desenvolvimento das mesmas. No 7^o e 8^o, bem como no 12^o e 13^o dia foi observado ao período de transição da fase diauxica, ou seja, é o período necessário para a adaptação do micro-organismo, onde começa assimilar um novo substrato.

Foi avaliado a o variação do pH do meio durante o desenvolvimento das microalgas juntamente com a divisão celular como pode ser observado na Figura 34.

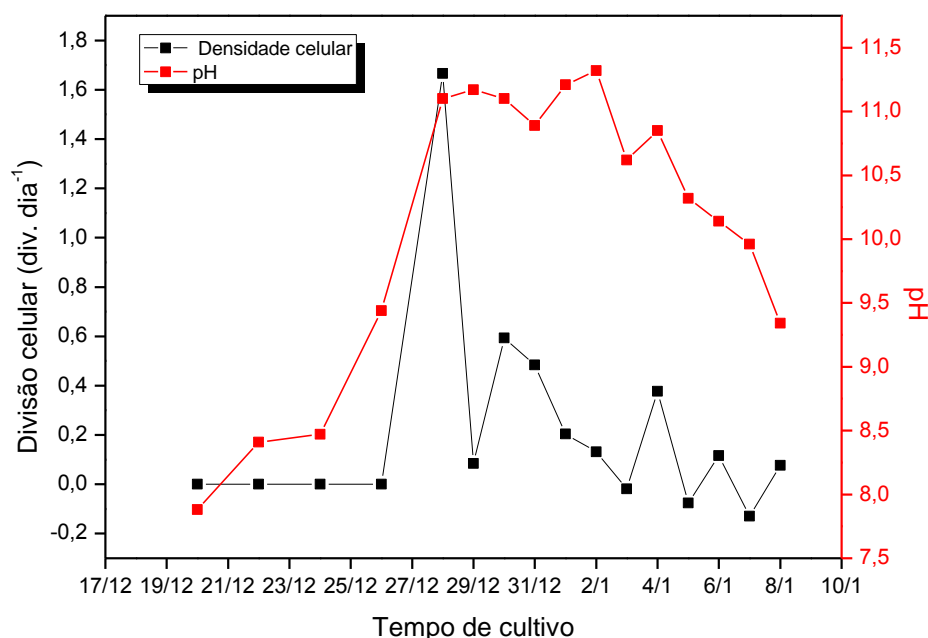


Figura 34- Comportamento do pH e da divisão celular durante o cultivo de microalgas no sistema misto sem aporte de CO₂

Na Figura 34 é possível observar a elevação do pH no decorrer do tempo de cultivo se mantendo entre 11,5 e 10,5 no período exponencial de crescimento e decaindo após atingir a fase estacionária.

O crescimento celular associado à assimilação de CO₂ gera uma aumento dos valores de pH devido ao fato das células consumirem o carbono inorgânico dissolvido, o que por sua vez força o deslocamento do equilíbrio químico do carbonato-bicarbonato no sistema tampão.

É possível verificar uma alta divisão celular a partir do 6º dia de cultivo obtendo $1,66 \pm 0,04$ divisões dia^{-1} , no decorrer dos dias houve flutuações observando que a partir do 16º dia de cultivo a divisão celular é muito próxima a zero, ou seja, o número de morte celular é semelhante ao de divisão celular atingindo a fase estacionária.

A avaliação de produção de biomassa seca, percentual lipídico e densidade celular máxima estão destacadas na Tabela 12.

Tabela 12- Determinação de biomassa e lipídios das microalgas cultivadas no sistema misto sem aporte de CO_2

Parâmetros	Resultados
Amostragem (dias de cultivo)	20
DCM ($\times 10^6$ células mL^{-1})	$25,48 \pm 0,02$
Divisão celular média (K)	$0,29 \pm 0,48$
Biomassa (g L^{-1})	$0,62 \pm 0,11$
Lipídios (%)	$1,36 \pm 0,29$

A densidade máxima obtida ocorreu no 18º dia de cultivo atingido $25,48 \times 10^6$ células mL^{-1} , obtendo uma divisão celular média de $0,29 \pm 0,48$ divisões dia^{-1} . A amostra apresentou $0,62 \pm 0,11$ g de biomassa por litro de cultivo e teor lipídico $1,36 \pm 0,29$ % em 20 dias de cultivo.

Foi elaborada uma nova curva de crescimento partindo de um inóculo inicial de $4,7 \times 10^6$ células mL^{-1} com inserção de CO_2 ao meio durante o período de maior luminosidade podendo ser visualizado na Figura 35.

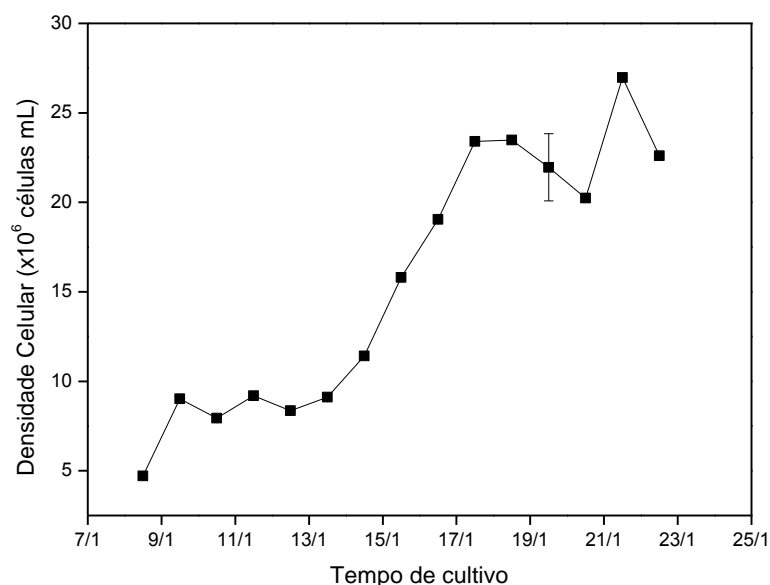


Figura 35- Perfil de crescimento das microalgas cultivadas no sistema misto com aporte de CO_2

Avaliando a Figura 35 observou a duplicação da densidade celular no primeiro dia de cultivo, entretanto do 2º ao 5º dia a densidade celular se manteve praticamente inalterada, retomando o aumento celular a partir do 6º dia de cultivo. Esse efeito pode ser explicado pela pouca incidência de radiação solar (Figura 36) neste período ocasionando a diminuição da fotossíntese e por sua vez diminuindo a divisão celular.

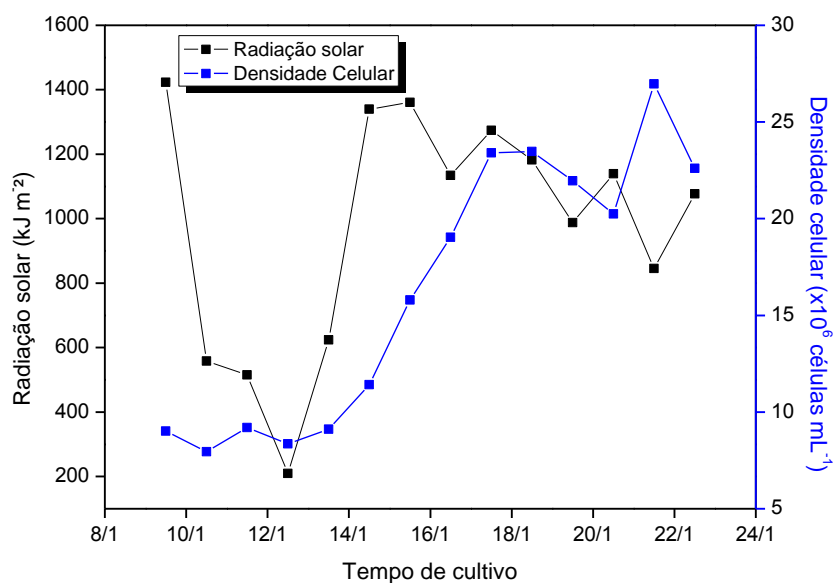


Figura 36- Avaliação da radiação solar média diária obtida junto ao Instituto Nacional de Metrologia sobre densidade celular diária.

A densidade celular máxima atingida foi de $26,97 \times 10^6$ células mL^{-1} , semelhante aos valores obtidos no ensaio sem aporte de CO_2 $25,48 \times 10^6$ células mL^{-1} , somente com um tempo de resposta mais curto. Era esperada uma elevação mais expressiva da densidade celular neste ensaio devido à adição de CO_2 . Tal efeito pode ser explicado pela formação de biofilme junto à tela (Figura 37), o que não havia ocorrido no ensaio anterior. O biofilme foi retirado e seco obtendo 3,6 g de biomassa seca.



Figura 37- Desenvolvimento de microalgas no sistema misto de cultivo utilizando efluente da Estação de Tratamento de Efluentes - UNISC como meio de cultura.

O acompanhamento da divisão celular bem como do pH do meio durante o período de cultivo pode ser evidenciado na Figura 38.

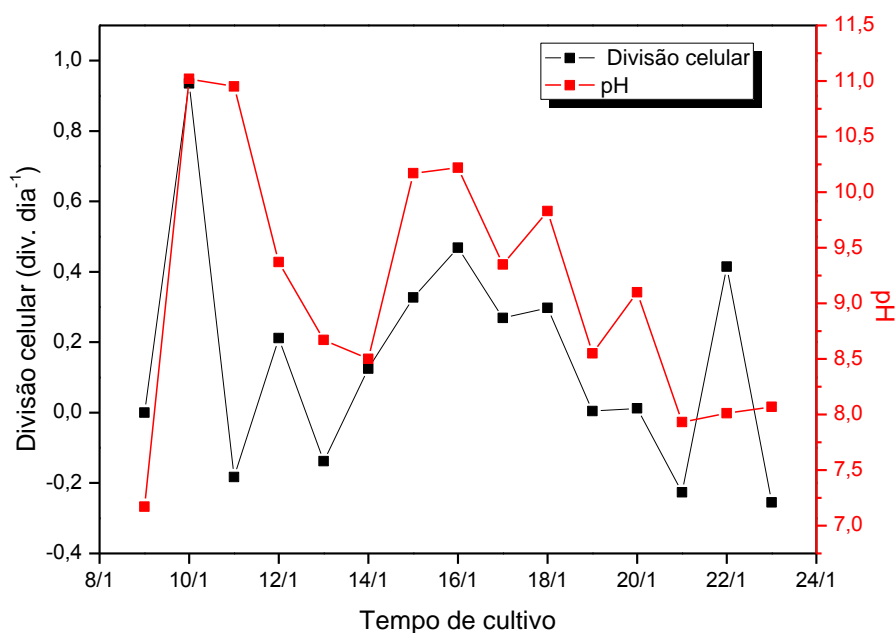


Figura 38- Acompanhamento do pH e divisão celular durante o cultivo de microalgas no sistema misto com aporte de CO₂

Avaliando a Figura 38, é possível verificar que no período de 12 a 14 de janeiro, bem como do dia 17 a 21 de janeiro a redução do número de divisão celular acarreta a queda do pH do meio; bem como o aumento da divisão celular acarreta a elevação do pH como pode ser verificado nos dias 9, 14 a 16 de janeiro. Desta forma é possível afirmar que a avaliação do pH do meio pode ser utilizada como indicativo da reprodução das microalgas.

A avaliação de produção de biomassa seca, percentual lipídico e densidade celular máxima de máxima das microalgas cultivadas no sistema misto com aporte de CO₂ estão destacadas na Tabela 13.

Tabela 13- Determinação de biomassa e lipídios das microalgas cultivadas no sistema misto com aporte de CO₂

Parâmetros	Resultados
Amostragem (dias de cultivo)	15
DCM (x10 ⁶ células mL ⁻¹)	26,97 ± 0,21
Divisão celular média (k)	0,16 ± 0,33
Biomassa (g.L ⁻¹)	0,72 ± 0,15
Lipídios (%)	6,07 ± 0,12

A densidade máxima obtida ocorreu no 13^o dia de cultivo atingido $26,97 \times 10^6$ células mL⁻¹, obtendo uma divisão celular média de $0,16 \pm 0,33$ divisões dia⁻¹. A amostra apresentou $0,72 \pm 0,15$ g de biomassa por litro de cultivo e teor lipídico $6,07 \pm 0,12$ % em 15 dias de cultivo.

O perfil de ácidos graxos das microalgas cultivadas no sistema misto é apresentado na Figura 39 através da sobreposição dos cromatogramas a partir dos experimentos com e sem aporte de CO₂. Também foi realizada a análise do perfil lipídico das algas aderidas na tela do sistema cultivadas com aporte de CO₂, verificando se apresentam diferenciação.

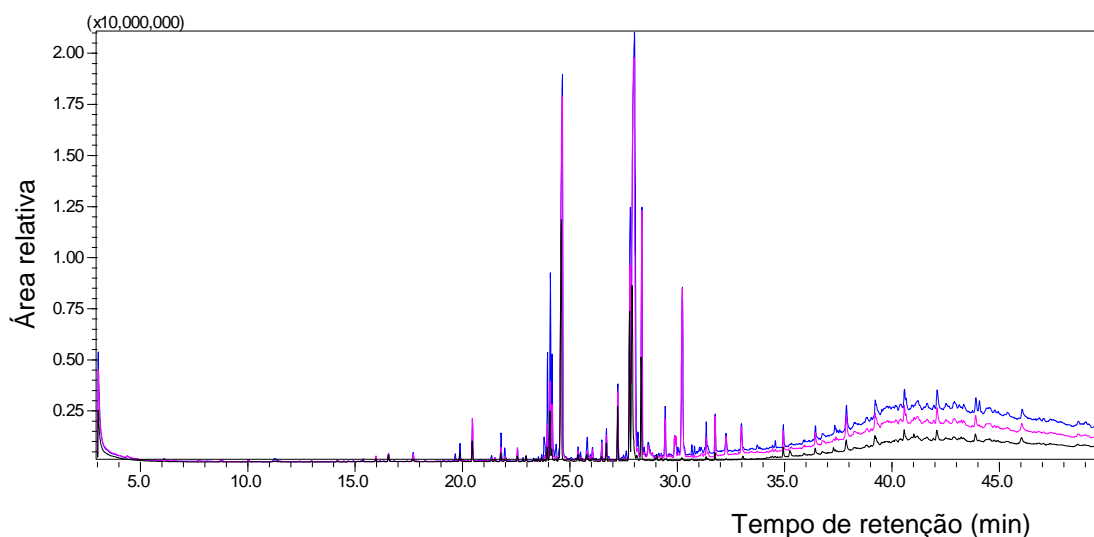


Figura 39- Cromatogramas dos ésteres metílicos referentes aos ácidos graxos presentes no óleo de microalgas produzidas em efluente com e sem aporte de CO₂

A Tabela 14 apresenta os percentuais relativos as áreas dos ácidos graxos encontrados na biomassa das microalgas cultivada no sistema misto utilizando efluente como meio de cultura com e sem aporte de CO₂, bem como as algas aderidas na tela.

Tabela 14- Proporção relativa (%) dos ésteres de ácidos graxos encontrados para na biomassa de microalgas após cultivo em efluente, com e sem aporte de CO₂

Ácido Graxo	Sem CO ₂		Com CO ₂		Com CO ₂ (tela)	
	Tempo de retenção (min.)	Área relativa (%)	Tempo de retenção (min.)	Área relativa (%)	Tempo de retenção (min.)	Área relativa (%)
Ácido Caprílico (C8:0)	6,56	0,05	6,58	0,08	-	-
Ácido Mirístico (C14:0)	20,45	1,93	20,46	1,60	20,46	1,85
Ácido Pentadecílico (C15:0)	22,55	0,50	22,56	0,44	22,56	0,52
Ácido Palmitoleico (C16:1n-7)	24,16	1,28	24,17	2,02	24,18	4,20
Ácido Palmítico (C16:0)	24,60	29,58	24,64	24,68	24,65	32,50
Ácido Margárico (C17:0)	25,78	0,89	26,49	0,62	26,49	1,02
Ácido Linoleico-cis,cis (C 18:2n-6)	27,78	15,12	27,80	9,51	-	-
Ácido Oleico (C 18:1n-9)	27,89	26,60	27,98	39,94	27,81	20,19
Ácido Estearílico (C 18:0)	28,32	9,75	28,35	9,69	28,35	12,16
Ácido Araquídico (C 20:0)	31,75	0,70	31,76	1,43	31,76	1,72
Ester**	-	13,6	-	9,97	-	25,84

* ésteres que podem ter sido extraídos da amostra, não são resultados da transesterificação in situ porque não foi utilizado etanol na reação; ** soma das áreas dos ésteres presentes, mas não identificados de acordo com o padrão

O percentual lipídico das biomassas de microalgas cultivadas com e sem aporte de CO₂ apresentaram grande variações. Na biomassa de microalgas a qual não houve a adição de CO₂, o percentual lipídico foi de 1,36 %, com aporte de CO₂ passou para 6,07%, obtendo um aumento de aproximadamente 4,5 vezes.

Entretanto este aumento não se deve somente ao aporte de CO₂ ao meio, outra característica que pode ter influenciado seria abaixa carga de nitrogênio. Jiang et al. (2011) utilizando águas residuais municipais com aporte de 15% de CO₂ para o cultivo de *Nannochloropsis sp.* em fotobiorreator tubular, obteve de biomassa e teor lipídico de 2,23 g L⁻¹ e 59,9% após o período de cultivo de 12 dias realizando privação de nitrogênio ao meio e expondo a grande intensidade luminosa.

Avaliando a Figura 40 é possível verificar uma variação na composição de ácidos graxos presente nas amostras analisadas.

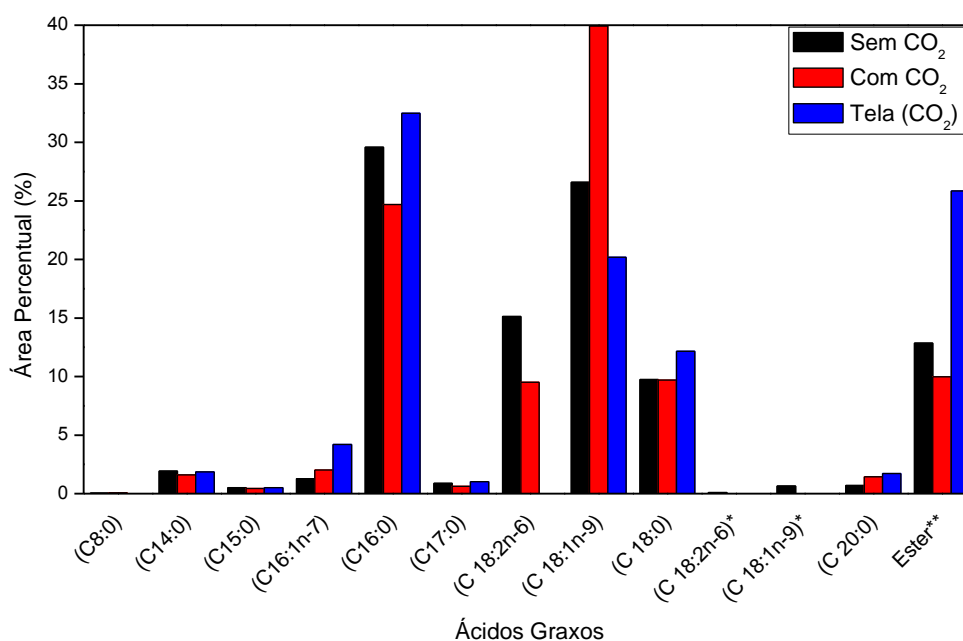


Figura 40- Proporção de ácidos graxos presentes nas biomassas de microalgas analisadas

Os ácidos caprílico e linoleico foram determinados nas microalgas cultivadas com e sem aporte de CO₂, porém nas algas fixadas na tela não foi observado. O restante dos ácidos graxos foi encontrado em todas as biomassas, porém em proporções diferentes.

O ácido esteárico apresentou proporções semelhantes na biomassa de microalgas cultivadas com e sem aporte de CO₂, porém na biomassa fixada na tela esta proporção foi maior, assim como nos ácidos margárico, palmítico e palmitoleico atingindo 12,16; 1,02; 32,48 e 4,2 %, respectivamente. O ácido mirístico apresentou maior proporção na biomassa de microalgas cultivada sem CO₂. O ácido oleico apresentou maior proporção nas microalgas cultivadas com aporte de CO₂ (39,94%). Esta é uma característica importante para o uso deste na produção de bioenergia, uma vez que não é rico em poli-insaturados.

Segundo Guschina e Harwood (2006) as proporções, bem como os tipos de ácidos graxos produzidos estão relacionados com a espécie da alga, composição do meio e do ambiente o qual se desenvolve. Aresta, Dibenedetto e Barbeiro (2005) descreve que é observado na microalga *C. linum* maiores percentuais de ácidos mirístico, palmítico, oleico e linoleico.

5.7 Caracterização analítica do efluente da ETE-UNISC

A Tabela 15 apresenta os resultados obtidos referentes aos parâmetros da caracterização analítica do efluente antes e após o uso do mesmo como meio de cultura no sistema misto para o cultivo de microalgas (Anexos C, D, E e F). O efluente inicial refere-se ao efluente provindo da saída do decantador da ETE-UNISC o qual possui vazão de aproximadamente $90 \text{ m}^3 \text{ dia}^{-1}$, já o efluente caracterizado como pós-tratamento refere-se ao efluente após o cultivo de microalgas no sistema misto seguido de eletroflotação para a retirada da biomassa de microalgas. O tempo de retenção no sistema foi de 20 dias sem aporte de CO_2 e de 15 dias com aporte de CO_2 .

Tabela 15- Resultados obtidos quanto aos parâmetros da caracterização analítica do efluente da ETE-UNISC antes e após o cultivo utilizando o sistema misto com e sem aporte de CO_2

Parâmetros	Sem aporte CO_2		Com aporte CO_2	
	Inicial	Após tratamento	Inicial	Após tratamento
Alc. Bicarbonatos mg L^{-1} (CaCO_3)	912,00	570,00	570,00	684,00
Alc. carbonatos mg L^{-1} (CaCO_3)	0,00	0,00	0,00	0
Alc. hidróxidos mg L^{-1} (CaCO_3)	0,00	0,00	0,00	0
Alc. total mg L^{-1} (CaCO_3)	912,00	570,00	570,00	684,00
DBO_5 mg L^{-1} (O_2)	23,30	56,90	59,10	22,7
DQO mg L^{-1}	84,00	140,00	68,00	88,00
Fósforo total mg L^{-1}	1,24	0,43	0,04	0,04
Nitrogênio amoniacal mg L^{-1}	67,70	<0,5	6,40	1,9
Nitrogênio total Kjeldahl mg L^{-1}	140,00	1,30	7,00	2,6

O efluente apresentou grandes variações na sua composição como pode ser verificado na tabela 15. É possível verificar uma queda bastante expressiva nos parâmetros de alcalinidade, fósforo total, nitrogênio amoniacal e nitrogênio total Kjeldahl. Entretanto observou um aumento nos parâmetros DBO_5 e DQO comparado aos iniciais no sistema sem aporte de CO_2 .

Com aporte de CO_2 ao meio foi observada uma elevação nos parâmetros de alcalinidade e DQO e uma queda nos valores de nitrogênio amoniacal, nitrogênio total

Kjeldahl e DBO_5 , já a concentração de fósforo se manteve inalterada. Na Figura 41 é possível visualizar a eficiência de depuração do sistema.

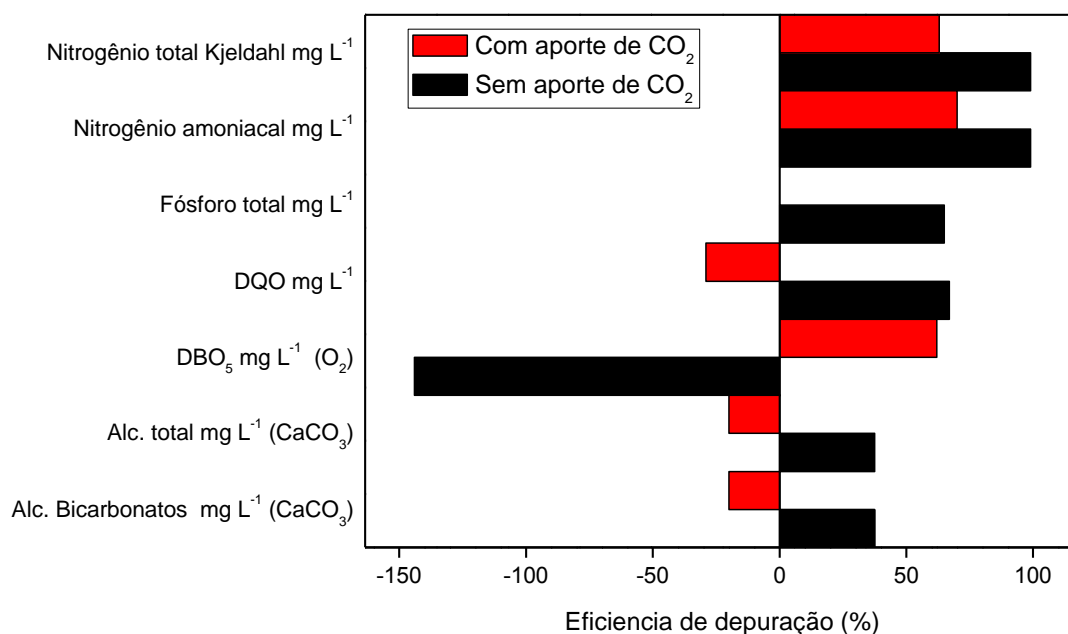


Figura 41- Eficiência de depuração do efluente da estação de tratamento da UNISC utilizando o sistema misto para o cultivo de microalgas com e sem aporte de CO_2

De acordo com a resolução 128/CONSEMA, o limite de carga de nitrogênio amoniacal bem como nitrogênio total Kjeldahl tendo vazão $< 100 \text{ m}^3 \text{ dia}^{-1}$ fica limitada a 20 mg L^{-1} , ou atendimento de eficiência mínima de redução de 75%. Como pode ser observado na Figura 41 foi possível obter uma redução de 99% de nitrogênio amoniacal e nitrogênio total Kjeldahl chegando a carga de $< 0,5 \text{ mg}$ de N.am L^{-1} e $1,3 \text{ mg NTK L}^{-1}$ respectivamente sem aporte de CO_2 . Já com aporte de CO_2 ao meio houve uma redução na eficiência obtendo 70% para nitrogênio amoniacal e 63 % para nitrogênio total Kjeldahl redução. Esta eficiência foi semelhante a obtida por Xin, Ying e Jia (2010) o qual obteve remoção 98 % de fósforo e nitrogênio em um período de 10 dias.

Segundo a resolução 128/CONSEMA, a emissão de fósforo é limitado em 4 mg P L^{-1} , ou atendimento de eficiência mínima de 75% de remoção para mesma faixa de vazão. Foi possível obter uma remoção de 65% atingindo $0,43 \text{ mg P L}^{-1}$. Com o aporte de CO_2 ao meio não houve alteração na concentração de fósforo no meio.

Conforme descrito por Fierro, Saavedra e Copalcúa (2008) a imobilização das células da microalga *Scenedesmus subspicatus* mostrou-se viável na biorremediação, principalmente em se tratando na remoção de fósforo a qual foi de 94%, e de nitratos 70%. Já o cultivo por células livres desta microalga também demonstra a possibilidade de redução dos níveis de fósforo e nitrogênio, porém, em menores proporções, 20% de nitrato e 30% de fósforo.

Segundo Garbisu et al. (1994) a imobilização de cianobactérias em polivinil com o intuito de remover nitratos, nitritos e fosfatos de águas poluídas são plausíveis para este afim. O cultivo em biorreatores de fluxo contínuo e com agitação mostraram que houve uma eficiência de remoção de nitrogênio de 90% em um período de 14h. Já para o fósforo, a eficiência observada foi de 12 a 24% para um fluxo de 25 e 15 mL h⁻¹ respectivamente.

Os parâmetros de DBO₅ e DQO, segundo a resolução 128/CONSEMA é estipulada como carga máxima de 150 mg L⁻¹ e 360 mg L⁻¹, respectivamente. Para o experimento sem aporte de CO₂ foi observado um aumento de 144% de DBO₅ e 67% de DQO, atingindo 56,90 mg L⁻¹ e 140 mg L⁻¹. Entretanto se manteve abaixo dos valores estipulados pela resolução. Para o experimento com aporte de CO₂ a DBO₅ reduziu 62 % enquanto a DQO aumentou 29 %. A elevação destes parâmetros pode estar associada ao resquício de biomassa microalgais não recuperada.

A resolução 128/CONSEMA não limita a alcalinidade, entretanto é possível verificar que houve também uma redução obtendo uma eficiência de 37,5 % atingindo 570 mg L⁻¹ de CaCO₃. Com aporte de CO₂ do sistema houve um aumento da alcalinidade de 20%.

Segundo Schulz et al. (2006) o dióxido de carbono em solução aquosa pode ser fixado na forma de bicarbonato através da reação de hidroxilação quando o pH do meio é aumentado.

A variação da eficiência de remoção de nutrientes do sistema pode estar associada à carga inicial de nutriente encontrado no efluente. Segundo Richmond (2004) se a proporção de nutrientes não for respeitada, embora as algas possuam uma grande capacidade de aclimatação, suas funções metabólicas podem ser afetadas.

Cabe salientar que deve ser avaliado o cessar do crescimento no sistema ainda em fase exponencial, visando um aumento da eficiência de biorremediação, onde o número de morte celular é inferior, portanto mantendo maior quantidade de nutrientes fixadas na célula.

Christenson e Sims (2011) destacam como vantajosa a utilização de sistemas de tratamento a base de algas, uma vez que a estrutura pode agregar valor. Já em sistemas convencionais são concedidos somente para o tratamento das águas residuais.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos foi possível constatar que:

- A quantificação da densidade celular e peso seco por espectroscopia na região do visível tornou o método robusto, obtendo uma resposta rápida para o acompanhamento do crescimento das microalgas com um coeficiente de correlação bem elevado.
- O método de eletroflotação seguido de filtração para a recuperação de biomassa de microalgas apresentou grande potencial, uma vez que foi possível remover de uma grande quantidade de biomassa do meio.
- O aperfeiçoamento do fotobiorreator tubular do tipo coluna de bolhas de bancada para produção de *Desmodesmus subspicatus* utilizando efluente líquido como meio de cultura foi satisfatório, sendo possível evidenciar o aumento na produção de microalgas bem como a quantidade de biomassa seca com as alterações propostas ao sistema.
- A potencialidade do emprego de microalgas para a produção de biodiesel empregando a técnica de transesterificação enzimática *in situ* foi evidenciada, sendo possível verificar a conversão de todo material lipídico extraído da célula. Desta forma, surgindo como alternativa para a diminuição de custos do processo produtivo, uma vez que se reduzam etapas.
- Os fungos filamentosos estudados mostraram-se eficientes na hidrólise da biomassa microalgais, verificando a contaminação da maior parte das amostras, entretanto ficou evidente a formação de bioetanol através do método de *headspace* para o material fermentado por *Saccharomyces cerevisiae*.
- O desenvolvimento de um sistema misto para o cultivo de microalgas que engloba os sistemas de tanque, fotobiorreator tubular do tipo coluna de bolhas e *turf scrubber* é bastante promissor e mostra-se uma inovação, uma vez que se possibilita o destaque da evolução dos sistemas.

- Ficou evidente a capacidade biorremediação de efluentes com a utilização do sistema misto para o cultivo de microalgas verificando uma redução bastante expressiva para nitrogênio amoniacal e nitrogênio total Kjeldahl do efluente urbano utilizado como meio de cultivo das microalgas.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Aprimorar o sistema de agitação entre os tubos e dentro do reservatório para diminuir a possibilidade de deposição e morte celular.
- Usar sensores eletroquímicos para acompanhamento *on line* e de forma precisa as taxas de assimilação de dióxido de carbono, pH e temperatura.
- Avaliar a possibilidade do uso (*LED's*) à noite para o cultivo, obtendo um período de iluminação de 24 horas.
- Testar o cultivo em efluentes de outra natureza.
- Realizar os testes com o biodiesel obtido quanto aos parâmetros de qualidade estipulados pela Agência Nacional de Petróleo (ANP).
- Realizar uma Análise de Ciclo de Vida do processo produtivo para estudo da sustentabilidade econômica e ambiental do sistema.
- Avaliar melhor condição visando um aumento no efeito de biorremediação do efluente.

8 REFERÊNCIAS

AHMAD, A. L. et al. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 15, n. 1, p. 584-593, doi:10.1016/j.rser.2010.09.018, 2011.

Al, W. et al. Development of a ground-based space micro-algae photo-bioreactor. *Advances in Space Research*, v. 41, n. 5, p. 742–747, doi:10.1016/j.asr.2007.06.060, 2008.

ALMEIDA, E.; REGINA, M. e APARECIDA, M. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. *Quim. Nova*, v. 27, n. 5, p. 818-824, 2004.

AN, J. Y. e KIM, B. W. Biological desulfurization in an optical-fiber photobioreactor using an automatic sunlight collection system. *Journal of Biotechnology*, v. 80, n. 1, p. 35-44, 2000.

ANDERSEN, R. A. *Algal Culturing Techniques*. Elsevier academic press.2005. p. 565

ARESTA, M.; DIBENEDETTO, A. e BARBERIO, G. Utilization of macro-algae for enhanced CO₂ fixation and biofuels production: Development of a computing software for an LCA study. *Fuel Processing Technology*, v. 86, n. 14-15, p. 1679-1693, doi:10.1016/j.fuproc.2005.01.016, 2005.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, v. 52, n. 2, p. 858-875, doi:10.1016/j.enconman.2010.08.013, 2011.

BICUDO, C., E., M. e MENEZES, M. *Gênero de algas de águas continentais do Brasil, chave para identificação e descrição*. 2. ed. São Carlos-SP: RIMA, 2006. p. 502

BONDY, S. C. The neurotoxicity of environmental aluminum is still an issue. *Neurotoxicology*, v. 31, n. 5, p. 575-81, doi:10.1016/j.neuro.2010.05.009, 2010.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, v. 70, n. 1-3, p. 313-321, doi:10.1016/S0168-1656(99)00083-8, 1999.

BRENNAN, L. e OWENDE, P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, n. 2, p. 557-577, doi:10.1016/j.rser.2009.10.009, 2010.

CARON, D. A et al. Harmful algae and their potential impacts on desalination operations off southern California. *Water research*, v. 44, n. 2, p. 385-416, doi:10.1016/j.watres.2009.06.051, 2010.

CHANG, I.-S. e KIM, S.-N. Wastewater treatment using membrane filtration—effect of biosolids concentration on cake resistance. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 3-4, p. 1307-1314, doi:10.1016/j.procbio.2004.06.019, 2005.

CHEN, C.-Y. et al. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. *Bioresource technology*, v. 102, n. 1, p. 71-81, doi:10.1016/j.biortech.2010.06.159, 2011.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, v. 25, n. 3, p. 294-306, doi:10.1016/j.biotechadv.2007.02.001, 2007.

CHIU, S.-Y. et al. Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella sp.* in a semicontinuous photobioreactor. *Bioresource technology*, v. 99, n. 9, p. 3389-96, doi:10.1016/j.biortech.2007.08.013, 2008.

CHIU, S.-Y. et al. The air-lift photobioreactors with flow patterning for high-density cultures of microalgae and carbon dioxide removal. *Engineering in Life Sciences*, v. 9, n. 3, p. 254-260, doi:10.1002/elsc.200800113, 2009.

CHRISTENSON, L. e SIMS, R. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology advances*, doi:10.1016/j.biotechadv.2011.05.015, 2011.

CONVERTI, A. et al. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, v. 48, n. 6, p. 1146-1151, doi:10.1016/j.cep.2009.03.006, 2009.

DALY, R. I.; HO, L. e BROOKES, J. D. Effect of chlorination on *Microcystis aeruginosa* cell integrity and subsequent microcystin release and degradation. *Environmental science & technology*, v. 41, n. 12, p. 4447-53, 2007.

DE-BASHAN, L. E. e BASHAN, Y. Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. *Bioresource technology*, v. 101, n. 6, p. 1611-27, doi:10.1016/j.biortech.2009.09.043, 2010.

DEMIRBAS, A. e FATIH DEMIRBAS, M. Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy Conversion and Management*, v. 52, n. 1, p. 163-170, doi:10.1016/j.enconman.2010.06.055, 2011.

DEMIRBAS, A. Use of algae as biofuel sources. *Energy Conversion and Management*, v. 51, n. 12, p. 2738-2749, doi:10.1016/j.enconman.2010.06.010, 2010.

DEMIRBAS, M. F. Biofuels from algae for sustainable development. *Applied Energy*, v. 88, n. 10, p. 3473-3480, doi:10.1016/j.apenergy.2011.01.059, 2011.

DERNER, R. B. et al. Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, doi:10.1590/S0103-84782006000600050, 2006.

FARHADIAN, M. et al. In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: a review. *Bioresource technology*, v. 99, n. 13, p. 5296-308, doi:10.1016/j.biortech.2007.10.025, 2008.

FERRÃO, M. F. et al. EM FARINHA DE TRIGO EMPREGANDO NIR-PLS E DRIFT-PLS 1. v. 24, n. 3, p. 333-340, 2004.

FIERRO, S.; SÁNCHEZ-SAAVEDRA, M. del P. e COPALCÚA, C. Nitrate and phosphate removal by chitosan immobilized *Scenedesmus*. *Bioresource technology*, v. 99, n. 5, p. 1274-9, doi:10.1016/j.biortech.2007.02.043, 2008.

FUCHS, W.; THEISS, M. e BRAUN, R. Influence of standard wastewater parameters and pre-flocculation on the fouling capacity during dead end membrane filtration of wastewater treatment effluents. *Separation and Purification Technology*, v. 52, n. 1, p. 46-52, doi:10.1016/j.seppur.2006.03.013, 2006.

FUKUDA, H.; KONDO, A. e NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 92, n. 5, p. 405-416, doi:10.1007/s12010-007-9043-5, 2001.

GAO, S.; DU, M.; et al. Effects of chloride ions on electro-coagulation-flotation process with aluminum electrodes for algae removal. *Journal of hazardous materials*, v. 182, n. 1-3, p. 827-34, doi:10.1016/j.jhazmat.2010.06.114, 2010.

GAO, S.; YANG, Jixian;; et al. Electro-coagulation-flotation process for algae removal. *Journal of hazardous materials*, v. 177, n. 1-3, p. 336-43, doi:10.1016/j.jhazmat.2009.12.037, 2010.

GARBISU, C. et al. Inorganic nitrogen and phosphate removal from water by free-living and polyvinyl-immobilized *Phormidium laminosum* in batch and continuous-flow bioreactors. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 16, n. 5, p. 395-401, doi:10.1016/0141-0229(94)90154-6, 1994.

GIORDANO, M. et al. Fourier transform infrared spectroscopy as a novel tool to investigate changes in intracellular macromolecular pools in the marine microalga *Chaetoceros muellerii* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, v. 37, n. 2, p. 271-279, doi:10.1046/j.1529-8817.2001.037002271.x, 2001.

GOH, C. S. e LEE, K. T. A visionary and conceptual macroalgae-based third-generation bioethanol (TGB) biorefinery in Sabah, Malaysia as an underlay for renewable and sustainable development. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, n. 2, p. 842-848, doi:10.1016/j.rser.2009.10.001, 2010.

GRESSLER, P. D. *Avaliação da eficiência de Desmodesmus Subspicatus (R.Chodat) E.Hegewald & A.Schmidt (chlorophyceae) cultivada em Fotobiorreator tubular com efluente da ETE-unisc, visando biorremediação e obtenção de energia.* Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul-Rio grande do Sul - [S.I.]. 2011.

GUSCHINA, I. A e HARWOOD, J. L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in lipid research*, v. 45, n. 2, p. 160-86, doi:10.1016/j.plipres.2006.01.001, 2006.

HARUN, R. e DANQUAH, M. K. Influence of acid pre-treatment on microalgais biomass for bioethanol production. *Process Biochemistry*, v. 46, n. 1, p. 304-309, doi:10.1016/j.procbio.2010.08.027, 2011a.

HARUN, R. e DANQUAH, M. K. Enzymatic hydrolysis of microalgais biomass for bioethanol production. *Chemical Engineering Journal*, v. 168, n. 3, p. 1079-1084, doi:10.1016/j.cej.2011.01.088, 2011b.

HARUN, R. et al. Microalgais biomass as a cellulosic fermentation feedstock for, bioethanol production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, p. 1-9, doi:10.1016/j.rser.2010.07.071, 2010.

HENDERSON, R. et al. The impact of algal properties and pre-oxidation on solid – liquid separation of algae. *Water research*, v. 42, n. 8-9, p. 1827 - 1845, doi:10.1016/j.watres.2007.11.039, 2008.

HUANG, J. et al. A comparison of the role of two blue – green algae in THM and HAA formation. *Water Research*, v. 43, n. 12, p. 3009-3018, doi:10.1016/j.watres.2009.04.029, 2009.

JACOB, LOPES, E. et al. Effect of light cycles (night/day) on CO₂ fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, v. 48, n. 1, p. 306-310, doi:10.1016/j.cep.2008.04.007, 2009.

JIANG, L. et al. Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO₂. *Applied Energy*, v. 88, n. 10, p. 3336-3341, doi:10.1016/j.apenergy.2011.03.043, 2011.

JOHN, R. P. et al. Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. *Bioresource technology*, v. 102, n. 1, p. 186-93, doi:10.1016/j.biortech.2010.06.139, 2011.

KHAMBHATY, Y. et al. *Kappaphycus alvarezii* as a source of bioethanol. *Bioresource technology*, v. 103, n. 1, p. 180-5, doi:10.1016/j.biortech.2011.10.015, 2012.

KHAN, S. A. e OTHERS. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 13, n. 9, p. 2361–2372, doi:10.1016/j.rser.2009.04.005, 2009.

KRICHNAVARUK, S. et al. Optimal growth conditions and the cultivation of *Chaetoceros calcitrans* in airlift photobioreactor. *Chemical Engineering Journal*, v. 105, n. 3, p. 91-98, doi:10.1016/j.cej.2004.10.002, 2005.

MASROOR, M.; MEHRVAR, M. e EIN-MOZAFFARI, F. An Overview of the Integration of Advanced Oxidation Technologies And Other Processes For Water And Wastewater Treatment. *International Journal of Engineering*, v. 3, n. 2, p. 120-146, 2009.

MATA, T. M.; MARTINS, A. a. e CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, n. 1, p. 217-232, doi:10.1016/j.rser.2009.07.020, 2010.

MIRANDA, J. R.; PASSARINHO, P. C. e GOUVEIA, L. Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production. *Bioresource technology*, v. 104, n. October, p. 342-8, doi:10.1016/j.biortech.2011.10.059, 2012.

MULBRY, W.; KANGAS, P. e KONDRAD, S. Toward scrubbing the bay: Nutrient removal using small algal turf scrubbers on Chesapeake Bay tributaries. *Ecological Engineering*, v. 36, n. 4, p. 536-541, doi:10.1016/j.ecoleng.2009.11.026, 2010.

MULBRY, Walter et al. Bioresource Technology Treatment of dairy manure effluent using freshwater algae : Algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers. *Water*, v. 99, p. 8137-8142, doi:10.1016/j.biortech.2008.03.073, 2008.

MUÑOZ, R.; KÖLLNER, C. e GUIEYSSE, B. Biofilm photobioreactors for the treatment of industrial wastewaters. *Journal of hazardous materials*, v. 161, n. 1, p. 29-34, doi:10.1016/j.jhazmat.2008.03.018, 2009.

NETO, J. e MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. *Química Nova*, v. 21, n. 4, p. 467–469, 1998.

NOIE, J. D.; LALIBERT, G. e PROULX, D. Algae and waste water. *Symposium A Quarterly Journal In Modern Foreign Literatures*, p. 247-254, 1992.

PARK, J. B. K.; CRAGGS, R. J. e SHILTON, A. N. Bioresource Technology Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 1, p. 35-42, doi:10.1016/j.biortech.2010.06.158, 2011.

PITTMAN, J. K.; DEAN, A. P. e OSUNDEKO, O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource technology*, v. 102, n. 1, p. 17-25, doi:10.1016/j.biortech.2010.06.035, 2010.

PIZARRO, C et al. An economic assessment of algal turf scrubber technology for treatment of dairy manure effluent. *Ecological Engineering*, v. 26, n. 4, p. 321-327, doi:10.1016/j.ecoleng.2005.12.009, 2006.

POELMAN, E.; PAUW, N. D. e JEURISSEN, B. Potential of electrolytic flocculation for recovery of micro-algae. *Conservation And Recycling*, v. 19, p. 1-10, 1996.

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

RIBES, D. et al. Effects of oral aluminum exposure on behavior and neurogenesis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Experimental neurology*, v. 214, n. 2, p. 293-300, doi:10.1016/j.expneurol.2008.08.017, 2008.

RICHMOND, A. *Handbook of microalgais culture: biotechnology and applied phycology*. 1. ed. Oxford: Blackwell Science, 2004. p. 584

ROCHA, J.; GARCIA, J. e HENRIQUES, M. Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Biomolecular Engineering*, v. 20, n. 4-6, p. 237-242, doi:10.1016/S1389-0344(03)00061-3, 2003.

RUIZ-MARIN, A.; MENDOZA-ESPINOSA, L. G. e STEPHENSON, T. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource technology*, v. 101, n. 1, p. 58-64, doi:10.1016/j.biortech.2009.02.076, 2010.

SCHULZ, K. G. et al. Determination of the rate constants for the carbon dioxide to bicarbonate inter-conversion in pH-buffered seawater systems. *Marine Chemistry*, v. 100, n. 1-2, p. 53-65, doi:10.1016/j.marchem.2005.11.001, 2006.

STEHFEST, K.; TOEPEL, J. e WILHELM, C. The application of micro-FTIR spectroscopy to analyze nutrient stress-related changes in biomass composition of phytoplankton algae. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 43, n. 7, p. 717–726, doi:10.1016/j.plaphy.2005.07.001, 2005.

SUNDARARAJAN, A e JU, L. K. Evaluation of oxygen permeability of gas vesicles from cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*. *Journal of biotechnology*, v. 77, n. 2-3, p. 151-6, 2000.

UDUMAN, N. et al. Dewatering of microalgais cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, v. 2, n. 1, p. 012701, doi:10.1063/1.3294480, 2010.

UGWU, C.; AOYAGI, H. e UCHIYAMA, H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource technology*, v. 99, n. 10, p. 4021–4028, doi:10.1016/j.biortech.2007.01.046, 2008.

VELASQUEZ-ORTA, S. B.; LEE, J. G. M. e HARVEY, a. Alkaline in situ transesterification of *Chlorella vulgaris*. *Fuel*, doi:10.1016/j.fuel.2011.11.045, 2011.

VYAS, A. P.; VERMA, J. L. e SUBRAHMANYAM, N. Review article A review on FAME production processes. *Fuel*, v. 89, n. 1, p. 1-9, doi:10.1016/j.fuel.2009.08.014, 2010.

WALKER, T.; PURTON, S. e BECKER, D. Microalgae as bioreactors. *Plant cell reports*, v. 24, n. 11, p. 629-41, doi:10.1007/s00299-005-0004-6, 2005.

XIN, L.; HONG-YING, H. e JIA, Y. Lipid accumulation and nutrient removal properties of a newly isolated freshwater microalga, *Scenedesmus sp.* LX1, growing in secondary effluent. *New biotechnology*, v. 27, n. 1, p. 59-63, doi:10.1016/j.nbt.2009.11.006, 2010.

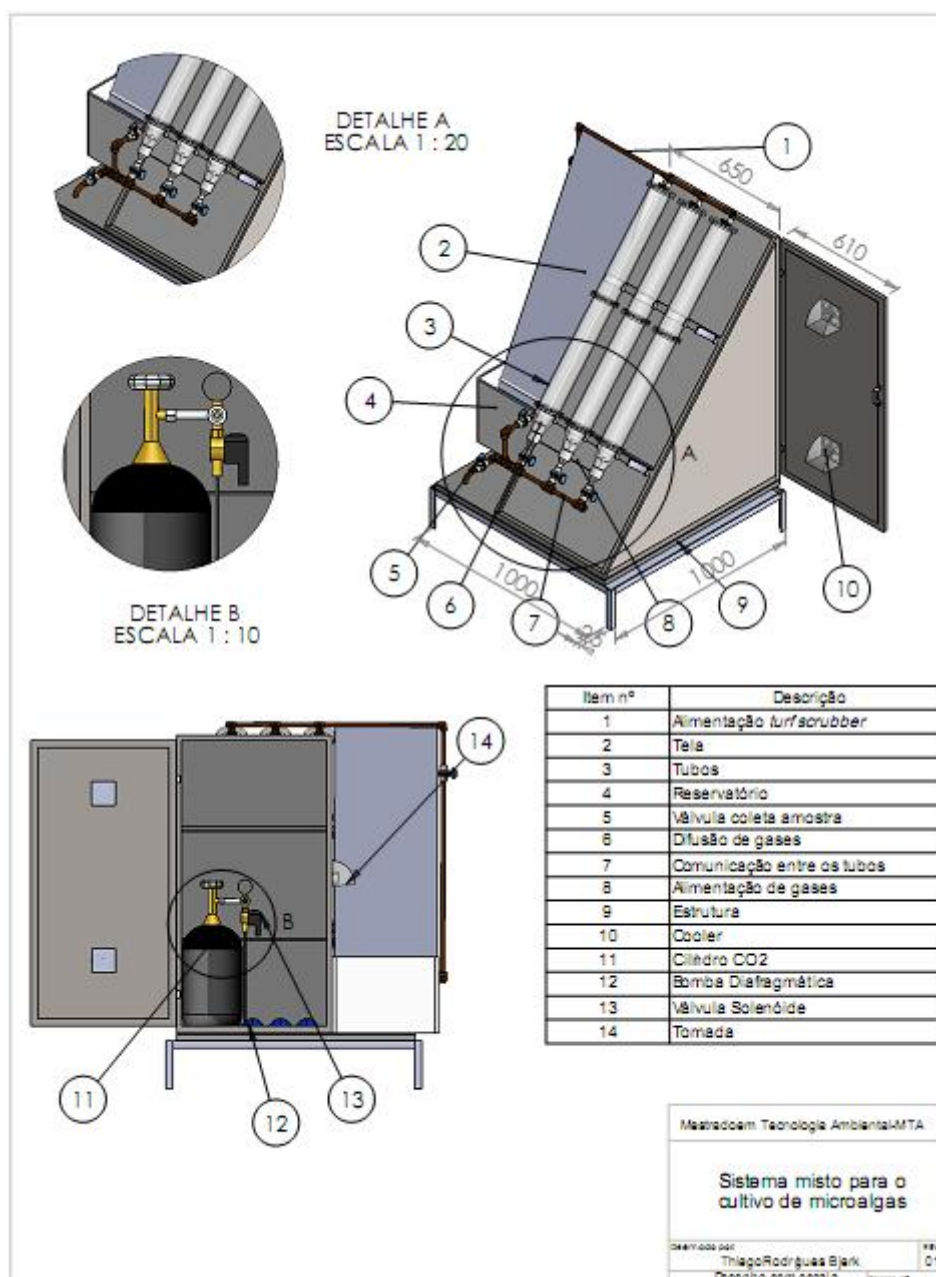
YANG, S.; DING, W. e CHEN, H. Enzymatic hydrolysis of corn stalk in a hollow fiber ultrafiltration membrane reactor. *Biomass and Bioenergy*, v. 33, n. 2, p. 332-336, doi:10.1016/j.biombioe.2008.05.016, 2009.

YOON, M. et al. Improvement of saccharification process for bioethanol production from *Undaria sp.* by gamma irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, p. 1-4, doi:10.1016/j.radphyschem.2011.11.035, 2011.

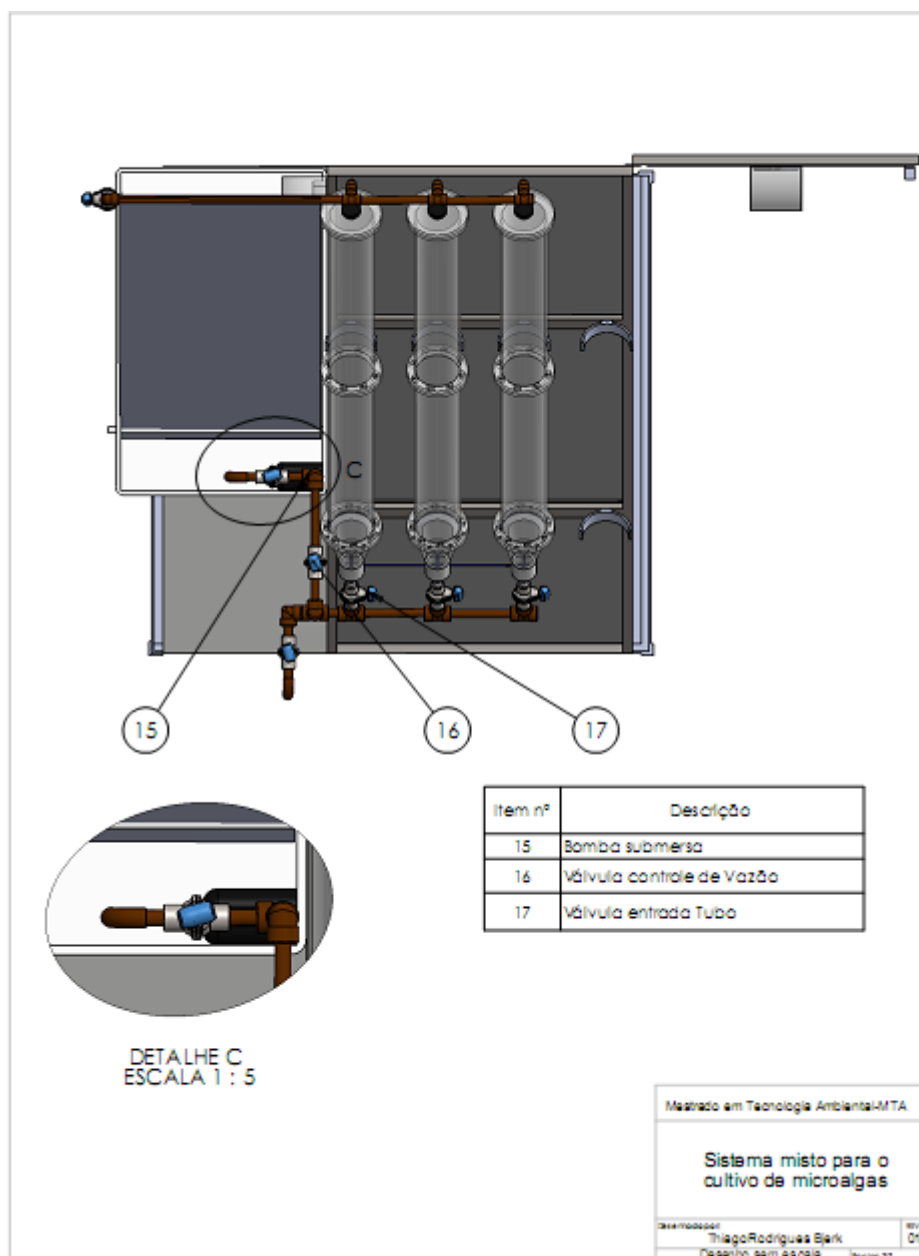
ZHANG, C. et al. Performance of a groove-type photobioreactor for hydrogen production by immobilized photosynthetic bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, n. 11, p. 5284-5292, doi:10.1016/j.ijhydene.2010.03.085, 2010.

9 ANEXOS

Anexo A - Vista isométrica e posterior da planta do sistema misto para o cultivo de microalgas



Anexo B - Vista superior da planta do sistema misto para o cultivo de microalgas



Anexo C - Laudo Análise efluente saída do decantador



RELATÓRIO DE ANÁLISE
REGISTRO 5507/2011-0
Página 1 de 1

CLIENTE

Emprego de Microalgas para Fixação de Dióxido de Carbono, Fitorremediação e Produção de Bioenergia em uma Estação de Tratamento de Efluente Urbano
Avenida Independência, 2293 – Santa Cruz do Sul – Rio Grande do Sul
Telefone: 51. 3717-7513 / Fax: -
Contato: -



AMOSTRA

Tipo: Efluente
Identificação: -
Local: Av. Independência, 2293 - Santa Cruz do Sul
Ponto de coleta: Entrada do decantador
Responsável pela coleta: O cliente
Informações adicionais: Fotobiorreator - Turf Scrubber
Data e/ou hora da coleta: 20/12/2011 15h 00min
Data de entrada no laboratório: 20/12/2011

ANÁLISE(S)

	RESULTADO(S)	LIMITE(S)
Alcalinidade bicarbonatos	912,0 mg L ⁻¹ (CaCO ₃)	-
Alcalinidade carbonatos	0,0 mg L ⁻¹ (CaCO ₃)	-
Alcalinidade hidróxidos	0,0 mg L ⁻¹ (CaCO ₃)	-
Alcalinidade total	912,0 mg L ⁻¹	-
DBO ₅	23,3 mg L ⁻¹ (O ₂)	-
DQO	84 mg L ⁻¹	-
Fósforo total	1,24 mg L ⁻¹	-
Nitrogênio amoniacal	67,7 mg L ⁻¹	-
Nitrogênio total Kjeldahl	140 mg L ⁻¹	-


LEGENDAS:

NR - não realizado
VMP - valor máximo permitido
mg L⁻¹ - miligramas por litro

nvP - número mais próximo
UFC - unidades formadoras de colônias

Os resultados apresentados no presente laudo de análise têm significação restrita e se aplicam somente à amostra ensaiada. As informações referentes à amostragem são de responsabilidade do cliente, exceto quando a coleta é realizada pela Central Analítica.
A reprodução do documento somente poderá ser realizada integralmente, sem nenhuma alteração.

Santa Cruz do Sul (RS), 06 de janeiro de 2012.


Plínio Luiz Kroth
Responsável Técnico - CRQ-V 05201055

Anexo D - Laudo análise efluente após tratamento com microalgas



RELATÓRIO DE ANÁLISE
REGISTRO 71/2012-0
Página 1 de 1

CLIENTE

Emprego de Microalgas para fixação de Dióxido de Carbono, Fitorremediação e Produção de Bioenergia em uma Estação de Tratamento de Efluente Urbano
Avenida Independência, 2293 - Santa Cruz do Sul - Rio Grande do Sul
Telefone: 51 3717-7515 / Fax: -
Contato: -



AMOSTRA

Tipo: Efluente tratado
Identificação: -
Local: Av. Independência, 2293 - Santa Cruz do Sul
Ponto de coleta: ETE - Após Tratamento Microalgas
Responsável pela coleta: O cliente
Informações adicionais: -
Data e/ou hora da coleta: 09/01/2012 15h 00min
Data de entrada no laboratório: 10/01/2012

ANÁLISE(S)

	RESULTADO(S)	LIMITE(S)
Alcalinidade bicarbonatos	570,0 mg L ⁻¹ (CaCO ₃)	-
Alcalinidade carbonatos	0,0 mg L ⁻¹ (CaCO ₃)	-
Alcalinidade hidróxidos	0,0 mg L ⁻¹ (CaCO ₃)	-
Alcalinidade total	570,0 mg L ⁻¹ (CaCO ₃)	-
DBO ₅	56,9 mg L ⁻¹ (O ₂)	Conforme vazão
DQO	140 mg L ⁻¹	Conforme vazão
Fósforo total	0,43 mg L ⁻¹	Conforme vazão
Nitrogênio amoniacal	< 0,5 mg L ⁻¹	Conforme vazão
Nitrogênio total Kjeldahl	1,3 mg L ⁻¹	Conforme vazão

LEGENDAS:

NE - não realizado
NMP - não realizado
mg L⁻¹ - miligramas por litro
NMP - número mais provável
UFC - unidades formadoras de colônias

REFERÊNCIAS

Resolução Nº 126/2006 do Conselho Estadual do Meio Ambiente do RS - CONSEMA, de 24 de novembro de 2006. Consultar esta Resolução sobre os limites estabelecidos para os parâmetros que dependem da vazão do efluente.

Os resultados apresentados no presente laudo de análise têm significação restrita e se aplicam somente à amostra ensaiada. As informações referentes à amostragem são de responsabilidade do cliente, exceto quando a coleta é realizada pela Central Analítica.
A reprodução do documento somente poderá ser realizada integralmente, sem nenhuma alteração.

Santa Cruz do Sul (RS), 26 de janeiro de 2012.


Alcido Kirst
Responsável Técnico - CRQ-V 05100435

Anexo E - Laudo análise efluente início tratamento com microalgas com aporte de CO₂ ao meio



RELATÓRIO DE ANÁLISE

REGISTRO 74/2012-0

Página 1 de 1

CLIENTE

Emprego de Microalgas para Fixação de Dióxido de Carbono, Fitorremediação e Produção de Bioenergia em uma Estação de Tratamento de Efluente Urbano

Avenida Independência, 2293 - Santa Cruz do Sul - Rio Grande do Sul

Telefone: 51 3717-7515 / Fax: -

Contato: -



AMOSTRA

Tipo: Efluente tratado
 Identificação: -
 Local: Av. Independência, 2293 - Santa Cruz do Sul
 Ponto de coleta: ETE - Após Tratamento Microalgas
 Responsável pela coleta: O cliente
 Informações adicionais: -
 Data e/ou hora da coleta: 10/01/2012 10h 30min
 Data de entrada no laboratório: 10/01/2012

ANÁLISE(S)

	RESULTADO(S)		LIMITE(S)
Alcalinidade bicarbonatos	570,0	mg L ⁻¹ (CaCO ₃)	-
Alcalinidade carbonatos	0,0	mg L ⁻¹ (CaCO ₃)	-
Alcalinidade hidróxidos	0,0	mg L ⁻¹ (CaCO ₃)	-
Alcalinidade total	570,0	mg L ⁻¹ (CaCO ₃)	-
DBO ₅	59,1	mg L ⁻¹ (O ₂)	Conforme vazão
DQO	68	mg L ⁻¹	Conforme vazão
Fósforo total	0,04	mg L ⁻¹	Conforme vazão
Nitrogênio amoniacal	6,4	mg L ⁻¹	Conforme vazão
Nitrogênio total Kjeldahl	7,0	mg L ⁻¹	Conforme vazão

LEGENDAS:

NR - não realizado
 VMP - valor máximo permitido
 mg L⁻¹ - miligramas por litro
 NMP - número mais provável
 UFC - unidades formadoras de colônia

REFERÊNCIAS

Resolução N° 128/2006 do Conselho Estadual do Meio Ambiente do RS - CONSEMA, de 24 de novembro de 2006. Consulta esta Resolução sobre os limites estabelecidos para os parâmetros que dependem da vazão do efluente.

"Os resultados apresentados no presente laudo de análise têm significação restrita e se aplicam somente à amostra ensaiada. As informações referentes à amostragem são de responsabilidade do cliente, exceto quando a coleta é realizada pelo Central Analítica." A reprodução do documento somente poderá ser realizada integralmente, sem nenhuma alteração.

Santa Cruz do Sul (RS), 27 de janeiro de 2012.


Alcido Kirst
 Responsável Técnico - CRQ-V 05100435

Anexo F - Laudo análise efluente após tratamento com microalgas com aporte de CO₂ ao meio



RELATÓRIO DE ANÁLISE
REGISTRO 350/2012-0
Página 1 de 1

CLIENTE

Emprego de Microalgas para Fixação de Dióxido de Carbono, Fitorremediação e Produção de Bioenergia em uma Estação de Tratamento de Efluente Urbano
Avenida Independência, 2293 - Santa Cruz do Sul - Rio Grande do Sul
Telefone: 51 3717-7515 / Fax: -
Contato: -



AMOSTRA

Tipos: Efluente tratado
Identificação: -
Local: Av. Independência, 2293 - Santa Cruz do Sul
Ponto de coleta: ETE - Após Tratamento Microalgas
Responsável pela coleta: O cliente
Informações adicionais: -
Data e/ou hora da coleta: 24/01/2012 15h 00min
Data de entrada no laboratório: 25/01/2012

ANÁLISE(S)

	RESULTADO(S)	LIMITES
Alcalinidade bicarbonatos	684,0 mg L ⁻¹ (CaCO ₃)	-
Alcalinidade carbonatos	0,0 mg L ⁻¹ (CaCO ₃)	-
Alcalinidade hidróxidos	0,0 mg L ⁻¹ (CaCO ₃)	-
Alcalinidade total	684,0 mg L ⁻¹ (CaCO ₃)	- (1)
DBO ₅	22,7 mg L ⁻¹ (O ₂)	Conforme variação (1)
DQO	88 mg L ⁻¹	Conforme variação (1)
Fósforo total	0,04 mg L ⁻¹	Conforme variação (1)
Nitrogênio amoniacal	1,9 mg L ⁻¹	Conforme variação (1)
Nitrogênio total Kjeldahl	2,6 mg L ⁻¹	Conforme variação (1)

LEGENDAS:

NR - não realizado
VMP - valor máximo permitido
mg L⁻¹ - miligramas por litro
NMP - número mais provável
LFC - unidades formadoras de colônias

OBSERVAÇÕES

Os parâmetros eventualmente não apontados como cadastrados junto à FEPAM, referem-se a ensaios cujo cadastro está temporariamente indisponível, e dependentes ou ainda referem-se a subparâmetros analíticos, os quais, nos dois últimos exemplos, em função da especificidade da legislação e da natureza da matriz analisada, não necessitam de cadastro junto ao referido órgão.

REFERÊNCIAS

Resolução N° 128/2006 do Conselho Estadual do Meio Ambiente do RS - CONSEMA, de 24 de novembro de 2006. Consultar esta Resolução sobre os limites estabelecidos para os parâmetros que dependem da variação do efluente.
(1) Patrimônio cadastrado junto à FEPAM Fundação Estadual de Proteção Ambiental - RS, sob certificado número 00005/2012-01.

*Os resultados apresentados no presente laudo de análise têm significação restrita e se aplicam somente à amostra ensaiada. As informações referentes à amostragem são de responsabilidade do cliente, exceto quando a coleta é realizada pela Central Analítica.
A reprodução do documento somente poderá ser realizada integralmente, sem nenhuma alteração.

Santa Cruz do Sul (RS), 07 de fevereiro de 2012.

Alcido Kirst
Responsável Técnico - CRQ-V 05100435

Cadastro na FEPAM como Laboratório de Análises Ambientais sob o certificado N° 00005/2012-01
Avenida Independência, 2293 - Bloco 11 - Santa Cruz do Sul - RS - CEP 96.815-900
Fone (0xx51) 3717-7500 - Fax (0xx51) 3717-7530 - www.unisc.br/centralanalitica - central@unisc.br