

RAFAEL DE ARAÚJO LIRA

**ESTUDO DO RENDIMENTO DE BIOMASSA DA MICROALGA
NATIVA *Chlorella* sp. VISANDO A OBTENÇÃO DE
BIOCOMBUSTÍVEIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

RAFAEL DE ARAÚJO LIRA

**ESTUDO DO RENDIMENTO DE BIOMASSA DA MICROALGA NATIVA
Chlorella sp. VISANDO A OBTENÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 08 de Agosto de 2011

Prof. Antonio Teixeira de Matos
(Co-orientador)

Profª. Jane S. dos R. Coimbra
(Co-orientador)

Profª. Maria Lúcia Calijuri

Prof. Rogélio Lopes Brandão

Prof. Márcio Arêdes Martins
(Orientador)

*Aos meus pais,
meus irmãos e
minhas sobrinhas,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, bênção e proteção;

A meus pais Raimundo e Maria das Dores e meus irmãos, Leidy, Leandro e Thiago, agradeço a tudo, principalmente a paciência, carinho e atenção durante todos esses anos de estudos e ausência;

Ao meu orientador Marcio Arêdes Martins, pela orientação, confiança, incentivo e apoio durante todo o doutorado;

À Universidade Federal de Viçosa, pelo Programa de Pós-Graduação e ao Departamento de Engenharia Agrícola pela confiança no meu trabalho;

Ao CNPq, pela bolsa concedida;

Aos professores e co-orientadores deste trabalho, Rosane M. de A. Euclides, Jane Sélia dos Reis Coimbra e Antonio Teixeira de Matos, pela orientação, amizade e incentivo oferecidos;

Ao professor Maria do Carmo Calijuri, pelos conselhos e sugestões;

Ao professor e amigo Abraham D. G. Zuniga, pelos conselhos, prestatividade, incentivo e por me fazer entender o que representa a pesquisa científica;

À Mariana Machado e Lucas Corrêdo pela amizade e imensa contribuição à realização deste trabalho;

Aos amigos Rita, Daniela, Rosana, Fabíola, Angélica, Carol, Toninho, Magno, Janaina, Léo, Maycon, Keko, Mayra, Iva e Jaqueline;

A Amanda por trazer alegria e descontração e apoio em suas vindas a Viçosa;

Aos amigos de república, Marco Sartori, Saulo, Elvanio e Léo pela amizade e os bons momentos vividos em Viçosa - MG;

Ao amigo Johnson Clay pelos conselhos, incentivo, paciência e agradável convívio ao longo desses anos;

A Brenda e Humberto pela amizade, apoio, incentivo e ajuda;

As amigas Cláudia e Mônica pela alegria do convívio e cumplicidade;

A meu amigo Ivan pelo apoio em todos os momentos e;

A todos os amigos que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho e não foram aqui citados, meus sinceros agradecimentos.

Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS	4

ARTIGO I

ARTIGO I: CULTIVO E APLICAÇÕES DE MICROALGAS E DE SEUS PRINCIPAIS DERIVADOS	6
RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. SOBRE MICROALGAS.....	10
3. AMBIENTES DE CULTIVO DAS MICROALGAS.....	12
4. APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS MICROALGAS	13
4.1 ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS.....	14
4.2 CAROTENÓIDES	16
4.2.1 Betacaroteno	17
4.3 ASTAXANTINA	18
4.4 BIOCOMBUSTÍVEIS.....	18
4.5 OUTRAS APLICAÇÕES	19
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	20
6. REFERÊNCIAS	22

ARTIGO II

ARTIGO II: AS MICROALGAS COMO ALTERNATIVA À PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS.....	28
RESUMO	29
ABSTRACT	30
1. INTRODUÇÃO.....	31

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	32
2.1. Produção de microalgas.....	33
2.2. Cadeia de biocombustíveis baseada em microalgas.....	37
2.3. Cultivo de microalgas para biodiesel.....	37
2.4. Fotobiorreatores.....	42
2.5. Exemplo de utilização de fotobioreator em teste de campo	43
2.6. Extração de óleo das microalgas	44
2.7. Características do biodiesel de microalgas.....	46
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
4. REFERÊNCIAS	48

ARTIGO III

ARTIGO III: EFEITO DO MEIO DE CULTIVO NO RENDIMENTO E NA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA BIOMASSA DA MICROALGA NATIVA <i>Chlorella</i> sp., COM ÊNFASE NO TEOR DE LIPÍDEOS VISANDO BIOCOMBUSTÍVEIS.....	52
RESUMO	53
ABSTRACT	54
1. INTRODUÇÃO.....	55
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	56
2.1. Cultura e condições de cultivo.....	56
2.2. Determinações analíticas	57
2.2.1. Avaliação do crescimento.....	57
2.2.2. Obtenção da biomassa liofilizada.....	58
2.2.3. Biomassa seca.....	58
2.2.4. Proteínas Hidrossolúveis	58
2.2.5. Rompimento celular.....	58
2.2.6. Carboidratos Totais	59
2.2.7. Lipídios Totais.....	59
2.2.8. Delineamento Experimental	59
2.2.9. Análise Estatística	60
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
3.1. Avaliação do crescimento.....	62
3.2. Valores de pH	62

3.3. Biomassa Seca	64
3.4. Proteínas Hidrossolúveis	66
3.5. Carboidratos Totais	67
3.6. Lipídios Totais.....	69
4. CONCLUSÕES	72
5. AGRADECIMENTOS	73
6. REFERÊNCIAS	74

ARTIGO IV

ARTIGO IV: CARACTERIZAÇÃO DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO DURANTE O CULTIVO DA MICROALGA NATIVA <i>Chlorella</i> sp. VISANDO A PRODUÇÃO DE BIODIESEL	80
RESUMO	81
ABSTRACT	82
1. INTRODUÇÃO.....	82
2. REFERENCIAL TEÓRICO	85
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	87
3.1. Cultura e condições de cultivo.....	87
3.2. Medidas reológicas	87
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
5. CONCLUSÕES	93
6. AGRADECIMENTOS	94
7. REFERÊNCIAS	95

ARTIGO V

ARTIGO V: AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE SEPARAÇÃO DA BIOMASSA DE <i>Chlorella</i> sp. EM MEIO DE CULTIVO COM BAIXO TEOR DE NITROGÊNIO	98
RESUMO	99
ABSTRACT	100
1. INTRODUÇÃO.....	101
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	102
2.1. Cultura e condições de cultivo.....	102
2.2. Sedimentação.....	103
2.3. Ensaio com coagulante utilizando “Jar-test”	104

2.4. Centrifugação.....	105
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	106
3.1. Sedimentação.....	106
3.2. Flocculação.....	108
3.3. Centrifugação.....	111
4. CONCLUSÕES	114
5. AGRADECIMENTOS	114
6. REFERÊNCIAS	115

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO II

Figura 1 - Esquema simplificado do cultivo de microalga e a reciclagem e uso de subprodutos.....	36
Figura 2 - Cultivo de microalgas em tanques; produção de <i>Nannochloropsis oculata</i> em ambiente fechado.....	39
Figura 3: (A) Produção de <i>Spirulina</i> sp. na Califórnia (EUA); (B) Produção de <i>Spirulina</i> sp. e <i>Haematococcus pluvialis</i> no Hawaii (EUA).....	40
Figura 4: Parque de reservatórios abertas do tipo "pista de corrida" (raceway ponds)..	40
Figura 5: Esquema de produção em tanque coberto.....	41
Figura 6: Cultivo de microalgas em fotobiorreatores.....	42
Figura 7: Colheita de microalgas produzidas no fotobiorreator	43
Figura 8: Cultivo experimental em fotobiorreator no MIT	45

ARTIGO III

Figura 1 - Curvas de crescimento de <i>Chlorella</i> sp. para cada condição de meio de cultivo avaliado. Cada curva representa a média de três repetições, em número de células por mililitro.....	62
Figura 2 - Variação do pH durante o desenvolvimento das culturas de <i>Chlorella</i> sp.....	63
Figura 3 – Média e desvio padrão de biomassa seca em miligramas por litro de cultura, considerando cada condição avaliada (aa = Meio com suplementação de CO ₂ ; ab = Meio com suplementação de CO ₂ e com baixo teor de Nitrogênio; ba = Meio Watanabe; bb = Meio com baixo teor de Nitrogênio).....	64
Figura 4- Proteínas hidrossolúvel de biomassa liofilizada de <i>Chlorella</i> sp., considerando cada condição avaliada (aa = Meio com suplementação de CO ₂ ; ab = Meio com suplementação de CO ₂ e com baixo teor de Nitrogênio; ba = Meio Watanabe; bb = Meio com baixo teor de Nitrogênio).	66
Figura 5- Carboidratos totais de biomassa liofilizada de <i>Chlorella</i> sp., considerando cada condição avaliada (aa = Meio com suplementação de CO ₂ ; ab = Meio com suplementação de CO ₂ e com baixo teor de Nitrogênio; ba = Meio Watanabe; bb = Meio Com baixo teor de Nitrogênio).	67

Figura 6- Lipídios totais de biomassa liofilizada de <i>Chlorella</i> sp., considerando cada condição avaliada (aa = Meio com suplementação de CO ₂ ; ab = Meio com suplementação de CO ₂ e com baixo teor de Nitrogênio; ba = Meio Watanabe; bb = Meio Com baixo teor de Nitrogênio).	69
--	----

ARTIGO IV

Figura –1. Comportamento reológico durante os dias de cultivo de <i>Chlorella</i> sp. em meio Watanabe.	88
Figura – 2. Comportamento reológico durante os dias de cultivo de <i>Chlorella</i> sp. em meio com baixo teor de nitrogênio	89
Figura – 3. Comportamento dos parâmetros reológicos durante os dias de cultivo de <i>Chlorella</i> sp. em meio com baixo teor de nitrogênio	91
Figura – 4. Viscosidade aparente durante o cultivo de <i>Chlorella</i> sp. no meio com baixo teor de nitrogênio em função da tensão de cisalhamento aplicada.....	91
Figura – 5. Densidade relativa durante o cultivo de <i>Chlorella</i> sp. em meio Watanabe e em meio com baixo teor de nitrogênio.	93

ARTIGO V

Figura – 1. Desenho esquemático da coluna de sedimentação.....	104
Figura 2. Isocurvas da porcentagem de remoção de sólidos	106
Figura 3- Ensaio de floculação com sulfato de alumínio da cultura da microalga <i>Chlorella</i> sp. em meio com baixo teor de nitrogênio.....	109
Figura 4- Ensaio de floculação com sulfato de ferro da cultura da microalga <i>Chlorella</i> sp. em meio com baixo teor de nitrogênio.....	109
Figura 5- Porcentagem de remoção de sólidos para a centrifugação de <i>Chlorella</i> sp. .	113

LISTA DE TABELAS

ARTIGO II

Tabela 1 - Espécies de microalgas promissoras à produção de biodiesel (TAKAGI et al., 2006).....	35
Tabela 2 – Exemplos de produção de biodiesel com biomassa diversas (MAYFIELD, 2008).....	37

ARTIGO III

Tabela 1 – Teste de comparação de médias (Duncan com $p < 0,05$) para a biomassa seca para a condição de carbono no meio de cultivo.....	65
Tabela 2 – Teste de comparação de médias (Duncan com $p < 0,05$) para a biomassa seca em diferente condição de nitrogênio no meio de cultivo.....	65
Tabela 3 – Teste de comparação de médias (Duncan com $p < 0,05$) para proteínas hidrossolúveis em diferente condição de nitrogênio no meio de cultivo.	67
Tabela 4 – Teste de comparação de médias (Duncan com $p < 0,05$) para carboidratostotais em diferente condição de nitrogênio no meio de cultivo.	68

ARTIGO IV

Tabela 1. Parâmetros do modelo de Ostwald-de-Waelle (Lei da Potência) durante o cultivo de <i>Chlorella</i> sp. em meio com baixo teor de nitrogênio.	90
--	----

ARTIGO V

Tabela 1 – Porcentagem de remoção de sólidos para a sedimentação de <i>Chlorella</i> sp.106	
Tabela 2 – Porcentagem de remoção de sólidos para a centrifugação de <i>Chlorella</i> sp.112	

RESUMO

LIRA, Rafael de Araújo, DSc., Universidade Federal de Viçosa, Agosto de 2011.
Estudo do rendimento de biomassa da microalga nativa *Chlorella* sp. visando a obtenção de biocombustíveis. Orientador: Marcio Arêdes Martins. Co-orientadores: Rosane M. de A. Euclýdes, Jane Sélia dos Reis Coimbra e Antonio Teixeira de Matos.

As características metabólicas das microalgas fazem destes microrganismos uma fonte potencial de recursos a serem explorados. Associado ao metabolismo fotossintético, a respiração e a fixação de nitrogênio constituem rotas metabólicas, passíveis de serem exploradas biotecnologicamente para diversos propósitos, uma vez que a produtividade por unidade de área instalada destes organismos é elevada, quando comparada a processos convencionais de produção de alimentos e de energia. Estes microrganismos ainda apresentam rica reserva de proteínas, carboidratos, lipídeos, além de outros conteúdos celulares que podem ser utilizados, desde que bem explorados em termos tecnológicos. Nesse contexto, nos artigos 1 e 2 apresenta-se uma revisão de literatura sobre a produção comercial das microalgas e considerações sobre o potencial de aplicação biotecnológica do óleo de microalgas na fabricação dos biocombustíveis, dando ênfase a tendência atual do mecanismo de desenvolvimento limpo. Estudos preliminares revelaram que, em meios de cultivo com limitação de nitrogênio, ocorre aumento no teor de lipídeos de certas espécies de microalgas. Em face disto, no artigo 3 teve-se por objetivos avaliar o efeito de diferentes variáveis do meio de cultivo; limitação de nitrogênio e suplementação com CO₂ no crescimento e no rendimento em biomassa da microalga nativa *Chlorella* sp.. A biomassa foi caracterizada em termos de suas propriedades bioquímicas, visando sua possível utilização como matéria prima para a produção do biodiesel. Considerando a ausência de informações na literatura científica sobre estudos reológicos de cultivos microalgais, foi investigado no artigo 4 o comportamento reológico da cultura da microalga nativa *Chlorella* sp. em função do tempo de cultivo em meio Watanabe e no meio com baixo teor de nitrogênio. Por fim, no artigo 5 avaliou-se a sedimentação, centrifugação e a influência das condições de coagulação/floculação, que maximizam a remoção da biomassa de *Chlorella* sp. em suspensão no meio de cultivo Watanabe com baixo teor de nitrogênio, visando usar a biomassa como matéria prima para o biodiesel.

ABSTRACT

LIRA, Rafael de Araújo, DSc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2011. **Study on biomass yield of native microalgae *Chlorella sp.* aimed at obtaining biofuels.** Advisor: Marcio Arêdes Martins. Co-Advisors: Rosane M. de A. Euclides, Jane Sélia dos Reis Coimbra and Antonio Teixeira de Matos.

The metabolic characteristics of microalgae make these microorganisms a potential source of resources to be exploited. Associated with photosynthetic metabolism, respiration and nitrogen fixation are metabolic pathways, which can be exploited biotechnologically for various purposes. Since the productivity per unit area installed of these organisms is high when compared to conventional processes of production of food and energy. These microorganisms also have a rich reserve of proteins, carbohydrates, lipids, besides other contents that can be used, since they are well exploited in technological terms. In this context, the articles 1 and 2 present a review of literature about the commercial production of microalgae and some considerations about the potential for biotechnological applications of microalgae oil in the manufacture of biofuels, with emphasis on the current trend of clean development mechanism. Preliminary studies showed that in culture area with nitrogen limitation there is an increase in lipid levels of certain species of microalgae. Due to this, the article 3 aimed to evaluate the effect of the parameters of the growth conditions; nitrogen limitation and supplementation with CO₂ on growth and on biomass yield of native microalgae *Chlorella sp.* Biomass was characterized in terms of its biochemical properties, seeking its possible use as raw material for biodiesel. Considering the lack of information in scientific literature on rheological studies of microalgae cultures it was investigated in article 4 the rheological behavior of the native culture of the microalgae *Chlorella sp.* considering the time of its cultivation in Watanabe area and in area with a low nitrogen concentration. Finally, the article 5 aimed to evaluate the sedimentation, centrifugation and the influence of the conditions of coagulation / flocculation, which maximize the removal of the biomass of *Chlorella sp.* hanging in Watanabe culture area with low in nitrogen, seeking the possibility of using biomass as raw material for biofuel.

INTRODUÇÃO GERAL

As características metabólicas das microalgas fazem destes microrganismos fonte potencial de recursos a serem explorados. Associado ao metabolismo fotossintético, a respiração e a fixação de nitrogênio constituem rotas metabólicas, biotecnologicamente viáveis para diversos propósitos, uma vez que a produtividade por unidade de área instalada destes organismos é elevada, quando comparada a processos convencionais de produção de alimentos e de energia. Estes microrganismos representam uma rica reserva de proteínas, carboidratos, lipídeos e outras substâncias celulares que podem ser utilizadas, desde que bem exploradas em termos tecnológicos (MOLINA-GRIMA, 2003).

O cultivo de microalgas para a obtenção de biomassa e de seus produtos de síntese é uma atividade industrial estabelecida em escala comercial em alguns países e a produção está a cargo de grandes empresas. Segundo Spolaore et al. (2006), atualmente a indústria de biomassa de microalgas produz mais de 5000 t ano⁻¹ de massa seca, gerando renda superior a US\$ 1,25 bilhões de dolares por ano, não incluindo os subprodutos, o que demonstra o potencial de exploração deste seguimento biotecnológico.

Apesar de ser uma atividade consolidada em outros países, o cultivo comercial de microalgas no Brasil tem sido realizado por empresas que produzem a biomassa e a empregam principalmente na alimentação de organismos como camarões e moluscos marinhos.

A primeira menção ao uso de algas para a produção de biocombustíveis ocorreu em 1950, no MIT (Instituto de Tecnologia de Massachusetts). Entre 1980 e 1995, o “United States Department of Energy” e o “National Renewable Energy Laboratory” (NREL) desenvolveram o Algae Species Program (ASP) (BENEMANN, 2008), até hoje considerado um marco referente ao assunto. A partir daí, o cultivo de algas vem apresentando uma série de modalidades. Diversos pesquisadores (BRENNAN & OWENDE, 2009; CHIU et al., 2008; LI, 2007; XU et al., 2006) têm buscado viabilizar o cultivo em larga escala de alta densidade celular e com alto teor de óleo. No entanto, esta classe de cultivo apresenta uma série de inovações tecnológicas para a obtenção de produtividade satisfatória de biomassa algal e de óleo. Pesquisadores e instituições envolvidas nas áreas afins, ao considerarem as conquistas recentes da biotecnologia (engenharia metabólica, genômica, proteômica, metabolômica, bioinformática, desenho

de bioreatores, dentre outras), assinalam que o cultivo de alta densidade pode ser viável, em pouco tempo (XIONG et al., 2008; SONG, 2008; MOLINA GRIMA, 2003; SCRAGG et al., 2002).

Vários experimentos descrevem o potencial de produtividade em biomassa e teor de óleo, independentemente do uso energético (RICHMOND, 2004). Até fevereiro de 2008, foram identificadas e caracterizadas algumas espécies selvagens que apresentam grande potencial. Os genomas de algumas destas espécies foram seqüenciados e estirpes geneticamente modificadas foram obtidas (MAYFIELD, 2008). Para desenvolver o cultivo em larga escala é necessário isolar e caracterizar outras espécies, além de aprimorar ferramentas genéticas em busca de características específicas. Paralelamente, é necessário desenvolver novos métodos de produção e processos para separação, extração e conversão do óleo, sendo muitos os desafios.

Microalgas é um nome dado a diferentes grupos de organismos vivos, podendo ser unicelulares e multicelulares. No passado, eram consideradas plantas, mas ultimamente no grupo estão também incluídos organismos com estruturas celulares procarióticas e eucarióticas, mesmo sendo estruturalmente e morfologicamente diferentes, embora metabolicamente parecidos entre si e com as plantas (BENEMANN, 1997).

As microalgas são encontradas nos mais diversos ambientes, tais como em rios e lagos de água doce, no meio marinho e até em terra firme. Há milhões de espécies de microalgas e sua composição bioquímica também é muito diversa, dando origem a uma quantidade ilimitada de produtos (RICHMOND, 2004). As microalgas possuem várias aplicações, tais como no tratamento de águas residuárias de processos industriais, com detoxificação biológica e de metais pesados; na agricultura, como biofertilizante, entre várias outras. Além disso, como as microalgas fornecem mais oxigênio ao planeta do que todas as outras plantas juntas, podem ser usadas na mitificação do efeito estufa, devido a sua grande capacidade de assimilação de CO₂ (BENEMANN, 2008).

Com o crescimento das atenções voltadas para as tecnologias limpas, desenvolvimento sustentável e preocupação ambiental, as microalgas estão aparecendo como soluções para esses ideais. De acordo com a pesquisa realizada por Teixeira & Morales (2006) do Instituto Nacional de Tecnologia, as microalgas possuem características que garantem a produção de um biocombustível eficiente e limpo, sem riscos preocupantes para a sua utilização. Colocando em pauta as vantagens das microalgas, pode-se perceber que a produção de biocombustíveis, em certos aspectos,

apresentam atrativos no que se refere à reutilização de resíduos provenientes de outros processos de produção.

O artigo 1 deste trabalho trata-se de uma revisão na qual é apresentada uma atualização sobre a produção comercial das microalgas e considerações sobre o seu potencial de aplicação biotecnológica, considerando-se como referencial, as principais espécies empregadas comercialmente e os compostos de interesse industrial. No artigo 2, é feita referência à produção de microalgas e considerações sobre o potencial de aplicação do óleo de microalgas na fabricação dos biocombustíveis, dando-se ênfase a tendência atual do mecanismo de desenvolvimento limpo.

Nos últimos anos, pesquisas tem verificado que em meios de cultivo com limitação na disponibilidade de nitrogênio ocorre aumento no teor de lipídeos de certas algas (PIORRECK et al., 1984; BOROWITZKA, 1988; ILMA et al., 2000). Estes processos têm recebido considerável atenção, motivados pela associação do tratamento de águas residuárias com o desenvolvimento de novos produtos e determinados componentes. Em face disto, no Artigo 3 deste trabalho, teve-se por objetivos avaliar o efeito de diferentes variáveis do meio de cultivo, tais como limitação de nitrogênio e suplementação com CO₂ no crescimento e no rendimento em biomassa da microalga nativa *Chlorella* sp.. A biomassa obtida foi caracterizada em termos de suas propriedades bioquímicas (Proteínas, Lipídios e Carboidratos), visando sua possível utilização como matéria prima para a produção do biodiesel.

Considerando-se a ausência de informações na literatura científica sobre estudos reológicos de cultivos microalgais, no artigo 4 teve-se por objetivo avaliar o comportamento reológico da suspensão da cultura de microalgas nativas *Chlorella* sp. em função do tempo de cultivo em meio Watanabe e no meio com baixo teor de nitrogênio. Sabe-se que, nesse último, há aumento no conteúdo lipídico, anteriormente, determinado por Illman (2000), o que pode proporcionar alteração nesse comportamento. E por fim, no Artigo 5, objetivou-se avaliar o desempenho de operações unitárias de separação para a biomassa *Chlorella* sp.: sedimentação, coagulação e floculação seguida de sedimentação, e centrifugação. Todos estes experimentos foram efetuadas com a cepa cultivada no meio com baixo teor de nitrogênio, visando-se avaliar o uso da utilização da biomassa como matéria prima para a produção de biodiesel.

REFERÊNCIAS

BENEMANN, J. R. – CO₂ Mitigation with microalgae systems. **Energy Conversion Management**, 38, S475-479, 1997.

BENEMANN, J. R., **Overview: Algae Oil to Biofuels**, National Renewable Energy Laboratory - Air Force Office of Scientific Research Workshop on Algal Oil for Jet Fuel Production - February, 2008.

BRENNAN L., OWENDE, P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 805 (2009) 01–20. 2009.

BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. (eds). **Micro-algal biotechnology**. Cambridge University, Cambridge, UK, 477pp. 1988.

CHIU, S.-YI; KAO, C.-Y.; CHEN, C.-H., KUANA, T.-C.; ONGA, S.-C.; LIN, C.-S. Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. **Bioresource Technology** 2008;99(9):3389– 96.

ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grow in low nitrogen medium. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 27, p. 631-635, 2000.

LI X, XU H, WU Q. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering** 2007;98(4):764–71.

MAYFIELD, S., **Algal Model**, National Renewable Energy Laboratory - Air Force Office of Scientific Research Workshop on Algal Oil for Jet Fuel Production - February, 2008;

MOLINA-GRIMA, E. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnol. Adv.**, v. 20, p. 491-515, 2003.

PIORRECK, M., BAASCH, K.-H. & POHL, P. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of fresh water green and blue-green algae under different nitrogen regimes. **Phytochemistry** 1984; 23, 207–216.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture**: biotechnology and applied phycology. Oxford: Black Well Science, 2004. 566p.

SCRAGG, A. H.; ILLMAN, A. M.; CARDEN, A.; SHALES, S. W. Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor. **Biomass and Bioenergy** 2002;23(1):67–73.

SONG D.; FU J.; SHI D. Exploitation of oil-bearing microalgae for biodiesel. **Chinese Journal of Biotechnology** 2008;24(3):341–8.

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

TEIXEIRA, C. M. L. L.; MORALES, E. – Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel. In: **I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel**, 2006, Brasília.

XIONG, W.; LI, X.; XIANG, J.; WU, Q. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology** 2008;78(1):29–36.

XU H, MIAO X, WU Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology** 2006;126(4):499–507.

**ARTIGO I: CULTIVO E APLICAÇÕES DE MICROALGAS E DE SEUS
PRINCIPAIS DERIVADOS**

CULTIVO E APLICAÇÕES DE MICROALGAS E DE SEUS PRINCIPAIS DERIVADOS

RESUMO

Nos últimos anos, muita atenção tem sido dirigida ao potencial biotecnológico das microalgas, principalmente devido à identificação de diversas substâncias sintetizadas por estes microrganismos. A imensa biodiversidade e conseqüente variabilidade na composição bioquímica da biomassa obtida das culturas microalgais, aliadas ao emprego de melhoramento genético e ao estabelecimento de tecnologia de cultivo em grande escala, vêm permitindo que determinadas espécies sejam utilizadas comercialmente. Nesse contexto, cultivos de microalgas têm sido realizados visando à produção de biomassa, tanto para uso na elaboração de alimentos como para a obtenção de compostos naturais com alto valor no mercado mundial. Além destes produtos, o potencial de produção de matéria prima para a produção de biocombustíveis tem sido investigado. Dentre os inúmeros compostos extraídos, ou com potencial de exploração comercial, podem ser relacionados ácidos graxos poliinsaturados, carotenóides, ficobilinas, polissacarídeos, vitaminas, esteróis e diversos compostos bioativos naturais (antioxidantes, redutores do colesterol, entre outras), os quais podem ser empregados especialmente no desenvolvimento de alimentos funcionais ou produtos farmacêuticos. No setor de biocombustíveis, o cultivo de microalgas apresenta várias características interessantes: custos relativamente baixos para a colheita e transporte, além de menor gasto de água e cultivo realizado em condições não adequadas para a produção de culturas convencionais.

Palavras-chave: microalgas, biotecnologia, cultivo microalgal, biomassa.

CULTIVATION AND USES OF MICROALGAE AND THEIR MAIN DERIVATIVES

ABSTRACT

In recent years, much interest has been established in the literature on the biotechnological potential of microalgae, mainly due to the identification of various substances synthesized by these microorganisms. The great biodiversity and the consequent variability in the biochemical composition of biomass obtained from the microalgae cultures, allied to the use of genetic improvement and establishment of technology in cultivation in a large scale, have allowed that some species are used commercially. In this context, cultivation of microalgae have been conducted aimed the production of biomass for use both in the preparation of food and for the obtainment of natural compounds with high value in the world market. Besides these products, the potential production of raw materials for biofuel production has been investigated. Among a vast extracted substances, or with commercial potential may be related polyunsaturated fatty acids, carotenoids, phycobilins, polysaccharides, vitamins, sterols and several bioactive compounds (antioxidants, cholesterol reducers, among others.), which can be especially used in the development of functional food or pharmaceutical products. In biofuels field the cultivation of microalgae presents several interesting characteristics: relatively low costs for harvesting and transportation and less water usage, compared to growing plants; can be performed in conditions do not suitable for the production of conventional crops.

Keywords: microalgae, Biotechnology, microalgae cultivation, biomass.

1. INTRODUÇÃO

O crescente interesse no estudo de microrganismos como microalgas, deve-se à possibilidade de sua aplicação comercial em distintas áreas como na nutrição, na saúde humana e animal, no tratamento de águas residuárias, na produção de energia e na obtenção de compostos de interesse das indústrias de alimentos, química e farmacêutica, dentre outras.

Atualmente, as pesquisas em biotecnologia alimentar empregando microalgas vêm ganhando especial atenção. No entanto, a coleta e o cultivo para utilização na alimentação humana não é novidade, já que têm sido realizados há séculos. Povos nativos do Chade, na África, e do lago Texcoco (Astecas), no México, alimentavam-se de produtos feitos com biomassa de *Spirulina* spp. Bory, (Cyanophyceae). Ainda hoje, os nativos do Chade, em determinadas épocas do ano, dependem quase que exclusivamente da coleta desta microalga para sua alimentação (DERNER, 2006).

Várias espécies são cultivadas comercialmente em alguns países e a biomassa produzida tem sido utilizada como fonte de produtos para aplicação na indústria de alimentos. Segundo Pulz & Gross (2004), o mercado de alimentos funcionais, utilizando microalgas em massas, pães, iogurtes e bebidas, apresenta rápido desenvolvimento em países como França, Estados Unidos, China e Tailândia. As principais microalgas cultivadas comercialmente são espécies dos gêneros *Chlorella Beyerinck*, (Chlorophyceae) e *Arthrospira Stizenberger* (Cyanophyceae), para a adição em alimentos naturais (“health food”); *Dunaliella salina* Teodoresco (Chlorophyceae), para a obtenção de betacaroteno; e *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae), para a aquisição de astaxantina e *Spirulina platensis* para obtenção de proteínas (DERNER, 2006).

Entre as possibilidades de utilização da biomassa de microalgas, está a geração de biocombustíveis. Segundo Amin (2009), comparando as principais plantas geradoras de biomassas para os biocombustíveis, as microalgas possuem maior eficiência fotossintética. A produção de biocombustível a partir de organismos fotossintéticos é um processo que utiliza a energia renovável, portanto, a biomassa de microalgas é um recurso altamente promissor, segundo Mata et al. (2010). Aliada à fixação de CO₂ e à produção de energia, a utilização das microalgas pode significar redução nas emissões de CO₂ na atmosfera, podendo vir a evitar futuras crises energéticas (HIRAYAMA, 1998; HIRANO, 1997). As microalgas, além de apresentarem grande capacidade de

fixar CO₂, podem gerar petróleo, seja por meio da conversão biológica em lipídios, com geração de biodiesel ou hidrocarbonetos ou pela liquefação termoquímica (Conversão de biomassa úmida em bio-óleo) de células microalgais (FAO, 2010; YANG et al., 2004). Microalgas possuem lipídios e ácidos graxos como componentes da membrana celular, produtos estes de armazenamento e fontes de energia (FAO, 2010).

Com o exposto, nesta revisão busca-se apresentar uma atualização sobre a produção comercial das microalgas e considerações sobre o potencial de aplicação biotecnológica, sobre as principais espécies empregadas comercialmente e dos compostos de interesse industrial.

2. SOBRE MICROALGAS

Microalgas é um termo que abrange muitos grupos diferentes de organismos vivos. Elas variam de organismos pequenos, unicelulares, a organismos multicelulares (alguns com formas diferenciadas e razoavelmente complexas). As microalgas foram consideradas tradicionalmente como plantas simples, sendo algumas muito proximamente relacionadas às plantas mais evoluídas (LOURENÇO, 2007).

O termo microalgas não tem valor taxonômico, pois engloba microrganismos algais com clorofila e outros pigmentos fotossintéticos, capazes de realizar a fotossíntese oxigênica. Sob a denominação microalgas estão incluídos organismos com dois tipos de estrutura celular: estrutura procariótica e eucariótica. Apesar das diferenças estruturais e morfológicas entre os representantes de cada divisão, esses seres são fisiologicamente similares e apresentam um metabolismo análogo ao das plantas. São encontradas principalmente no meio marinho, em água doce e no solo (RICHMOND, 2004).

O número exato de espécies microalgais ainda é desconhecido. Atualmente são encontradas citações relatando que podem existir desde 200.000 a até alguns milhões de representantes deste grupo. Tal diversidade também se reflete na composição bioquímica das microalgas, o que faz com que elas sejam fonte de quantidade ilimitada de produtos (NORTON, 1996; PULZ & GROSS, 2004; DERNER, 2006) .

Os principais grupos taxonômicos são (WYNNE, 2005):

- Chromista: inclui as microalgas marrons, microalgas marrons douradas, e as diatomáceas. Contêm clorofila A e C;

- Vermelha: linha de microalgas marinhas que contêm apenas a clorofila A;
- Dinoflagellates: evoluem em uma linha separada das outras, que inclui a *ciliated protists*;
- Euglenids: esta linha independente, de organismos unicelulares, inclui as espécies fotossintética e não- fotossintética;
- Verde: é relacionada às plantas. As plantas e as microalgas verdes contêm clorofila A e B.

As três linhas de microalgas mais importantes são as microalgas marrons (Chromista), as microalgas vermelhas e as microalgas verdes (entre as quais estão encontradas algumas das formas mais complexas entre as microalgas). Esta última linha gerou as plantas mais evoluídas da Terra. O ponto de divisão entre microalgas e plantas superiores é, geralmente, determinado pela presença de órgãos reprodutivos com camadas de células protetoras, característica não encontrada nos outros grupos de microalgas (NUNES, 2005).

As microalgas são espécies extremamente importantes para a vida na Terra. Rodolfi et al. (2009) estimaram que elas possam produzir mais oxigênio do que todas as plantas no mundo juntas. Afora as aplicações relacionadas ao emprego das microalgas e de seus produtos na indústria de alimentos, muitos estudos vêm sendo realizados nos mais diversos campos, como no tratamento de águas residuárias de inúmeros processos industriais, na detoxificação biológica, na remoção de metais pesados etc. Na agricultura, a biomassa pode ser empregada como biofertilizante do solo. Além disso, as microalgas podem ser usadas na mitigação do efeito estufa, pela assimilação do CO₂ (SAWAYAMA, 1995).

O cultivo de microalgas para a obtenção de biomassa e de seus produtos de síntese é uma atividade industrial estabelecida em escala comercial em alguns países. Além das substâncias conhecidas, a quantidade de compostos de interesse comercial que podem ser obtidos das microalgas parece ser imprevisível (HOSSAIN, 2008).

O crescente interesse global em tecnologias limpas, sustentáveis e orgânicas na obtenção de produtos para o consumo humano, demanda contínua busca por espécies e variedades capazes de sintetizar grandes quantidades de compostos específicos e de maneiras de potencializar a biossíntese destes (condições de cultivo, melhoramento genético, entre outros). Igualmente, existe a necessidade de mais pesquisas visando o desenvolvimento e, principalmente, o aperfeiçoamento dos sistemas de produção em

escala comercial, a fim de tornar comercialmente viáveis alguns dos sistemas conhecidos (AMIN, 2009).

Com as recentes pesquisas e o interesse em extrair óleo e carboidratos de microalgas para produzir biodiesel e etanol, respectivamente, elas têm o potencial de se tornar ainda mais importantes.

3. AMBIENTES DE CULTIVO DAS MICROALGAS

As microalgas estão entre os organismos mais robustos da terra e são capazes de crescer em condições adversas. Elas são, geralmente, encontradas em lugares úmidos ou em corpos de água, sendo, assim, comuns tanto em terra como em ambientes aquáticos. As microalgas terrestres são encontradas com maior frequência em regiões úmidas ou tropicais do que nas regiões secas, pois elas não têm tecidos vasculares e outras adaptações necessárias à vida no solo (PÉREZ, 2007).

No ambiente natural, assim como nos cultivos, o crescimento de uma população de microalgas é resultado da interação entre fatores biológicos, físicos e químicos. Os fatores biológicos estão relacionados às próprias taxas metabólicas da espécie cultivada, bem como à possível influência de outros organismos sobre o desenvolvimento das microalgas. Quanto aos fatores físico-químicos, são principalmente reportados estudos sobre iluminação, temperatura, salinidade e disponibilidade de nutrientes (DUARTE, 2001).

Muitas das substâncias sintetizadas e acumuladas pelas microalgas são, também, encontradas nas plantas que evoluíram das algas verdes ou clorófitas. Entretanto, a produção comercial de microalgas pode ser justificada por apresentar diversas vantagens, pelo fato do cultivo de microalgas constituírem sistema biológico eficiente na utilização da energia solar para a produção de matéria orgânica, sendo que muitas espécies crescem mais rapidamente do que as plantas terrestres. Isso possibilita maiores rendimentos anuais ou produtividade de biomassa.

O rendimento de microalgas foi determinado para as espécies *Phaeodactylum tricornutum*, *Dunaliella primolecta*, *Monallanthus saltha*, *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis* sp., *Botryococcus braunii*, as quais apresentaram os seguintes valores máximos: 22,0; 12,0; 13,9; 19,1; 11,5 e 3,4 g m² d⁻¹ de MS (gramas de massa seca, por metro quadrado, por dia), respectivamente (THOMAS et al., 1983). Em outro teste, encontraram para a espécie *Nitzschia* sp. 8,8 g m⁻² d⁻¹ de MS e 45,8 g m⁻² d⁻¹ de MS para *Oocystis pusilla*, quando cultivadas com ureia como fonte de nitrogênio

(THOMAS et al., 1983). As espécies *Chlorella* sp. e *Nannochloris* sp. apresentaram, respectivamente, 55,5 g m⁻² d⁻¹ de MS e 31,5 g m⁻² d⁻¹ de MS, com temperatura ótima variando de 25 a 35 °C (THOMAS et al., 1984). Lopez-Elias et al. (2005) obtiveram rendimento diário de biomassa seca para *Chaetoceros muelleri*, cultivada em sistema estacionário protegido, durante o verão-outono, de 26,1 g m⁻³ d⁻¹ e de 43,7 g m⁻³ d⁻¹ durante o inverno-primavera, valores estes inferiores ao valor estimado para esta espécie.

Rodolfi et al. (2003) obtiveram rendimento de biomassa seca para *Nannochloropsis*, cultivada em reator, variando de 1,88 a 4,8 g L⁻¹, quando testando quatro meios de crescimento durante 28 dias. Já o rendimento de biomassa seca em uma semana foi em torno de 1 g L⁻¹, valor este, superior ao encontrado neste estudo para o mesmo período, porém não muito discrepante, uma vez que o valor encontrado foi de 0,828 g L⁻¹ e das diferentes condições de cultivo. Todavia, Rocha et al. (2003), encontraram para esse parâmetro 0,38 g L⁻¹, valor este inferior aos acima referidos.

O rendimento encontrado por Iwamoto (2004), na produção de *Chlorella* sp., foi de 48 g quando da avaliação de reservatórios de 10 m³, durante 48 h, em sistema fechado e contínuo, Cohen et al., (1991) encontraram valores de rendimento diário de massa seca e polissacarídeos de 17,7 e 7,4 g m⁻², respectivamente. Em tanques abertos, esses valores foram de 7,6 e 2,4 g m⁻² para a espécie *Porphyridium* sp..

Segundo Hughes & Benemann (1997), a fotossíntese algal é aumentada de 1-3 g m⁻² d⁻¹ de C em sistemas convencionais de tanques abertos, e de 10-12 g m⁻² d⁻¹ de C em sistema aquícolas isolados e cobertos, o que corresponde a 3,65-10,95 t ha⁻¹ a⁻¹ de C e 36,5-43,8 t ha⁻¹ ano⁻¹ de C, respectivamente.

Cultivos realizados em fotobiorreatores conjuntos do tipo serpentina, feitos de tubos de polietileno transparente, com diâmetro de 41 cm e capacidade para 25.000 litros, ocupando uma área de 100 m², apresentaram produtividade de 250 g L⁻¹, ou seja, 6,25 t em um hectare ou em 25.000 litros de cultivo (OLAIZOLA, 2003).

4. APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS MICROALGAS

A aplicação mais comum tem sido na aquícultura, para a alimentação direta ou indireta de algumas espécies de peixes, moluscos, crustáceos e de diversos organismos forrageiros de interesse econômico. São empregadas espécies de Bacillariophyceae (*Chaetoceros* spp. Ehrenberg, *Thalassiosira* spp. Cleve, *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin e *Skeletonema costatum* Greville), Haptophyceae (*Isochrysis* spp. Parke),

Cryptophyceae (*Rhodomonas* spp. Karsten), Chrysophyceae (*Monochrysis* spp. Skuja), Prasinophyceae (*Tetraselmis* spp. Stein), Cyanophyceae (*Arthrospira* spp. e *Spirulina* spp.) e Chlorophyceae (*Chlorella* spp., *Dunaliella* spp. e *Scenedesmus* spp. Bourrelly), dentre outras classes e diversas espécies (SILVA et al., 2003; MULLER-FEUGA, 2004; DERNER et al., 2006).

Além da consolidada produção para a obtenção de biomassa, diversas microalgas têm sido cultivadas por sua capacidade de sintetizar compostos considerados nutracêuticos, Gill & Valivety, (1997) destaca a importância dos ácidos graxos poliinsaturados (ácido araquidônico - ARA, ácido eicosapentaenóico – EPA e ácido docosahexaenóico – DHA, por exemplo) e pigmentos carotenóides (astaxantina, betacaroteno, luteína, cantaxantina etc.), que apresentam propriedades terapêuticas. Atualmente, algumas microalgas têm sido comercializadas como alimento natural ou suplemento alimentar e são encontradas formulações em pó, tabletes, cápsulas ou extratos. São também incorporadas em massas, snacks, doces, bebidas dentre outros, tanto como suplemento nutricional quanto como corantes naturais (TRIPATHI et al., 1999).

Para o emprego na elaboração de alimentos, bem como para a extração de alguma substância de interesse, é necessário primeiramente separar a biomassa do meio de cultura. O processo de separação envolve uma ou mais etapas, como floculação, centrifugação e filtração, por exemplo. Para a desidratação da biomassa, diversas técnicas podem ser empregadas, como a secagem ao sol, secagem por meio de aspersão (*spray-drying*) e a liofilização. Para a extração dos compostos, as células microalgais são rompidas, empregando métodos de homogeneização, ultra-som, choque osmótico, solventes, enzimas, congelamento, dentre outras. As substâncias de interesse são, então, recuperadas e, na maioria dos casos, sofrem algum processo de purificação, como ultrafiltração, cromatografia ou fracionamento (SAWAYAMA et al., 1995; JACOB-LOPES et al., 2006; MOLINA-GRIMA, 2003; PATIL et al., 2008).

4.1 ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS

Os componentes lipídicos, especialmente os ácidos graxos, estão presentes nas mais diversas formas de vida, desempenhando importantes funções na estrutura das membranas celulares e nos processos metabólicos. Em humanos, os ácidos linoléico (18:2n-6, AL) e alfa-linolênico (18:3n-3, AAL) são necessários para manter sob condições normais, as membranas celulares, as funções cerebrais e a transmissão de

impulsos nervosos. Esses ácidos graxos também participam da transferência do oxigênio atmosférico para o plasma sanguíneo, da síntese da hemoglobina e da divisão celular, sendo denominados essenciais por não serem sintetizados pelo organismo a partir dos ácidos graxos provenientes da síntese de novo (YOUDIM et al., 2000; YEHUDA et al., 2002).

Os ácidos graxos podem ser obtidos de fontes animais ou vegetais, tanto terrestres quanto aquáticas, e diversos microrganismos têm sido considerados como uma alternativa às fontes usuais desta classe de lipídios (CERTIK & SHIMIZU, 1999). Segundo RATLEDGE (2001), a produção de óleo a partir de organismos unicelulares (“*single cell oil*” – SCO) é um conceito relativamente novo, sendo que as microalgas mostram-se como uma promissora opção.

Becker (2004) relata que o conteúdo de lipídios da biomassa microalgal pode variar entre 1 a 40 % do peso seco e, em certas condições de cultivo, pode alcançar até 85%. Os lipídios algais são tipicamente compostos por glicerol, açúcares ou bases esterificadas e ácidos graxos contendo entre 12 e 22 carbonos, podendo ser tanto saturados quanto mono ou poliinsaturados. Os ácidos graxos correspondem à maior fração dos lipídios e, em algumas espécies, os PUFA (“*polyunsaturated fatty acids*”) representam entre 25 e 60% dos lipídios totais (BECKER, 2004).

De acordo com Robles Medina et al. (1998), os lipídios de algumas espécies (quase sempre marinhas) contêm quantidades relativamente altas de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, notadamente de EPA (20:5 n-3) e DHA (22:6 n-3).

JIANG et al. (1999) relatam que a significância terapêutica dos PUFA tem sido demonstrada por diversos estudos clínicos e epidemiológicos. Ao EPA e ao DHA são atribuídas propriedades benéficas à saúde, associadas ao consumo de certos peixes marinhos e seus óleos. Os PUFA têm função na prevenção e tratamento de uma série de doenças cardiovasculares, da aterosclerose e da arritmia, da redução da pressão arterial, da redução dos níveis de colesterol e triglicerídios no plasma, da artrite reumatóide, do câncer e são aparentemente essenciais na nutrição infantil e no desenvolvimento cerebral.

Os peixes marinhos são uma conhecida fonte destes compostos nutricionalmente muito importantes. Entretanto, existem consideráveis evidências levantadas por Robles Medina et al. (1998) indicando que os ácidos graxos poliinsaturados encontrados nos óleos de peixes provêm da ingestão de organismos que constituem o zooplâncton, os quais têm as microalgas como seu principal alimento. Desta maneira, por meio da

cadeia trófica, os PUFA sintetizados e acumulados pelas microalgas são direcionados até os peixes.

Peixes como bacalhau, savelha, arenque, anchova e sardinha contêm alta proporção de gordura e são empregados na obtenção de PUFA. No entanto, os produtos extraídos destas fontes podem apresentar vários problemas, tais como: odor desagradável, contaminação com metais pesados, baixa estabilidade, presença de colesterol, produção variável e um complexo perfil de ácidos graxos, podendo apresentar mais de 50 tipos diferentes. Em contraste, os ácidos graxos das microalgas não apresentam as desvantagens citadas. Além disso, nos cultivos, as condições ambientais podem ser controladas e as espécies selecionadas de acordo com o(s) ácido(s) graxo(s) desejado(s). Ademais por apresentar composição mais simples, o processo de purificação dos PUFA é facilitado (ROBLES MEDINA et al., 1998; DERNER et al., 2006).

Dentre as espécies conhecidas de microalgas que apresentam quantidades significativas de PUFA das famílias Ômega-3 e Ômega-6, encontram-se representantes de Haptophyceae (*Isochrysis* spp. e *Pavlova lutheri* (Droop) Green), Bacillariophyceae (*Phaeodactylum tricornutum*, *Thalassiosira* spp. e *Odontella aurita* (Lyngbye) Agardh), Dinophyceae (*Cryptocodinium cohnii* (Seligo) Javornick), Rhodophyceae (*Porphyridium cruentum* Nägeli) e, em menor quantidade, de Chlorophyceae (YONGMANITCHAI & WARD, 1991). Segundo PULZ & GROSS (2004), os ácidos graxos poliinsaturados de origem microalgal têm mercado muito promissor na biotecnologia, em especial na indústria de alimentos funcionais.

4.2 CAROTENÓIDES

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

Os carotenóides, pigmentos de grande interesse comercial, funcionam como fotoprotetores e como pigmentos fotossintéticos secundários, sendo que cada espécie pode conter entre 5 a 10 tipos de um universo de aproximadamente 60 diferentes carotenóides presentes nas células microalgais. Diversas espécies podem acumular

grande concentração de betacaroteno, astaxantina ou cantaxantina, como por exemplo, aquelas que têm ampla aplicação como corantes naturais e como antioxidantes (BAKER & GUNTER, 2004; PULZ & GROSS, 2004).

O crescente interesse industrial por esses pigmentos naturais pode ser explicado pela capacidade atribuída a eles de prevenir doenças degenerativas: combatendo os radicais livres e funcionando como agentes anticâncer e estimuladores do sistema imunológico (OROSA et al., 1997). Comparados aos corantes sintéticos, são mais resistentes à presença de ácido ascórbico, ao calor, aos processos de congelamento e apresentam eficiência, mesmo quando aplicados nos alimentos em pequenas quantidades (SKULBERG, 2004). A rígida regulamentação para a aplicação de corantes sintéticos, na indústria de alimentos, estimula pesquisas visando ao desenvolvimento produtivo e ao uso de carotenóides microalgais como aditivo alimentar (CAMPO et al., 2000).

4.2.1 Betacaroteno

O betacaroteno é um pigmento tipicamente encontrado nas microalgas, bem como nas macroalgas e nas plantas. Geralmente, tem sido encontrado numa fração inferior a 1% da massa seca, mas pode ser acumulado até aproximadamente 10% em espécies halotolerantes (crescem em elevada concentração de sal), como naquelas do gênero *Dunaliella* (ABALDE et al., 1995). Este composto, extraído da biomassa microalgal, vem sendo aplicado comercialmente como corante natural, podendo atuar como pró-vitamina A, produto antioxidante e contra doenças degenerativas como o câncer. A espécie *D. salina* é reconhecidamente uma importante fonte de betacaroteno. O cultivo comercial é realizado de maneira eficiente em tanques abertos, em regiões de salinas, onde a elevada incidência luminosa e a alta salinidade geram um estresse (desequilíbrio osmótico) nas células, que respondem com a síntese de glicerol e betacaroteno (BOROWITZA & BOROWITZA, 1988; EDGE et al., 1997; BEN-AMOTZ, 2004; DERNER et al., 2006).

O betacaroteno de fonte microalgal tem sido comercializado sob três formas: extratos, pó e como biomassa seca. Segundo BEN-AMOTZ (2004), o preço deste produto varia entre US\$ 300,00 e US\$ 3.000,00 por quilograma, de acordo com a qualidade do produto e a demanda.

4.3 ASTAXANTINA

A espécie *Haematococcus pluvialis* tem sido cultivada comercialmente devido a sua capacidade de acumular astaxantina sob condições de estresse ambiental, como deficiência de nitrogênio e elevada intensidade luminosa. Segundo BOROWITZKA & BOROWITZA (1988), *H. pluvialis* pode conter entre 1,5 e 3% de astaxantina na biomassa seca. No mercado, são encontrados produtos na forma de concentrados em pó, liofilizados ou biomassa desidratada, bem como extrato em óleo vegetal. O maior mercado para a astaxantina tem sido a aqüicultura, onde é especialmente empregada para dar a cor avermelhada à carne do salmão cultivado, a astaxantina natural é vendida por aproximadamente US\$ 2.500,00 o quilograma, sendo que 95% do consumo mundial da aqüicultura são abastecidos com astaxantina sintética. Como existe em nível mundial crescente procura por produtos naturais, as empresas produtoras de astaxantina (extraída das microalgas) percebem isso como uma grande oportunidade comercial (MARGALITH, 1999).

O interesse pela produção e comercialização da astaxantina microalgal visando ao consumo humano também tem aumentado, pela iminência na aprovação pelo U S Food and Drug Administration (FDA), para o uso como ingrediente em suplementos dietéticos e por sua aprovação em diversos países europeus (CYSEWSKI & LORENZ, 2004).

Além do betacaroteno e da astaxantina, outros pigmentos como as ficobiliproteínas, notadamente a ficoeritrina (de coloração avermelhada), sintetizada por Cyanophyta, Rhodophyta e Cryptophyta, e a ficocianina (de coloração azulada / avermelhada) produzida por Cyanophyta, Rhodophyta, Cryptophyta e Glaucophyta, têm sido empregados como corantes na indústria de alimentos, na indústria de cosméticos e em ensaios imunológicos (BECKER, 2004; DERNER et al., 2006).

4.4 BIOCOMBUSTÍVEIS

A procura de recursos limpos que permitam assegurar as necessidades energéticas futuras constitui um dos maiores desafios da atualidade. O crescente preço dos combustíveis e o foco internacional sobre o impacto ambiental das emissões gasosas têm conduzido à procura por recursos renováveis e ao desenvolvimento de tecnologias verdes que suportem a indústria e as necessidades do mercado mundial (MATA, 2010).

Atualmente, na União Europeia, o setor dos transportes é responsável por cerca de um quarto das emissões de gases causadores do efeito de estufa, o que desperta a procura por formas de reduzir as emissões poluentes deste setor, seja por meio de veículos mais limpos e eficientes, ou por meio da utilização de biocombustíveis que permitam reduzir a dependência energética dos combustíveis fósseis. Os biocombustíveis constituem recursos não-tóxicos, biodegradáveis e renováveis, e estão associados a vantagens ambientais uma vez que permitem a redução das emissões poluentes (gases do efeito estufa), o que no panorama atual, representam alternativa energética cada vez mais explorada. Contudo, a geração de biocombustíveis atual está baseada apenas nas culturas alimentares, como canola, milho, soja, açúcar e colza, apesar de não se ter dados científicos relevantes, acredita-se que o cultivo dessas culturas para biocombustíveis podem conduzir a aumentos nos preços dos alimentos e o agravamento da desflorestação (GREENWELL, 2010).

Na busca de alternativas para fornecer energia mais sustentável, há forte entusiasmo em torno do grande potencial oferecido pelas algas como fonte energética. Neste domínio, as microalgas figuram como alternativa auspiciosa para a próxima geração de biocombustíveis, apresentando-se com considerável potencial para a produção de biocombustíveis e, em particular, de biodiesel, uma vez que têm a capacidade de duplicar sua biomassa várias vezes por dia e produzir pelo menos 15 vezes mais óleo por hectare do que as culturas alimentares concorrentes (CHISTI, 2007).

A maior parte do petróleo no mundo de hoje foi formada pela decomposição de algas que datam de há milhões de anos atrás. Este processo pode ser replicado para proporcionar à sociedade energia mais limpa, tendo unicamente como fontes de matéria-prima a luz solar, a água e dióxido de carbono, durante o processo de fotossíntese. O grande desafio atual consiste na otimização dos processos de produção e extração dos óleos e a identificação e manipulação dos recursos biológicos com maior potencial de exploração, com vistas à valorização desta potencial fonte energética (XU et al., 2006; HOSSAIN et al., 2008).

4.5 OUTRAS APLICAÇÕES

Afora as aplicações relacionadas ao emprego das microalgas e dos produtos extraídos destas na indústria de alimentos, muitos estudos vêm sendo realizados nos mais diversos campos, tais como: no tratamento de águas residuárias de inúmeros

processos industriais (CHINNASAMY et al., 2009), para a detoxificação biológica e remoção de metais pesados (MARTINS et al., 2003; RIBEIRO et al., 2010); como bioindicadores, na detecção de nutrientes (para as microalgas) e substâncias tóxicas (detergentes, efluentes industriais, herbicidas etc.) (LEMARIÉ et al., 1999). Na agricultura, a biomassa pode ser empregada como biofertilizante do solo (MEDEIROS & LOPES, 2006). Além de sintetizar toxinas, as microalgas podem produzir uma gama de moléculas bioativas com propriedades antibióticas, anticâncer, antiinflamatórias, antivirais, redutoras do colesterol, enzimáticas e com outras atividades farmacológicas (PARISI et al., 2009; SOARES, 2009). Além disso, podem ser usadas na mitigação do efeito estufa, pela assimilação do CO₂, resultado do processo de queima dos combustíveis fósseis e de práticas agrícolas impróprias (CHIU et al., 2008). Ainda, possibilitam produção de biocombustíveis (biodiesel e etanol, por exemplo) (Ueno et al., 1998; AMIN, 2009). Por fim, as microalgas são úteis a produção de hidrogênio livre, por biofotólise na elaboração de um inseticida natural, pela recombinação de uma seqüência do DNA da bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) no genoma de uma espécie de microalga, consumida pelo mosquito da malária em sua forma larval (VONSHAK, 1990).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de ser uma atividade consolidada em outros países, a produção comercial de microalgas no Brasil tem sido realizada por empresas (localizadas no litoral de Santa Catarina e de praticamente todos os estados da Região Nordeste) que produzem a biomassa e a empregam principalmente na alimentação de organismos como camarões e moluscos marinhos. Não há informações na literatura sobre a produção em grande escala para a obtenção de biomassa ou para a extração de compostos bioativos visando a outras aplicações no Brasil. Somente existem iniciativas ainda de caráter experimental em diversos centros de pesquisa e, em geral, trabalhando isoladamente.

Além das substâncias conhecidas, a quantidade de compostos de interesse comercial que podem ser obtidos das microalgas parece ser imprevisível. Em nível mundial, o crescente interesse em tecnologias limpas, sustentáveis e orgânicas, na obtenção de produtos para o consumo humano, demanda uma contínua busca por espécies e variedades capazes de sintetizar grandes quantidades de compostos

específicos e de como é possível potencializar a biossíntese destes (condições de cultivo, melhoramento genético etc.).

É evidente a necessidade de pesquisas visando ao desenvolvimento e, principalmente, ao aperfeiçoamento dos sistemas de produção em escala comercial, a fim de tornar comercialmente viáveis alguns dos sistemas conhecidos. Essas pesquisas, por fim, se fazem necessárias à identificação dos produtos que podem ser extraídos das microalgas, da possível atividade biológica (estudos metabólicos e toxicológicos) e do desenvolvimento de mercados específicos para estes.

6. REFERÊNCIAS

- ABALDE, J. **Microalgas: cultivo e aplicaciones**. España:Universidade da Coruña,. (Dissertação). 210p. 1995;
- ALINE SALETE PARISI, SALUA YOUNES, LUCIANE MARIA COLLA Avaliação da atividade antibacteriana da microalga *Spirulina platensis*, **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.. 30, n.3 2009;
- AMIN, SARMI, Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae **Energy Conversion and Management**, 50, 1834–1840, 2009;
- BAKER, R.; GUNTER, C. The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption. **Trends in Food Science & Technology**, n.15, p.484-488, 2004;
- BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. biotechnology and applied phycology. London: **Blackwell Science**, p.312-351. 2004;
- BEN-AMOTZ, A. Industrial production of microalgal cellmass and secondary products major industrial species: *Dunaliella*, **Blackwell Science**, p.273–280. 2004;
- BENEMANN, J. R., **Overview: Algae Oil to Biofuels**, National Renewable Energy Laboratory - Air Force Office of Scientific Research Workshop on Algal Oil for Jet Fuel Production - February, 2008;
- BENEMANN, J.R. CO₂ mitigation with microalgae systems. **Energy Conservation Management**, 38, S 475- 479, 1997;
- BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. (eds). **Micro-algal biotechnology**. **Cambridge University, Cambridge**, UK, 477pp. 1988;
- BOROWITZKA, M.A. Products from microalgae. **Infofish International**, v.5, p.21-26, 1993.
- BROWN, L.M. & ZEILER, K.G. Aquatic biomass and carbon dioxide trapping. **Energy Conversion and Management**, 34, p.1005-10013, 1993;
- CAMPO, J.A. et al. Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). **Journal of Biotechnology**, v.76, n.1, p.51-59, 2000;
- CERTIK, M.; SHIMIZU, S. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.87, n.1, p.1-14, 1999;
- CHINNASAMY, S.; RAMAKRISHNAN, B.; BHATNAGAR, A.; KESHAV, C. DAS Biomass Production Potential of a Wastewater Alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under Elevated Levels of CO₂ and Temperature, **Int. J. Mol. Sci.** v.10, 518-532, 2009;

CHIU, SHENG-YI; KAO, CHIEN-YA; CHEN, CHIUN-HSUN; KUAN, TANG-CHING; ONG, SEOW-CHIN; LIN, CHIH-SHENG, Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor, **Bioresource Technology**, 99 3389–3396, 2008;

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, 25: 294-306, 2007;

CRISTIANE MOTA SOARES **Estudo químico da alga *Lithothamnion calcareum* e avaliação da atividade inibitória do rolamento de leucócitos**, Dissertação apresentada ao Curso de PósGraduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG 2009;

CYSEWSKI, G.R.; LORENZ, R.T. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products – species of high potential: *Haematococcus*. **Blackwell Science**, p.281-288. 2004;

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M. DE; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v.36 n.6 Santa Maria. 2006;

DISMUKES, G CHARLES, DAMIAN CARRIERI, NICHOLAS BENNETTE, GENNADY M ANANYEY, Matthew C Posewitz. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. **Current Opinion in Biotechnology** 19 235-240. 2008;

DUARTE, I. C. S. **Influência do meio nutricional no crescimento e composição centesimal de *Chlorella* sp (Chlorophyta, Chlorococcales)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro 148 p. 2001;

DUERR, E.O.; MOLNAR, A.; SATO, V. Cultured microalgae as aquaculture feeds. **J.Mar.Biotechnology**, 7, p.65-70, 1998;

EDGE, R. et al. The carotenoids as antioxidants: a review. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, n.41, p.189-200, 1997;

FAO. Renewable biological system for alternative sustainable energy production. Serie Title: **FAO Agricultural Services Bulletins** 128, 1997.

GILL, I.; VALIVETY, R. Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications. **Trends in Biotechnology**, n.15, p.401-409, 1997;

GREENWELL, H.C., LAURENS, L.M.L., SHIELDS, R.J., LOVITT, R.W., FLYNN, K.J. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. **Journal of the Royal Society Interface**, 7:703-726, 2010;

HOEK, V. D.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. **Algae: an introduction to phycology**. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 623pp. 1995;
HOSSAIN ABMS, SALLEH A. Biodiesel fuel production from algae as renewable energy. **Am J Biochem Biotech**, 4(3):250–4. 2008;

- HOSSAIN ABMS, SALLEH A. Biodiesel fuel production from algae as renewable energy. *Am J Biochem Biotech*, 4(3):250–4. 2008;
- HUGHES, E., BENEMANN. J.R. Biological fossil CO₂ mitigation. *Energy Convers. Mgmt.*, v. 38, p. 467-473. 1997;
- IWAMOTO, H. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products major industrial species. In: Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phyecology. Blackwell Publishing, p. 255-263. 2004;
- JACOB-LOPES, L. Q.; ZEPKA, L. A. de A.; PINTO, M. I., QUEIROZ, E. Secagem da microalga *Aphanothece microscópica* Nägeli em leito de jorro, *Alim. Nutr.*, Araraquara v.17, n.4, p.387-392, 2006;
- JIANG, Y. et al. Production potential of docosahexaenoic acid by heterotrophic dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. *Process Biochemistry*, v.34, p.633-637, 1999.
- KIRK, E.A.; BEHRENS, P.W. Commercial developments in microalgal biotechnology. *Journal of Phycology*, n.35, p.215–226, 1999.
- LEMARIÉ, G., MARTIN J. L. M., DUTTO, G. and GARIDOU, C., Nitrogenous and phosphorous waste production in a flow-through land-based farm of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquat. Living Résout*, v.11 (4): 247-254. 1999;
- LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas - principios e aplicacoes**, Ed. RIMA, 1ª Ed., 2007;
- LOPEZ-ELIAS, J.A., VOLTOLINA, D., ENRIQUEZ-OCALIA, F., GALLEGOS-SIMENTAL, G Indoor and outdoor mass production of the diatom *Chaetoceros muelleri* in a Mexican commercial hatchery. *Aquacultural Engineering*, 2005;
- MARGALITH, P.Z. Production of ketocarotenoids by microalgae. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.51, p.431-438, 1999;
- MARTINS, A., DINARDI A. L.; FORMAGI, V. M.; LOPES, T. A.; BARROS, R.; CONEGLIAN, C. M. R.; BRITO, N. N.; SOBRINHO, G. D.; TONSO, S.; PELEGRINI, R. **Biorremediação com microalgas**. III Fórum de Estudos Contábeis. SP Brasil. 2003;
- MATA, T.M., MARTINS, A.A., CAETANO, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14: 217-232, 2010;
- MAYFIELD, S., **Algal Model, National Renewable Energy Laboratory** - Air Force Office of Scientific Research Workshop on Algal Oil for Jet Fuel Production - February, 2008;
- MEDEIROS, M. B. DE; LOPES, J. DA S. Biofertilizante líquidos e sustentabilidade agrícola na Bahia, *Agríc.*, v.7, n.3, nov. 2006;

- MOLINA-GRIMA, E. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnol. Adv.**, v. 20, p. 491-515, 2003;
- MOLINA-GRIMA, E.; ACIÉN, F.F.G.; GARCIA CAMACHO, F.; CHRISTI, Y. PhotobioreactorsÇ light regime, mass transfer and scaleup. **J.Biotechnol.**, 70, p. 231-247, 1999;
- MULLER-FEUGA, A. Microalgae for aquaculture. In: RICHMOND, A. (Ed). Handbook of microalgal culture: **biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, p.352–364. 2004;
- NORTON, T.A et al. Algal biodiversity. **Phycologia**, n.35, p.308–326, 1996.
- NUNES, J.M.C. **Rodofíceas marinhas bentônicas do estado da Bahia**, Brasil. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo. 2005;
- OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v.20, p. 459-466. 2003;
- OROSA, M. Production and analysis of secondary carotenoids in green algae. **Journal of Applied Phycology**, n.12, p.553-556, 1997.
- PATIL V, TRAN KQ, GISELROD HR. Toward sustainable production of biofuels from;microalgae. **Int J Mol Sci**;9:1188–95. 2008;
- PÉREZ, HOMERO E. BAÑADOS, **Biodiesel de Microalgas**. 2007 Disponível em: www.facabiodiesel.com.br, acesso em fevereiro 2011;
- PIRT, S.J. The thermodynamic efficiency (quantum demand) and dynamics of photosynthetic growth. **New Phytologist**, 102, p.3-37, 1986;
- PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.65, p.635-648, 2004.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 906 p. 2001;
- RATLEDGE, C. Microorganisms as source of polyunsaturated fatty acids. In: GUNSTONE, F.D. (Ed). **Structured and modified lipids**. New York: Marcel Dekker, 2001. p.351- 399.
- RIBEIRO R. F.L.; MAGALHÃES, S. M. S.; BARBOSA, F. A.R., NASCENTES, C. C.; CAMPOS, I. C.; MORAES, D. C. Evaluation of the potential of microalgae *Microcystis novacekii* in the removal of Pb²⁺ from an aqueous medium, **Journal of Hazardous Materials**, v.79, Is. 1-3, 15, 947-953, 2010;
- RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Black Well Science, 2004;

- ROBLES MEDINA, A. et al. Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids. *Biotechnology Advances*, v.16, n.13, p.517-580, 1998;
- ROCHA, J. M. S.; GARCIA, J. E. C.; HENRIQUES, M. H. F. Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. ***Biomolecular Engineering***, 20: 237-242. 2003;
- RODOLFI L, CHINI ZITTELLI G, BARSANTI L, ROSATI G, TREDICI MR. Growth medium recycling in *Nannochloropsis* sp. mass cultivation. ***Biomol Eng*** 20:243–248. 2003;
- RODOLFI L, ZITTELLI GC, BASSI N, PADOVANI G, BIONDI N, BONINI G, Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. ***Biotechnology and Bioengineering*** 102(1):100–12. 2009;
- SANCHES MIRÓN, A.; CERÓN GARCIA, M-C; CONTRERAS GÓMEZ, A.; GARCIA CAMACHO, F.; MOLINA GRIMA, E.; CHRISTI, Y. Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. ***Biochem.Eng. J.***,16, p. 287-297, 2003;
- SAWAYAMA S, INOUE S, DOTE Y, YOKOYAMA S. CO₂ fixation and oil production through microalga. ***Energy Convers Manage***, 36(6–9):729–31. 1995;
- SILVA, F.C. Cultivo de microalgas marinhas. *Aqüicultura: experiências brasileiras. Florianópolis: Multitarefa*, p.93-120. 2003;
- SKULBERG, O.M. Bioactive chemicals in microalgae. ***Blackwell Science***, p.485-512. 2004.
- TEIXEIRA, V.L. Produtos naturais marinhos. In: PEREIRA, R.G.; SOARES-GOMES, A. (Orgs). ***Biologia marinha***. Rio de Janeiro: Interciência, 2002. p.249-279.
- THOMAS, M. L. H., D.C. ARNOLD AND A. R. A. TAYLOR. Rocky intertidal communities. *Marine and Coastal Systems of the Quoddy Region, New Brunswick* (ed.: M.L.H. Thomas). ***Can. Spec Publ. Fish and Aquat. Sci.***, Vol. 64:35-73. 1983;
- THOMAS, R.J., BEHRINGER, F.J., LOMBARD, C.S., SPARKOWSKI, J.J., Effects of auxin on wall polysaccharide composition and enzyme activity during extension-growth of *Pellia* (Bryophyta). ***Physiologia Plantarum*** 60, 502–506. 1984;
- TRIPATHI, U. et al. Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media. ***Bioresource Technology***, n.68, p.197-199, 1999;
- UENO Y, KURANO N, MIYACHI S. Ethanol production by dark fermentation in the marine green alga, *Chlorococcum littorale*. ***J Ferment Bioeng***, 86(1): 38–43. 1998;
- VICHEZ, C.; GARBAYO, I.; LOBATO M. V.; VEGA, J. M. – Microalgae-mediated chemicals production and waste removal. ***Enzyme Microbial Technology***, 20, 562-72, 1997;

- VONSHAK A. Recent advances in microalgal biotechnology. **Biotech Adv**, 8:709–27. 1990;
- XU H, MIAO X, WU Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **J Biotech**, 126:499–507. 2006;
- YEHUDA S, RABINOVITZ S, CARASSO RL, MOSTOFISKY DI. The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. **Neurobiol Aging**. 23(5):843-53. 2002;
- YONGMANITCHAI, W.; WARD, O.P. Screening of algae for potential alternative sources of eicosapentaenoic acid. *Phytochemistry*, v.9, n.30, p.2963-2967, 1991;
- YOUDIM KA, MARTIN A, JOSEPH JA. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. **Int J Dev Neurosci**. 18(4/5):383-99. 2000;
- WELLINGER, A., Algal Biomass Does it save the world? Short reflections - IEA Bioenergy: **An international Collaboration in Bioenergy**. Abril, 2009;
- WEN, Z.Y; CHEN, F. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. **Biotechnology Advances**, v.21, p.273-294, 2003.
- WILLIAMS, P.J. LE B., THOMAS, D.N., REYNOLDS, C.S. Phytoplankton productivity: carbon assimilation in marine and freshwater ecosystems. **Blackwell Science**. 386p. 2002;
- WYNNE, M.J. A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic: second revision. Ed. J. Cramer, Berlin, **Nova Hedwigia**, 129, p:1-152. 2005;

**ARTIGO II: AS MICROALGAS COMO ALTERNATIVA À PRODUÇÃO DE
BIOCOMBUSTÍVEIS**

AS MICROALGAS COMO ALTERNATIVA À PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS

RESUMO

As culturas de microalgas podem ser usadas para capturar e utilizar o CO₂ emitido por usinas termoelétricas ou por outras fontes. A mitigação das emissões de gases de efeito estufa (GEE) resulta da conversão da biomassa colhida das microalgas em biocombustíveis renováveis, tais como o biodiesel e outros produtos de substituição dos combustíveis fósseis. As microalgas são usualmente cultivadas em grandes tanques com agitação promovida por pás rotativas. Seu crescimento ocorre em suspensão na água quando são fornecidos todos os nutrientes necessários e, numa velocidade maior, quando há o fornecimento adequado de CO₂. As microalgas podem ser convertidas em biocombustíveis e em outros co-produtos, de forma renovável, reduzindo o uso de combustíveis fósseis. Comparadas a outras opções biológicas para a captura e a utilização do CO₂, as culturas de microalgas têm como principais vantagens: potencial em conseguir alta produtividade, habilidade para capturar nutrientes das águas residuárias, das fontes de água salgadas e salobras (não apropriadas para outros usos) e sua elevada eficiência no uso da água. As microalgas são uma atrativa alternativa às oleaginosas como soja, milho e palma. Isso por causa da sua elevada densidade de lipídios, que faz com que elas possam produzir mais óleo por hectare. Já que as microalgas podem ser cultivadas em uma instalação industrial, requerendo área muito menor e não exigindo fertilidade de solo. Surge com possibilidade de substituição às matérias primas atualmente avaliada para a produção de biocombustíveis, o que vem sendo criticado por proporcionar a competição com a produção de alimentos. Nesta revisão buscou-se apresentar algumas atualizações sobre o potencial do cultivo de microalgas para a produção dos biocombustíveis.

Palavras-chave: microalgas; biocombustíveis; alternativa energética; biodiesel.

MICROALGAE AS AN ALTERNATIVE FOR PRODUCTION OF BIOFUELS

ABSTRACT

The cultures of microalgae can be used to capture and use the CO₂ emitted by thermoelectric or other sources. The mitigation of emissions of greenhouse effect gases (GEGs) resulting from the conversion of biomass harvested from microalgae in renewable biofuels such as biodiesel and other substitutes for fossil fuels. The microalgae are usually cultivated in large tanks with agitation produced by rotating blades. It multiplies in hanging water when it is provided all the necessary nutrients and in a higher speed when, with the CO₂. The microalgae can be converted into biofuel and other co-products in a renewable way, reducing the use of fossil fuels. Compared to other biological options for the capture and use of CO₂, the cultures of microalgae have as main advantages: the potential to achieve high productivity, ability to capture nutrients from wastewater, waste utilization, sources of salt and brackish water (not suitable for other uses) and its high efficiency in water use. Microalgae are an attractive alternative to oilseeds such as soybeans, corn and palm. This is caused by its high density of lipids, which make that they can produce more oil per hectare. Since microalgae can be cultivated in industrial areas, requiring much less area and do not demanding soil fertility. It appears as a possibility of replacing the raw materials currently in vogue for biofuels, which has been criticized for competing with food production. This review aimed to provide some updates about the potential cultivation of microalgae for biofuel production.

Keywords: microalgae; biofuels, alternative energy, biodiesel

1. INTRODUÇÃO

A primeira menção ao uso de algas para a produção de biocombustíveis ocorreu em 1950, no MIT. Entre 1980 a 1995, o Departamento de Energia dos Estados Unidos (*United States Department of Energy*) e o Laboratório Nacional de Energias Renováveis (*National Renewable Energy Laboratory - NREL*) desenvolveram o Algae Species Program (ASP) (BENEMANN, 2008), até hoje considerado um marco referente ao assunto. O cultivo de algas vem apresentando uma série de modalidades e o de alta densidade de microalgas com elevado teor de óleo, em larga escala, parece ser o que mais exigiria inovações tecnológicas para obtenção da produtividade satisfatória. Pesquisadores (CHISTI, 2007; BENEMANN, 2008; MATA et al., 2010) e instituições (*International Energy Agency*, 2007; *European Environmental Agency*, 2007) *Renewable Fuel Agency*, 2008) envolvidas nas áreas afins, ao considerarem as conquistas recentes da biotecnologia (engenharia metabólica, genômica, proteômica, nutrigenômica, bioinformática, desenho de bioreatores etc.), assinalam que o cultivo de alta densidade será viável, em pouco tempo. Em vários experimentos foram verificados o potencial de produtividade em biomassa e teor de óleo, independentemente do uso energético das algas. Até fevereiro de 2008 foram identificadas e caracterizadas algumas espécies selvagens de algas que apresentam grande potencial nestes quesitos. Alguns destes genomas foram seqüenciados, sendo obtidas cepas geneticamente modificadas (MAYFIELD, 2008) para serem cultivadas apenas em pequena escala. Para desenvolver o cultivo em larga escala torna-se importante isolar e caracterizar outras espécies, além de aprimorar características específicas que venham a proporcionar aumento no potencial da microalga como matéria prima para a produção do biodiesel. Paralelamente, é necessário desenvolver novos métodos, processos para colheita, extração e conversão do óleo.

São muitos os desafios para a produção em larga escala e a escolha do processo de cultivo de algas, o que dependerá do fomento e do interesse de instituições públicas e privadas no tema. A opção, por exemplo, de implantar o cultivo comercial de microalgas de origem marinha em áreas em processo de desertificação, como no semi-árido do Brasil, distante do litoral, permitirá reduzir os índices de contaminação, seja por outras microalgas estuarinas, marinha e hipersalinas, seja por espécies continentais, que não sobrevivem em água salina.

O diferencial da aqüicultura de microalgas em larga escala no Brasil está na localização geográfica (próxima ao Equador), que possibilita a irradiação solar em

níveis excelentes, na mesma região dos aquíferos salinos, cuja outorga não se encontre conflitante com outros usos (MELO, 2010). Os recursos naturais e humanos, a experiência dos pesquisadores, o estado da arte das pesquisas com microalgas, incluindo algumas cepas já sequenciadas ou em processo de finalização e a diversidade das espécies endógenas com potencial para produção de altos teores de lipídios são outros elementos importantes. A estes podem ser, ainda, associadas a capacidade de desenvolver sistemas de cultivo tecnologicamente avançados, com alto desempenho e baixo custo e a existência de uma infra-estrutura logística.

Neste contexto, faz-se necessário o desenvolvimento de rotas tecnológicas de conversão do óleo extraído para os biocombustíveis. Contudo, nesta revisão apresenta-se uma atualização sobre a produção de microalgas e considerações sobre o potencial de aplicação do óleo de microalgas na fabricação dos biocombustíveis.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Produção de microalgas

As algas usam a energia do sol para converter água e CO₂ em biomassa. São organismos fotossintetizantes que utilizam o ambiente aquático para se desenvolverem. Atualmente, mais de 150 espécies são usadas comercialmente para prover alimentos aos seres humanos e animais, servir como agentes espessantes em sorvetes e eliminar doenças sob a forma de remédios. As microalgas geralmente não chegam a 2 mm de diâmetro e é, atualmente, o organismo fotossintético mais promissor para os biocombustíveis, pois comparado com as macroalgas, apresentam estrutura menos complexa, maior taxa de crescimento e, em algumas espécies, alto teor de óleo (MATA et al., 2009). No entanto, existem algumas desvantagens (AMIN et al., 2009):

- Elevado custo de produção da matéria-prima;
- Se forem usados fotobiorreatores fechados, os custos de implantação são extremamente altos;
- Os sistemas de reservatórios abertos podem ser usados, com queda drástica de rendimento, e com significativa redução de produtividade de biomassa;
- Algas geneticamente modificadas podem ser mais estáveis, mas os riscos ambientais são extremamente altos (poluição e destruição da biodiversidade nas águas e rios).

Muitos estudos já foram realizados para a produção de biodiesel a partir de microalgas, mas não conseguiram superar as dificuldades e não evoluíram. Entretanto, pesquisas recentes já começam a dar resultados, embora ainda esteja distante qualquer iniciativa para a produção em larga escala. A empresa Valcent Products Inc. desenvolveu biorreatores verticais de alta densidade para produção de microalgas. Esse sistema é planejado para trabalhar em circuito fechado e usar pouca energia e água (NOGUEIRA, 2010). Nos testes realizados, os rendimentos foram de 150.000 galões/acre/ano (cerca de 1,5 milhões de litros/ha/ano). O custo de produção foi de 13 centavos de dólar/L. As microalgas são potencialmente adequadas para a produção de combustíveis; entretanto, os dados de laboratório sobre essa produção são limitados (TEIXEIRA & MORALES, 2007). O crescimento fotossintético requer luz, CO₂, água e sais inorgânicos. A temperatura deve permanecer em torno de 20 a 30 °C. Para minimizar os custos da produção de biodiesel, o cultivo de microalgas apresenta várias características:

- custo relativamente baixo para a colheita e transporte (FAO, 1997) e menor consumo de água (SHEEHAN et al., 1998), comparados aos de cultivo de plantas;
- pode ser realizado em condições não adequadas para a produção de culturas convencionais (FAO, 1997);
- as microalgas apresentam maior eficiência fotossintética que os vegetais superiores e podem ser cultivadas em meio salino simples (PIRT, 1986); e,
- são excelentes fixadoras de CO₂ (BROWN & ZEILER, 1993).

O meio de crescimento das microalgas deve prover elementos inorgânicos que constituem a célula algal. Elementos essenciais incluem: nitrogênio, fósforo, potássio, ferro, magnésio e, em alguns casos, silício, além de elementos em pequenas concentração (na condição de micronutrientes), tais como molibdênio, boro, dentre outros. Água do mar suplementada com nitrato comercial e fertilizantes com fosfato e alguns outros micronutrientes é comumente utilizada para o crescimento de microalgas marinhas (MOLINA GRIMA et al., 1999). Os meios de cultivo correspondem a 30 % do custo de produção segundo Molina-Grima (2003), no seu trabalho sobre análise econômica da produção de biodiesel de microalgas. A biomassa microalgal contém aproximadamente 50% de carbono em peso seco (SANCHEZ MIRÓN et al., 2003), em que a principal fonte provém do CO₂. A produção de 100 t de biomassa algal fixa em

torno de 183 t de CO₂. A produção de biodiesel pode potencialmente usar parte do CO₂ que é liberado pelas plantas superiores ou por combustão de óleos fósseis (YUN et al., 1997). Este CO₂ está muitas vezes disponível com pequeno ou nenhum custo.

Unidades de produção de biomassa algal em grande escala geralmente utilizam culturas contínuas, usando o sol com fonte de energia. Neste método de operação, um novo meio de cultura é oferecido numa taxa constante e a uma mesma quantidade de cultura algal (MOLINA GRIMA et al., 1999). Estudos recentes mostraram que, no caso das microalgas com 50% de sua massa seca em óleo, somente 0,3% da área cultivada nos Estados Unidos poderiam ser utilizadas para produzir biodiesel suficiente para repor todo o combustível usado em transporte (BENEMANN, 2008). Além disso, a terra utilizada para o cultivo de microalgas pode ser desértica, com baixo valor econômico para outros usos e com alta irradiação solar e que, neste cultivo, podem ser utilizados resíduos de outras produções, como o CO₂ de processos industriais, além de resíduos orgânicos (VICHEZ et al., 1997). Em relação ao rendimento em óleo, o de microalgas é pelo menos quinze vezes maior que o da palma, que é a planta que proporciona a maior produtividade por meios convencionais (SCHENK, 2008). Existe estimativa de produção de óleo de microalgas de (15000 a 30000) L km⁻² (BENEMANN, 2008). Os teores de lipídios e triglicerídios (TG) dependem das condições das culturas, sendo que, na década de 1940, foram relatados percentuais bastante elevados, de (70 a 85)% (FAO, 1997). Na Tabela 1 é possível observar algumas microalgas promissoras como matéria-prima para a produção de biodiesel, graças ao seu potencial na produção de lipídios. Em relação à *Dunaliella*, dos lipídios produzidos pelas células, obteve-se até 57% como TG- molécula de partida para a produção do biodiesel (TAKAGI et al., 2006). No caso de algumas microalgas ali inseridas, o percentual de lipídio é baixo, porém estudos mostram que este valor pode ser aumentado (TEIXEIRA & MORALES, 2006; ILLMAN et al., 2000). Com base em diversos relatórios disponíveis, Sing & Gu (2010), relataram que, atualmente, os custos de produção do biodiesel de algas encontra-se entre (9 a 25) Reais por galão, em tanques agitados, e de (15 a 40) Reais em fotobiorreatores. Esses valores incluem todo o sistema de produção que é complexo nos dias atuais, composto por vários subconjuntos de sistemas (isto é, produção, separação, extração, secagem e montagem dos sistemas), sendo que uma redução nas etapas de produção reduziria também os custos (SING & GU, 2010).

Tabela 1 - Espécies de microalgas promissoras à produção de biodiesel (TAKAGI et al., 2006).

Teor de óleo de espécies selecionadas	
Espécies	Volume de óleo % massa seca
<i>Ankistrodesmus</i> TR-87	28 – 40
<i>Botryococcus Braunii</i>	29 – 75
<i>Chlorella</i> sp.	29
<i>Chlorella protothecoides</i> (autotrófica / heterotrófica)	15 -55
<i>Cyclotella</i> DI-35	42
<i>Dunallella tertholecta</i>	36 – 42
<i>Hantzschia</i> DI-160	66
<i>Isochrysis</i> sp.	7 – 33
<i>Nannociors</i>	31
	(6 -63)
<i>Nannochicropsis</i>	46
	(31 – 68)
<i>Nitzschia</i> TR-114	28 – 50
<i>Phaeodactylum tricomutum</i>	45
<i>Scenedesmus</i> TR-84	33
	(9 – 59)
<i>Sticnococcus</i>	31
<i>Tetraseimis suecica</i>	15 – 32
<i>Thaiassiosira pseudonana</i>	21 – 31

2.2. Cadeia de biocombustíveis baseada em microalgas

A colheita da biomassa das microalgas não segue regime de safras. Desta forma, esta pode ser realizada diariamente, pois tem um tempo de geração de poucas horas, o que permite processos de produção contínuo. Não são necessárias áreas aráveis ou água potável, não competindo, portanto, com a agricultura, animais ou pessoas pela sua outorga. A biofixação de CO₂ é outra característica deste cultivo, tornando neutro em carbono o biocombustível de óleo das microalgas. Após a colheita e extração do óleo, os meios de cultura são diretamente reaproveitados ou reciclados, os resíduos usados na produção de biogás por digestão anaeróbica e posterior co-geração de energia elétrica, para uso no próprio processo de cultivo, utilizando-se o CO₂ gerado pela combustão do biogás na aquicultura das próprias microalgas, de forma a incrementar seu crescimento. Este potencial de reaproveitamento pode ser incorporado às outras receitas, como comercialização dos biocombustíveis, dos subprodutos da biomassa e da biodigestão.

O modelo da cadeia produtiva proposta AZEVEDO et al. (2008) baseia-se no encadeamento dos setores responsáveis por cada etapa do processo (Figura 1). Esta

configuração pressupõe eficácia do balanço energético, reciclagem contínua dos meios de cultura, escoamento da produção e aproveitamento do metano como fonte para produção de energia elétrica juntamente com os resíduos de biomassa.

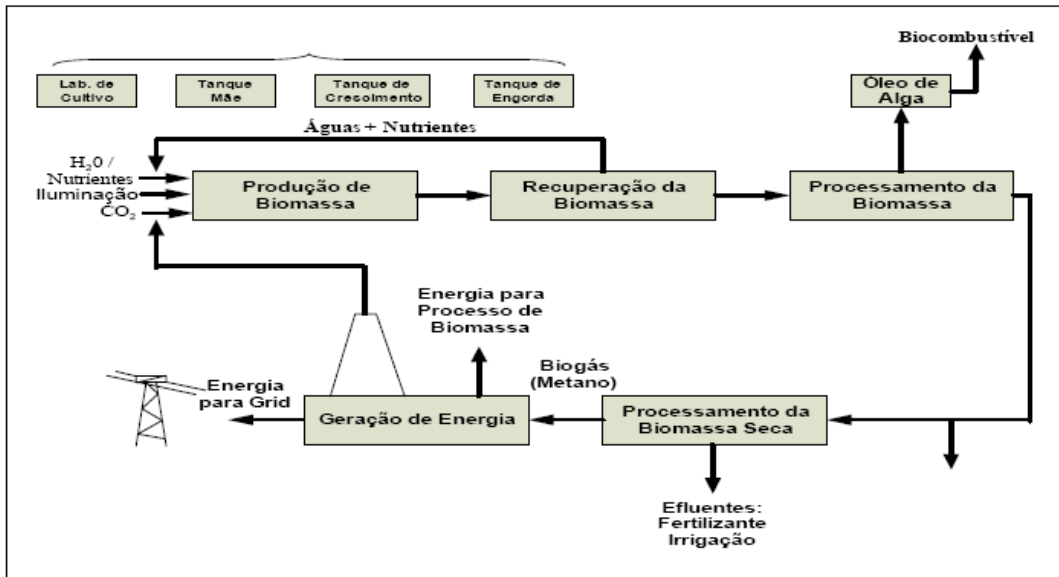


Figura 1 - Esquema simplificado do cultivo de microalga e a reciclagem e uso de subprodutos.

Fonte: AZEVEDO et al. (2008).

A eficiência de conversão da energia solar em energia química na maioria das espécies vegetais é baixa, sendo a cana-de-açúcar a que apresenta maior eficiência de conversão (CANTRELL, 2008). É relevante a diferença da produção de biodiesel a partir das microalgas em relação às outras plantas, tal como está mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Exemplos de produção de biodiesel utilizando-se biomassas diversas (MAYFIELD, 2008)

Comparação entre eficiências de colheitas			
Fonte de Planta	Biodiesel (L/ha/ano)	Área requerida para equiparar atual demanda global de óleo (milhões hectares)	Área requerida como percentagem de grandeza de terra global
Soja	446	10932	72,9
Colza	1190	4097	27,3
Mustarda	1300	3750	25
Jatropha	1892	2577	17,2
Oléo de palma	5950	819	5,5
Alga	45000	108	0,7

O óleo das microalgas deve, no entanto, passar por um processo específico de conversão para cada tipo de biocombustível pretendido. Para a produção comercial é preciso viabilizar o cultivo em larga escala de espécies de microalgas que acumulem o máximo de lipídios. Por meio do manejo das condições de cultivo (nutrientes, por exemplo), diversas espécies podem ser induzidas a sintetizar e acumular altas concentrações das biomoléculas de interesse para a produção de cada combustível pretendido. Para a produção de biocombustíveis, o lipídio de interesse corresponde ao Triacilglicerol ou Triacilglicerídeo, um tri-éster oriundo da combinação do glicerol com ácidos graxos (ácidos carboxílicos de longa cadeia alquílica), tais como palmitico, oléico e alfa-linolênico.

2.3. Cultivo de microalgas para produção de biodiesel

Assim como as plantas, as microalgas requerem três componentes para crescer: luz, CO₂ e água. A fotossíntese é um processo bioquímico por meio do qual as plantas, as microalgas e alguns tipos de bactérias convertem a energia fornecida pela luz solar em energia química. Esta energia é utilizada em reações que levam à formação dos açúcares ou à fixação do nitrogênio nos aminoácidos (os blocos fundamentais para a síntese das proteínas) (HOEK et al., 1995; RAVEN et al., 2001).

Estes organismos podem ser cultivados em diversos sistemas de produção, com seu volume variando desde poucos litros até bilhões deles. Os sistemas comumente empregados são pouco sofisticados, por ocorrerem a céu aberto, sob condições naturais de iluminação e temperatura, e com baixo ou nenhum controle sobre essas variáveis ambientais (MOLINA GRIMA, 2003). Encontrar espécies de microalgas aptas para crescerem não é tarefa muito difícil entretanto, cultivar espécies específicas de microalgas para a produção de biodiesel não é algo fácil, já que elas possuem características igualmente específicas e exigem muitos cuidados especiais, como por exemplo, evitar a contaminação por espécies de microalgas indesejáveis que estejam presentes no meio de cultivo, já que as microalgas necessitam de luz, CO₂ e água para o seu crescimento e elas podem ser cultivadas em reservatórios abertos.

O principal problema no cultivo de microalgas em sistemas abertos é que as espécies com conteúdo mais elevado de óleo não são necessariamente as mais rápidas para se reproduzir. E exatamente por estes sistemas serem abertos, elas se tornam muito mais vulneráveis à contaminação por outras espécies de microalgas e bactérias, com a possível exceção da espirulina (que cresce em um meio agressivo e sob pH extremamente elevado, eliminando, desse modo, a possibilidade da contaminação por outras espécies) (VOLKMANN et al., 2008; WELLINGER, 2009).

Por esta razão, o número de espécies que têm sido cultivadas com sucesso, para dada finalidade, em um sistema aberto, é relativamente pequeno. Além disso, em sistemas abertos, há menor controle sobre a temperatura da água, a concentração de CO₂ e as condições de iluminação. Isto faz com que a estação de crescimento seja muito dependente da localização geográfica e, com exceção das áreas tropicais, seja limitada apenas aos meses mais quentes. Se por um lado tem-se essas desvantagens com utilização de sistemas “abertos”, por outro lado tem-se como vantagem o seu baixo custo de implantação (BRENNAN & OWENDE, 2009). No sistema mais básico, há somente a necessidade de escavar uma trincheira ou a formação de pequena lagoa.

A configuração e as características operacionais dos tanques variam de acordo com o espaço, volume, aplicação, custos e localização. Por exemplo, na Figura 2, é mostrado um cultivo de microalgas para alimentação de larvas de caranguejo (larvicultura). Os tanques para produção de microalgas para larvicultura são de material plástico, circulares, com capacidade de 500 L e mantidos em ambiente fechado com iluminação artificial. A agitação é feita por meio de borbulhamento de ar atmosférico, o que é realizado por um compressor de ar (GIA, 2008).



Figura 2 - Cultivo de microalgas em tanques; produção de *Nannochloropsis oculata* em ambiente fechado.

Fonte: Soares, (2010).

Nas Figuras 3A e 3B estão mostrados outros exemplos de reservatórios, com configuração diferente das dos tanques apresentados na Figura 3. Esses reservatórios são retangulares, conectados entre si, mantidas em ambiente aberto com iluminação natural, e a agitação é feita por meio de um misturador de pás. A Earthrise Nutritionals, localizada no deserto de Sonora, no sudeste da Califórnia (EUA), possuindo 30 lagoas de 5.000 m² cada, e é, atualmente, a maior produtora de *Spirulina* sp. do mundo. A biomassa de *Spirulina* produzida é vendida para suplementação alimentar. A Cyanotech, localizada no Hawaii (EUA), produz biomassa de *Spirulina* e astaxantina, que é um poderoso antioxidante derivado da biomassa da microalga *Haematococcus pluvialis* (SPOLAORE et al., 2006; CYANOTECH, 2008; EARTHRISE, 2008).

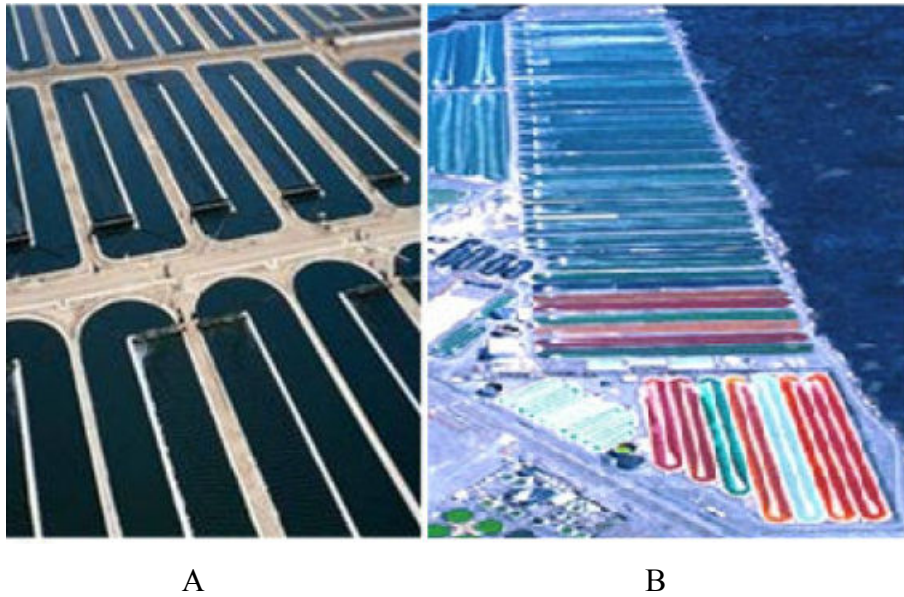


Figura 3: (A) Produção de *Spirulina* sp. na Califórnia (EUA); (B) Produção de *Spirulina* sp. e *Haematococcus pluvialis* no Hawaii (EUA).
 Fonte: (A) EARTHRISE; (B) CYANOTECH; (2008).

Os tanques onde as microalgas são cultivadas são usualmente denominados de “tanque tipo pista de corrida” (raceway ponds) (Figura 4). Nelas, as microalgas, a água e os nutrientes circulam constantemente. A circulação e a agitação são realizadas por meio de rodas de pás que garantem a mistura e a suspensão das microalgas na água. O nível da água dos tanques é mantida em no máximo 30 cm, uma vez que em profundidades superiores a luz não incide nas células de forma adequada. A operação dos tanques é realizada de forma contínua, com o CO₂ e os nutrientes sendo constantemente fornecidos, enquanto a água rica em microalgas é removida no lado oposto da estrutura (BRENNAN & OWENDE, 2009).

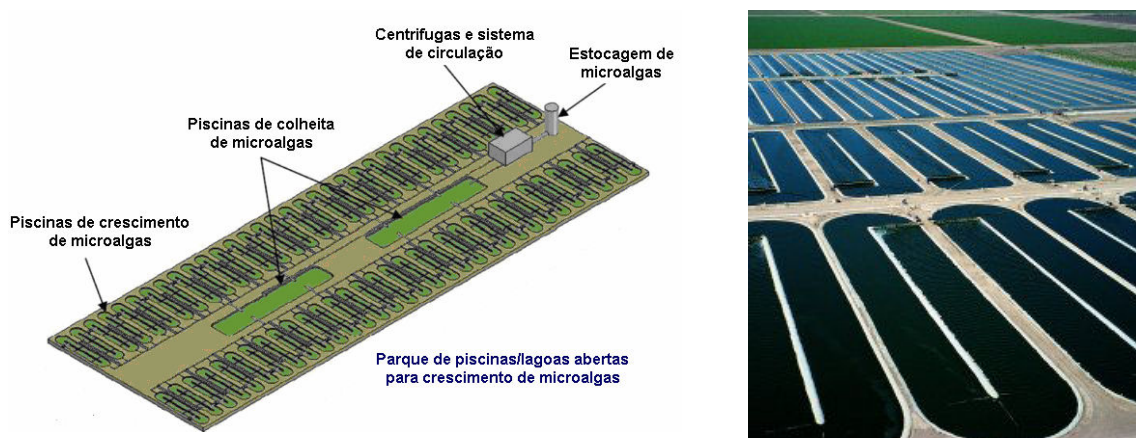


Figura 4: Parque de reservatórios abertas do tipo “pista de corrida” (raceway ponds).
 Fonte: PÉREZ (2007).

Uma variação possível no sistema básico aberto é cobrir a superfície dos reservatórios com uma estufa (Figura 5). Isto minimiza parte dos problemas associados a esse tipo de sistema, permitindo maior número de espécies cultivadas. É possível ainda, maior controle sobre as espécies cultivadas, podendo ser utilizada a estação de crescimento com a estrutura aquecida (aquecendo-a, pode-se produzir durante todo o ano). Nestes sistemas semi-abertos é possível aumentar a produtividade de algas introduzindo CO₂ no ambiente da estufa, tornando maior a velocidade de crescimento das microalgas (WELLINGER, 2009).

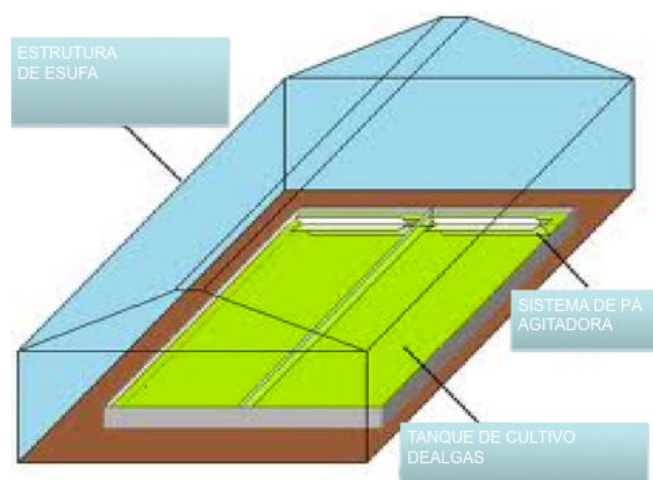


Figura 5: Esquema de produção em tanque coberto
Fonte: MELO (2010).

2.4. Fotobiorreatores

Com o objetivo de alcançar produtividade em biomassa algal monoespecífica e maior, alguns cultivos têm sido desenvolvidos em um equipamento específico chamado fotobiorreator. Estes cultivos são realizados em sistemas fechados construídos com tubos de plástico, vidro ou policarbonato (Figura 6A, 6B, 6C).

Um fotobiorreator consiste basicamente em um bioreator que incorpora algum tipo de fonte de luz. O fotobiorreator é, geralmente, o termo mais empregado para definir um sistema fechado, ao contrário de um tanque aberto. Um tanque coberto com uma estufa também poderia ser considerado um fotobiorreator. Dado que estes sistemas são fechados, é necessário introduzir as fontes necessárias para o crescimento de microalgas necessitam: CO₂, água, luz e nutrientes (WELLINGER, 2009).

Nos fotobiorreatores, é possível controlar condições de cultivo como quantidade dos nutrientes, temperatura, iluminação, pH, dentre outros. Isto implica em, elevada produtividade, viabilizando assim, a obtenção de produções comerciais (BRENNAN & OWENDE, 2009).

Os custos de ajuste e operação de um fotobiorreator são mais elevados do que os de tanques abertos, mas a eficiência e os rendimentos em óleo são significativamente maiores. Assim, o impacto do custo inicial pode ser amortizado, em médio ou longo prazos, com o funcionamento do sistema (MOLINA GRIMA, 2003).

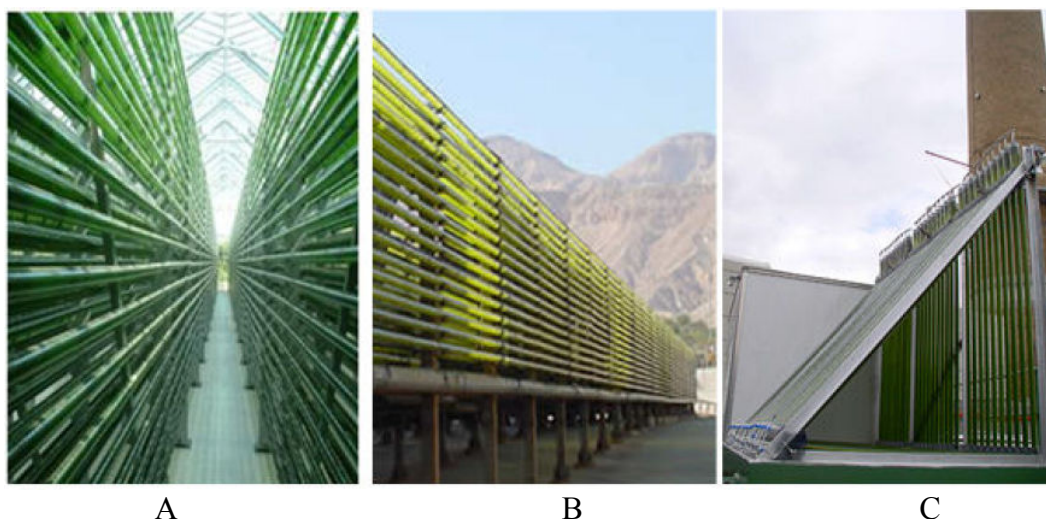


Figura 6: Cultivo de microalgas em fotobiorreatores; (A) Produção de Chlorella em fotobiorreator em casa de vegetação na Alemanha; (B) Cultivo em fotobiorreator industrial ao ar livre em Israel; (C) Cultivo experimental em fotobiorreator no MIT FONTE: (A) PULZ E GROSS (2004); (B) ALGATECH (2008); (C) TECHNOLOGY (2008).

O fotobioreator pode ser operado para recolher as microalgas produzidas de forma contínua ou em batelada. Um fotobioreator operado dessa segunda forma é carregado, inicialmente com nutrientes e com um pequeno volume concentrado microalgas (inóculo), que geralmente corresponde a 10 % do volume do fotobioreator. Após a adição do inóculo e dos nutrientes, o fotobiorreator opera até o fim da batelada, quando é realizada então a colheita das microalgas (Figura 7). Operando de forma contínua, a colheita de microalgas é realizada com uma frequência elevada, determinada pelas variáveis de operação do fotobioreator (WELLINGER, 2009).



Figura 7: Colheita de microalgas produzidas no fotobioreator.
Fonte: Pérez, (2007).

2.5. Exemplo de utilização de fotobioreator em teste de campo

A empresa GreenFuel Technologies, localizada em Cambridge, nos Estados Unidos, realizou testes de campo utilizando um fotobioreator que usa 13 % dos gases de exaustão emitidos pela usina termoelétrica (co-geração) do MIT (Massachusetts Institute of Technology) para alimentar as microalgas (Figura 8). Um primeiro resultado foi a redução significativa da concentração do monóxido de carbono (CO) na exaustão, sendo esta da ordem de 82,3% em dias ensolarados e de 50,1% em dias nublados. O processo removeu também 85,9% de óxidos de nitrogênio (GREENFUEL, 2009).

Com utilização de tecnologia licenciada a partir de um projeto da NASA, a GreenFuel construiu fotobioreatores de forma triangular, usando tubos de policarbonato de 2 a 3 m de comprimento e de 10 a 20 cm de diâmetro. A hipotenusa deste triângulo foi posicionada na direção do sol.

Os gases são introduzidos na base do triângulo e ascendem em direção ao topo enquanto a suspensão (água, microalgas e nutrientes) circulou no sentido oposto. O uso

dos tubos em que as microalgas cresceram superou a limitação usual da área útil da superfície dos reservatórios. Neste caso, a mistura no tubo sob regime turbulento da suspensão de microalgas com o CO e a velocidade na qual o líquido circulou determinaram a taxa de crescimento das microalgas.



Figura 8: Cultivo experimental em fotobiorreator no MIT.
Fonte: TECHNOLOGY (2008).

2.6. Extração de óleo das microalgas

Para o emprego na elaboração de alimentos, bem como para a extração de alguma substância de interesse, é necessário primeiramente separar a biomassa do meio de cultura. O processo envolve uma ou mais operações de separação sólido-líquido, como floculação, centrifugação e filtração, por exemplo (PÉREZ, 2007). Em seguida, a biomassa segue para a operação de secagem que é comumente utilizada para prolongar a vida útil das biomassas. Essa etapa pode constituir até 30% do custo total de produção (DUARTE, 2009), para tanto, podem ser empregadas diversas técnicas como *spray dryer*, liofilização, secagem ao sol e secagem convectiva. Para a extração dos

compostos, as células das microalgas são quebradas, podendo-se empregar métodos de homogeneização, ultra-som, choque osmótico, solventes, enzimas, dentre outros. A extração do óleo das microalgas é um tópico polêmico, atualmente debatido em virtude de seu alto custo e pode determinar a sustentabilidade do biodiesel de microalgas (PÉREZ, 2007). De acordo com este autor, há 4 métodos bem conhecidos para extrair o óleo das sementes oleaginosas e estes métodos também podem ser aplicados às microalgas:

1. Extração por solventes: o óleo de microalgas pode ser extraído usando produtos químicos como benzeno e o éter etílico; entretanto, um produto químico popular para a extração por solvente é o n-hexano, que é relativamente barato, apesar de ser um produto não renovável e tóxico. A desvantagem do uso de solventes para a extração do óleo são os perigos envolvidos na manipulação dos produtos químicos desta classe. O benzeno é classificado como cancerígeno, tendo sido banido pelo Ministério do Trabalho do Brasil. A extração com hexano pode ser usado isoladamente ou em conjunto com outros solventes como etanol que extrai ácidos graxos purificados. Deve-se conhecer a relação exata de etanol a ser utilizado, uma vez, que este solvente extrai alguns contaminantes celulares, tais como açúcares, aminoácidos, sais hidrofóbicos e pigmentos (RICHMOND, 2004). Depois que o óleo foi extraído, a polpa restante pode ser misturada com ciclohexano para extrair o óleo remanescente. O óleo dissolve-se em ciclohexano, e a polpa é filtrada da solução. O óleo e o ciclohexano são separados por destilação. Estes 2 estágios (prensagem e extração por solvente) podem extrair mais de 95%, em massa, do total de óleo contido nas microalgas (HOSSAIN, 2008).

2. Extração fluída supercrítica: este método pode extrair quase 100% de todo o óleo. Entretanto, necessita-se de equipamento especial para o confinamento e a aplicação de pressão. Neste processo, é utilizado CO₂ liquefeito sob pressão e aquecido na condição supercrítica. Neste ponto, o fluido apresenta propriedade de extração elevada para a extração do óleo (CRAVOTTO, 2008).

3. Extração enzimática: A extração enzimática de óleos vegetais, principalmente para aumentar o rendimento de obtenção de óleo, fornece resultados promissores quando aplicada simultaneamente com processos puramente mecânicos (GOMES, 2002). Trabalhos de utilização de enzimas no processamento de oleaginosas têm sido publicados (SHANKAR et al., 1997; HANMOUNGJAI et al., 2001). A partir das observações feitas sobre a acumulação do óleo nos espaços intracelulares em células vegetais, os pesquisadores têm estudado substâncias capazes de afetar a estrutura das

células com objetivo de melhorar a extração de óleo, mas a aplicação de um tratamento enzimático requer uma estratégia específica para cada caso esse processo usa enzimas para degradar a parede celular da microalga, facilitando o fracionamento do óleo. O processo é de maior custo quando comparado com a extração com hexano (FUÁ et al., 2010).

4. Choque osmótico: é uma redução repentina na pressão osmótica, que pode causar a ruptura das paredes das células das microalgas em solução. O choque osmótico é usado para liberar componentes celulares, tais como o óleo. No entanto, para obtenção de melhores resultados na extração de óleo, faz-se necessário incluir uma etapa posterior com uso de solvente (MOHEIMANI, 2005).

2.7. Características do biodiesel de microalgas

O biodiesel das microalgas não é significativamente diferente do biodiesel produzido dos óleos de plantas oleaginosas. Todo biodiesel é produzido a partir dos triglicerídeos das oleaginosas ou microalgas. Entretanto, algumas diferenças podem existir (GOUVEIA, 2009):

- As microalgas produzem muitos ácidos graxos poli-insaturados, que podem apresentar problemas da estabilidade, já que níveis elevados desses ácidos graxos tendem a diminuir a estabilidade do biodiesel. Porém, os poli-insaturados também têm o ponto de congelamento mais baixo que os mono-insaturados ou saturados. Assim, o biodiesel de microalgas deverá ter propriedades mais adequadas ao frio do que o biodiesel de oleaginosas. Já que uma das atuais desvantagens do biodiesel é o baixo ponto de entupimento a frio, assim, ao que tudo indica, o biodiesel de microalgas apresenta melhor desempenho neste critério.
- A diferença mais significativa é, entretanto, referente ao rendimento do óleo extraído das microalgas para produzir biodiesel. De acordo com algumas estimativas (MIAO & WU, 2006; MATA et al., 2010), o rendimento em óleo de microalgas é cerca de 200 vezes maior que o rendimento obtido com a mais produtiva entre as plantas oleaginosas.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O cultivo a partir de microalgas voltado para a produção de biocombustíveis é um assunto inovador e sua evolução está à disposição de grandes empresas produtoras

de combustíveis. Apesar de ser uma atividade consideravelmente nova, ela vem ganhando espaço com estudos, pesquisas e investimentos.

As microalgas são utilizadas em diversos setores industriais, como matéria prima para uma vasta gama de produtos e co-produtos. Porém, sua viabilidade para combustível precisa de investimentos. O aprimoramento nos moldes de cultivo e redução nos custos de produção são algumas alternativas. O biodiesel de microalgas exige cultivos em grande escala e sistemas de captação, desafios que podem reduzir o custo de produção por unidade de área. As condições de crescimento das microalgas em escalas maiores precisam de ambiente cuidadosamente controlado o que onera o custo de produção. O processo pode se tornar mais econômico se combinados com o sequestro de CO₂, com utilização de águas residuárias como meio de cultivo ou com processos de biorremediação e, ainda, com a geração de co-produtos com alto valor agregado. Como pigmentos e proteínas, que podem ser purificados a partir da torta gerada na extração do óleo.

Por fim, é evidente que o papel da utilização das microalgas para a produção de biocombustíveis se tornou uma possível saída para a situação em que é colocado o futuro dos combustíveis, sejam eles fósseis ou limpos. De maneira que a solução ainda não definida pode estar apenas a um passo das colocações que estão sendo feitas contra o uso dos biocombustíveis.

4. REFERÊNCIAS

ALGATECH. Disponível em: <<http://www.algatech.com/>>. Acesso em 20/11/2010;

AMIN, S., Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae - **Energy Conversion and Management**. v.50; 1834–1840. 2009.

AZEVEDO, M. A.; D'AVIGNON, A.; ARAÚJO, M. A. V.; GODOY, S. C. MICROALGAS: Fonte de Energia para o Brasil? - XIICBE - **Congresso Brasileiro de Energia**, PPE - Programa de Planejamento Energético – COPPE. 2008;

BRENNAN L., OWENDE, P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 805 (2009) 01–20. 2009;

BENEMANN, J. R., **Overview: Algae Oil to Biofuels**, National Renewable Energy Laboratory - Air Force Office of Scientific Research Workshop on Algal Oil for Jet Fuel Production - February, 2008;

BENEMANN, J.R. CO₂ mitigation with microalgae systems. **Energy Conservation Management**, 38, S 475- 479, 1997;

BROWN, L.M. & ZEILER, K.G. Aquatic biomass and carbon dioxide trapping. **Energy Conversion and Management**, 34, p.1005-10013, 1993;

CANTRELL K. B., Livestock waste-to-bioenergy generation opportunities. **Bioresource Technology**, 99(17):7941–53, 2008;

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, 25: 294-306, 2007;

CRAVOTTO G, BOFFA L, MANTEGNA S, PEREGO P, AVOGADRO M, CINTAS P. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. **Ultrasonics Sonochemistry**, 15(5):898–902, 2008;

CYANOTECH. Disponível em: < <http://www.cyanotech.com/company.html>>. Acesso em 20/12/2010.

DISMUKES, G CHARLES, DAMIAN CARRIERI, NICHOLAS BENNETTE, GENNADY M ANANYEY, Matthew C Posewitz. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. **Current Opinion in Biotechnology** 19 235-240. 2008;

DUERR, E.O.; MOLNAR, A.; SATO, V. Cultured microalgae as aquaculture feeds. **Journal of Marine Biotechnology**, 7, p.65-70, 1998;

DUARTE, J. H.; ÁVILA, A. L.; OLIVEIRA, E. G., PINTO, DE L. A. A. **Avaliação da cinética de secagem e reidratação da microalga *Spirulina platensis***, VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. 2009;

EARTHRISE. Disponível em: <<http://www.earthrise.com/home.asp>>. Acesso em: 20/12/2010.

EUROPEAN ENVIRONMENTAL AGENCY (EEA). Greenhouse gas emission trends and projections in Europe 2007: tracking progress towards Kyoto targets. European Environmental Agency (EEA) Report N85. Copenhagen, Denmark; 2007.

FAO. Renewable biological system for alternative sustainable energy production. Serie Title: **FAO Agricultural Services Bulletins** 128, 1997.

FUA, CHUN-CHONG; HUNGB, TIEN-CHIEH; CHENA, JING-YI; SUC, CHIA-HUNG; WU, WEN-TENG; Hydrolysis of microalgae cell walls for production of reducing sugar and lipid extraction, **Bioresource Technology**, 101, :22-29, 2010;

GOMES, C. Embrapa. Disponível em:<www.cnpso.embrapa.br/imprcon.htm> Acesso em: 20/12/2010;

GOUVEIA L, OLIVEIRA A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 36:269–74, 2009;

HANMOUNGJAI, PYLE, D.L.; NIRAJAN, K. Enzymatic process for extracting oil and protein from rice bran. **Journal of AOCS**, v. 78, n. 8, p. 817-821, 2001;

HOEK, V. D.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. **Algae: an introduction to phycology**. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 623pp. 1995;

HOSSAIN, SHARIF; SALLEH, AISHAH; BOYCE, AMRU NASRULHAQ, Partha chowdhury and Mohd Naqiuddin Biodiesel Fuel Production from Algae as Renewable Energy, American. **Journal of Biochemistry and Biotechnology** 4 (3):250-254, 2008;

ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in Chlorella strains calorific values when grow in low nitrogen medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 631-635, 2000;

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY (IEA). World Energy Outlook 2007. China and India Insights, Paris, France; 2007.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A. CAETANO, N. S., Microalgae for biodiesel production and other applications: A review - **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 14; 217–232. 2009;

MAYFIELD, S., **Algal Model, National Renewable Energy Laboratory** - Air Force Office of Scientific Research Workshop on Algal Oil for Jet Fuel Production - February, 2008;

MATA, T.M., MARTINS, A.A., CAETANO, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable and sustainable energy reviews**, 14: 217-232, 2010;

MELO, M. A. V. de, **Perspectivas sobre o uso de microalgas como fonte de energia renovável e mitigação do dióxido de Carbono**, 77p. (Trabalho de conclusão de curso) São Paulo, SP. 2010;

MIAO X, WU Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology** , 97(6):841–6, 2006;

MOHEIMANI N. R. **The culture of Coccolithophorid Algae for carbon dioxide bioremediation**. PhD thesis. Murdoch University; 2005;

MOLINA-GRIMA, E. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 491-515, 2003;

MOLINA-GRIMA, E.; ACIÉN, F.F.G.; GARCIA CAMACHO, F.; CHRISTI, Y. PhotobioreactorsÇ light regime, mass transfer and scaleup. **Journal of Biotechnology**, 70, p. 231-247, 1999;

NOGUEIRA, N. S. **Análise Delphi e SWOT das Matérias-primas de Produção de Biodiesel: Soja, Mamona e Microalgas**, Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ. 2010;

PÉREZ, H. E. B. **Biodiesel de Microalgas**. Maio de 2007. p. 1-19. Disponível em: www.energiaverde.com.br; Acesso em: Janeiro 2011.

PIRT, S.J. The thermodynamic efficiency (quantum demand) and dynamics of photosynthetic growth. **New Phytologist**, 102, p.3-37, 1986;

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.65, p.635-648, 2004;

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 906 p. 2001;

RENEWABLE FUEL AGENCY (RFA). The Gallagher review of the indirect effects of biofuels production; 2008.

RICHMOND A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Blackwell Science Ltd; 2004;

SANCHES MIRÓN, A.; CERÓN GARCIA, M-C; CONTRERAS GÓMEZ, A.; GARCIA CAMACHO, F.; MOLINA GRIMA, E.; CHRISTI, Y. Shear stress tolerante and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continous culture in outdoor photobioreactors. **Biochemical Engineering Journal**,16, p. 287-297, 2003;

SCHENK P, Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. **Bio Energy Research** 1(1):20–43, 2008;

SHANKAR, D.; AGRAWAL, Y.C.; SARKAR, B.C.; SINEH, B . P . N . Enzymatic hydrolysis in conjunction with conventional pretreatments to soybean for enhanced oil availability and recovery. **Journal of AOCS**, v. 74, n. 12, p. 1543-1547, 1997;

SHEEHAN, J.; DUNAHAY, T.; BNEMANN, J.; ROESSLER, P.A. A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program - **Biodiesel from Algae**, Colorado, 1998;

SINGH, J.; GU, SAI. Commercialization potential of microalgae for biofuels production, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 14: 2596–2610, 2010;

SPOLAORE, P., C. JOANNIS-CASSAN, E. DURAN AND A. ISAMBERT, Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 101: 87-96, 2006;

TAKAGI, M.; KARSENKO, YOSHIDA, T. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglycerid in marine microalgae. *Dunaliella* cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 101, n.3, p.223-226, 2006;

TECHNOLOGY. Disponível em: <<http://www.technology.am/mit-algae-photobioreactor-112420.html>>. Acesso em 20/11/2010.

TEIXEIRA C. M.; MORALES M. E. Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel. Revista: **Biodiesel o Novo combustível do Brasil**, pp. 91–6, 2007;

VICHEZ, C.; GARBAYO, I.; LOBATO M. V.; VEGA, J. M. – Microalgae-mediated chemicals production and waste removal. **Enzyme Microbial Technology**, 20, 562-72, 1997;

VOLKMANN, H.; IMIANOVSKY¹, ULISSES; OLIVEIRA, JORGE L.B.; SANT'ANNA, ERNANI S. Cultivation Of *Arthrospira* (*Spirulina*) *Platensis* In Desalinator Wastewater And Salinated Synthetic Medium: Protein Content And Amino-Acid Profile - **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 39:98-101, 2008;

WELLINGER, A., Algal Biomass Does it save the world? Short reflections - IEA Bioenergy: **An international Collaboration in Bioenergy**. Abril, 2009;

YUN, Y.S.; LEE, S.B.; PARK, J.M.; LEE, C.I.; YANG, J.W. Carbon dioxide fixation by algal cultivation using wastewater nutrients. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**., 69, 451-455, 1997;

**ARTIGO III: EFEITO DO MEIO DE CULTIVO NO RENDIMENTO E NA
COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA BIOMASSA DA MICROALGA NATIVA
Chlorella sp., VISANDO A PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS**

**EFEITO DO MEIO DE CULTIVO NO RENDIMENTO E NA COMPOSIÇÃO
BIOQUÍMICA DA BIOMASSA DA MICROALGA NATIVA *Chlorella* sp.,
VISANDO A PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS**

RESUMO

Para investigar o efeito do meio de cultivo no crescimento e na composição bioquímica da microalga *Chlorella* sp., foram desenvolvidos cultivos experimentais com esta espécie. Os fatores avaliados foram a resposta das microalgas ao meio Watanabe suplementado com CO₂ e ao meio alternativo, com baixo teor de nitrogênio. Quanto à composição bioquímica foi analisada, a produtividade volumétrica das culturas e, na biomassa obtida dos diferentes tratamentos, foi determinado o conteúdo de proteínas hidrossolúveis, carboidratos totais e lipídios totais. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância fatorial e quando necessário ao teste de comparação de médias de Duncan. A produção de biomassa total da microalga *Chlorella* sp. foi maior quando cultivada em meio suplementado com CO₂, enquanto a variável nitrogênio não apresentou diferença significativa em relação ao controle. O maior rendimento de biomassa foi verificado em cultivo no meio Watanabe com suplementação de CO₂. O meio com supressão de nitrogênio influenciou negativamente o conteúdo de proteínas hidrossolúveis, enquanto que para carboidratos e lipídios totais resultou em maior rendimento. A utilização do CO₂ proporcionou maior rendimento em biomassa, porém não teve influência no conteúdo lipídico. O teor de nitrogênio exerce forte influência no aumento do conteúdo lipídico. Visando possível utilização da microalga nativa *Chlorella* sp. como matéria prima para produção de biodiesel, sugere-se a utilização de um meio de cultivo com supressão do conteúdo de nitrogênio e com suplementação de CO₂.

Palavras chave: microalgas, composição bioquímica, biomassa, biodiesel.

**EFFECT OF WAY OF CULTURE IN INCOME AND BIOCHEMICAL
COMPOSITION OF BIOMASS OF NATIVE MICROALGAE *Chlorella* sp.,
WITH EMPHASIS AIMING BIOFUELS**

ABSTRACT

To investigate the effect of way of culture on growth and biochemical composition of microalgae *Chlorella* sp., experimental crops have been developed with this species. The factors evaluated were the answer of microalgae to watanabe middle supplemented with CO₂ and alternative middle, with low percentage of nitrogen. About the biochemical composition, we analyzed the volumetric productivity of crops and, on biomass obtained from different treatments, it was determined the content of soluble protein, total carbohydrates and total lipids. The data obtained were submitted to a factorial analysis of variance and when necessary to the Duncan Medium Comparison Test. The total biomass of the microalgae *Chlorella* sp. showed higher performance when grown in local supplemented with CO₂, while the variation of nitrogen showed no significant difference compared to control. The yield more efficient in biomass was found in the middle Watanabe supplemented with CO₂. The local with nitrogen removal has influenced negatively the soluble protein content, while for carbohydrates and total lipids, it has resulted in a higher yield. The use of CO₂ has resulted in a higher biomass yield, but had no influence on lipid content. The nitrogen percentage, it had a strong influence on increasing the lipid contents. Aiming at a possible use of native microalgae *Chlorella* sp. as raw material for biodiesel production, this work suggests the use of a culture way suppressing the nitrogen content and CO₂ supplementation.

Keywords: microalgae, biochemical composition, biomass, biodiesel.

1. INTRODUÇÃO

Problemas ambientais estão relacionados à produção e a utilização de combustíveis. O uso continuado de óleos derivados de petróleo é considerado insustentável, devido não só à diminuição no suprimento fóssil, como à contribuição destes combustíveis para o acúmulo de CO₂ na atmosfera (CHISTI, 2007). A renovação e neutralização do carbono, assim como o transporte de óleo combustível, é necessária para a sustentabilidade ambiental e econômica. Desse modo, o biocombustível está na pauta de todas as discussões sobre a matriz energética e é considerado o sucessor do petróleo para o setor de transportes (BRENNAN & OWENDE, 2009). O biodiesel derivado de oleaginosas é uma alternativa ao uso dos óleos derivados de petróleo. No entanto, biodiesel de oleaginosas, gorduras residuais e gorduras animais satisfazem apenas uma pequena fração da demanda existente. Os defensores do meio ambiente já apontam conseqüências que poderiam ser decorrentes de sua produção em massa como: problema de biodiversidade, pois trata-se de uma monocultura; degradação do meio ambiente, pela utilização de adubos e pesticidas; utilização de grandes extensões de terra que poderiam ser usadas para produção de alimentos, sem levar em conta os riscos de desflorestamento e alto consumo de energia para sua produção. Em vista dessas restrições, uma nova fonte potencial para a produção de biocombustíveis vem sendo estudada com o objetivo de fornecer o biodiesel para os transportes, as microalgas (MATA et al., 2010), que aparentam ser uma fonte renovável de biodiesel capaz de alcançar a demanda global de óleos combustíveis.

As microalgas usam a energia do sol para converter água e CO₂ em biocombustíveis potenciais (METZGER & LARGEAU, 2005; WALTER et al., 2005; SPOLAORE et al., 2006). Estes organismos fotossintetizantes utilizam o ambiente aquático para se desenvolverem. Atualmente, mais de 150 espécies de algas são usadas comercialmente para prover alimentos aos seres humanos e animais, servir como agentes espessantes em sorvetes e na produção de fármacos (COLLA, 2004). As microalgas e seu derivado também podem ser utilizadas para produzir diferentes tipos de biocombustíveis renováveis. Isto inclui o metano, produzido por digestão anaeróbica de biomassa algal (SPOLAORE et al., 2006); o biodiesel produzido de óleo de microalgas (GAVRILESCU & CHISTI, 2005; BANERGEE et al., 2002) e o biohidrogênio fotobiologicamente produzido (FEDEROV et al., 2005; KAPDAN & KARGI, 2006).

A idéia de usar microalgas como fonte de combustível não é nova (CHRISTI, 1980; NAGLE & LEMKE, 1990; SAWAYAMA et al., 1995), porém, na atualidade tem ganhado um enfoque maior, devido ao aumento exagerado do preço do petróleo e à conscientização ambiental sobre problemas climáticos associados à queima de combustíveis fósseis (GAVRILESCU & CHRISTI, 2005). Atualmente, várias pesquisas são conduzidas com o objetivo de avaliar a utilização das algas como matéria prima para a produção de biocombustíveis (SPOLAORE et al., 2006; ROESSLER et al., 1994; SAWAYAMA et al., 1995; DUNAHAY et al., 1996; SHEEHAN et al., 1998; BANERJEE et al., 2002; GAVRILESCU & CHISTI, 2005).

Estes organismos podem utilizar substratos de baixo custo como fonte de energia e nutrientes, como por exemplo, a energia solar e o dióxido de carbono. Alguns trabalhos já mostraram a eficiência da suplementação com CO₂ no meio para aceleração do crescimento microalgal (BADGER & PRICE, 2003; ZAK et al., 2001). Tem sido verificado que em meios de cultivo com limitação de nitrogênio ocorre um aumento no teor de lipídeos de certas cepas de microalgas (PIORRECK et al., 1984; BOROWITZKA, 1988). Redução nos teores de nitrogênio do meio de cultivo tem recebido considerável atenção (ILLMAN et al., 2000). Em face disto, neste trabalho teve-se por objetivos avaliar o efeito de variáveis do meio de cultivo tais como limitação de nitrogênio e suplementação com CO₂, no crescimento e no rendimento em biomassa da microalga nativa *Chlorella* sp. e, ainda, caracterizar a biomassa obtida em termos de suas propriedades bioquímicas, visando sua possível utilização como matéria prima para o biodiesel.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cultura e condições de cultivo

A microalga de água doce *Chlorella* sp. foi coletada nos reservatórios da Piscicultura da Universidade Federal de Viçosa e isolada no Laboratório de Ficologia da mesma instituição.

Os cultivos foram realizados com o meio Watanabe (WATANABE, 1960), que consiste de 1,25 g L⁻¹ de KNO₃, 1,25 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 20 mg L⁻¹ de MgSO₄, 20 mg L⁻¹ de FeSO₄ e 1 mL L⁻¹ de solução A5 (OH-HAMA, 1988); e com o meio com baixo teor (50%) de nitrogênio, que consiste em 203 mg L⁻¹ de (NH₄)₂ HPO₄, 2,236 g L⁻¹ de KCl, 2,465 g L⁻¹ de MgSO₄, 1,361 g L⁻¹ de KH₂PO₄ e 10 mg L⁻¹ de FeSO₄. O meio teve o

valor de pH fixado em 6, sendo posteriormente acondicionado em autoclave, como sugerido por Illman (2000).

Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores, que consistiram em Erlenmeyer de 2000 mL, com volume inicial de 1600 mL, agitados com colunas de bolhas produzidas por bombas de diafragma. O fotobiorreator permaneceu sob temperatura ambiente de 25 °C, com fotoperíodo de luz/escuro de 16/8 h, com intensidade luminosa de 83 $\mu\text{mol s}^{-1}$ e aeração constante. Como fonte de carbono suplementar foi utilizado o CO₂, produzido por processo fermentativo. Neste processo, foi usado fermento biológico comercial, açúcar e bicarbonato de sódio, disposto de forma que a aeração do meio de cultivo pudesse ser suplementada com o CO₂ gerado por essa cultura. O crescimento foi observado de forma a manter o meio estéril, recolhendo amostras em dias alternados durante o período de 17 dias e avaliando o nível de contaminação e o valor de pH. Após o término do cultivo, as amostras tiveram seu volume mensurado e foram centrifugadas (Centrifuga Beckman, J2-MC, USA) a 20000 g, durante 20 minutos. A biomassa úmida foi congelada em ultra freezer a 40 °C negativos (ULT-FREEZER, Model 995, Thermo Electron Corporation, USA). e, a seguir, transferida para um liofilizador (Liofilizador LS 3000, Terroni, Brazil) para secagem.

2.2. Determinações analíticas

2.2.1. Avaliação do crescimento

O crescimento das microalgas foi determinado por meio da elaboração das curvas de crescimento, avaliando-se a densidade celular e o tempo de cultivo em cada uma das unidades experimentais. As unidades experimentais constituída por 3 repetições e 4 tratamentos (12) foram inoculadas com uma densidade celular de 9×10^6 células mL⁻¹ para as culturas de *Chlorella* sp.. A cada 48 horas, após o início dos cultivos, foram retiradas amostras de 2 mL das culturas a fim de determinar a densidade celular. As contagens foram realizadas em microscópio (TM 3000, Tabletop Microscope HITACHI, Japan) com auxílio de Câmara de Neubauer, sendo que o número de células corresponde à média de três contagens. O valor de pH dos cultivos foram acompanhados diariamente com o auxílio de um PHmetro de bolso, faixa de 0 a 14 (pH-100-B, PHTEK, China).

2.2.2. Obtenção da biomassa liofilizada

Após a coleta das culturas algais, nas fases específicas da curva de crescimento, procedeu-se a centrifugação, em temperatura controlada (Centrifuga Beckman, J2-MC, USA), a 20000 g e a 4 °C, durante 20 minutos, para a separação da biomassa do meio de cultura. A biomassa úmida foi congelada em placas de petri em um freezer a - 40 °C (ULT-FREEZER, Model 995, Thermo Electron Corporation, USA) e a seguir transferidos para um liofilizador (Terroni, LS 3000, Brasil). Após o processo de liofilização da biomassa, as placas de petri foram mantidas em freezer a - 20 °C até as análises posteriores.

2.2.3. Biomassa seca

A biomassa seca ou igualmente o rendimento ou produtividade da cultura, neste trabalho, foi expresso em miligramas de biomassa seca (liofilizada) por litro de cultura (produtividade volumétrica).

Esta variável foi calculada empregando-se a metodologia para a obtenção da biomassa liofilizada. No término dos dias de cultivo o volume (L) total de cultura foi mensurado e, em seguida, foi levado para ser centrifugado. Após o processo de liofilização descrito no item 2.2.2, a biomassa foi pesada em balança analítica (Balança Deriver Instrument M-310, China) com precisão de 0,0001 g e determinou-se a biomassa seca (liofilizada), em mg L⁻¹.

2.2.4. Proteínas Hidrossolúveis

A análise de proteína solúvel da biomassa microalgal foi determinada segundo a reação de Biureto (GORNALL et al., 1949) com leitura da absorbância a 540 nm (espectrofotômetro Cary 50, Varian, Austrália). A curva padrão foi elaborada a partir de uma solução de albumina do soro bovino fração V (BSA, Sigma), com uma concentração igual a 300 µg mL⁻¹, realizando um gradiente de concentração de BSA (0 até 250) µg mL⁻¹. Os dados foram apresentados em porcentagem de proteínas por grama de biomassa seca.

2.2.5. Rompimento celular

A técnica de rompimento celular com choque osmótico foi usada em todas as metodologias das análises bioquímicas. O choque osmótico, pode ser aplicado com um tampão fosfato, ou acetato, ou ainda com água destilada. A extração pode ser feita

apenas com adição desses solventes, mas também associando os métodos químicos aos físicos, como congelamento/descongelamento, maceração gral/pistilo, digestão, sonicação (uso de ultrassom), homogeneização por pressão, French press, conforme relatado por Reis et al. (1998); Patel et al. (2005); Chen et al. (2006); Patil et al. (2006); Sun, Wang e Qiao (2006). Com o objeto de obter melhor extração dos conteúdos celulares da microalga *Chorella* sp foi aplicado ciclos repetitivos de choque osmóticos com auxílio do aparelho de ultra-sono (Ultra Cleaner 1400, UNIQUE, Austrália) em banho com água destilada, esse pré-tratamento foi utilizado nos testes bioquímicos do teor de carboidratos, proteínas e lipídios.

2.2.6. Carboidratos Totais

A determinação de carboidratos totais seguiu as técnicas de Korchert (1978) modificado. Após o resfriamento da amostra, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 485 nm (espectrofotômetro Cary 50, Varian, Austrália).

A curva padrão foi preparada a partir de uma solução de glicose anidra de concentração igual a $300 \mu\text{g mL}^{-1}$, realizando um gradiente de concentração de (0 até $240 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os dados foram apresentados como porcentagem de carboidratos por grama de biomassa seca.

2.2.6. Lipídios Totais

A extração dos lipídios totais foi realizada conforme os procedimentos descritos por Bligh e Dyer (1959), descritos por Zhu et al. (2002), utilizando-se biomassa seca modificado. Foi necessário a utilização de um ciclo de três repetições em ultrassom (Ultra Cleaner 1400, UNIQUE, Austrália), a fim de romper as células das amostras liofilizadas e melhor expressar o conteúdo lipídico.

2.2.7. Delineamento Experimental

O experimento foi conduzido em planejamento Fatorial 2×2 , onde os fatores foram fonte de carbono (com e sem suplementação de CO_2) e concentração de nitrogênio no meio (meio Watanabe e meio com baixo teor de nitrogênio), totalizando 4 combinações de fatores. Foram desenvolvidos experimentos do tipo blocos completamente casualizados, com três repetições (três blocos, em três datas diferentes,

contendo todas as combinações distribuídas ao acaso), totalizando 12 unidades experimentais.

2.2.8. Análise Estatística

Para a análise estatística dos dados foi empregado o modelo matemático proposto por Mendes (1999), para blocos completamente casualizados. Para medir o efeito de um fator:

$$Y_{ij} = m + t_i + b_j + e_{ij} \quad (1)$$

em que:

Y_{ij} = valor observado ou variável resposta relativa à parcela que recebeu o i-ésimo tratamento e no j-ésimo bloco;

m = média geral da variável resposta;

t_i = efeito do i-ésimo tratamento (Fator 1);

b_j = efeito do j-ésimo bloco;

e_{ij} = erro aleatório associado à observação Y_{ij} .

O modelo a ser empregado para medir o efeito de dois fatores foi:

$$Y_{ij} = m + t_i + t_j + t_{ij} + b_j + e_{ij} \quad (4)$$

em que:

Y_{ij} = valor observado ou variável resposta relativa à parcela que receber o tratamento (i), o tratamento (j), assim como a combinação dos dois fatores (ij);

m = média geral da variável resposta;

t_i = efeito do tratamento (Fator 1);

t_j = efeito do tratamento (Fator 2);

t_{ij} = efeito combinado dos Fatores 1 e 2;

b_j = efeito do j-ésimo bloco;

e_{ij} = erro experimental.

Para a análise estatística dos dados foi empregado o programa estatístico SAS (SAS versão 9,0, Cary, NC, SAS Institute, Inc., 1999).

A confiabilidade dos resultados observados foi avaliada utilizando o coeficiente de determinação R^2 , o resultado das análises de variância (ANOVA) e o nível de significância pelo teste de Fisher ($F, P < 0,05$). Quando o resultado da ANOVA denotou diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias dos tratamentos, foi aplicado o teste de separação de médias de Duncan ($p < 0,05$) para estabelecer as diferenças entre os tratamentos e/ou as interações.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação do crescimento

A determinação da densidade celular, em intervalos de 48 horas após o início das culturas, possibilitou o estabelecimento da curva de crescimento para cada unidade experimental. Na Figura 1 são apresentadas as curvas de crescimento, sendo que, a representação gráfica das curvas se refere à densidade celular (em células por mililitro) da média das três repetições para cada uma das quatro condições de meio de cultivo avaliada.

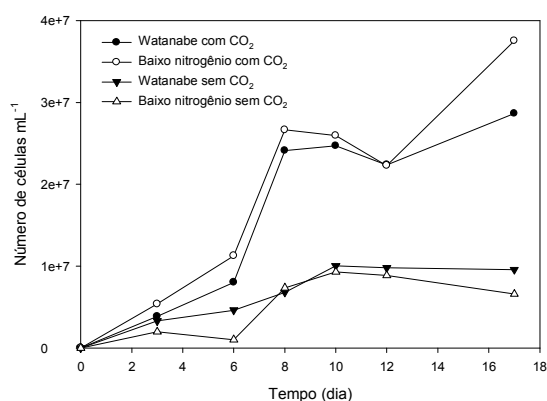


FIGURA 1 - Curvas de crescimento de *Chlorella* sp. para cada condição de meio de cultivo avaliada. Cada curva representa a média de três repetições, em número de células por mililitro.

As curvas de crescimento dos cultivos que receberam suplementação com CO₂ apresentam comportamento semelhante, do mesmo modo que as curvas de crescimento dos cultivos que não o receberam também se assemelham, não sendo, portanto, muito perceptíveis as diferenças entre os dados obtidos, sendo que, as possíveis diferenças entre as variáveis de crescimento são analisadas individualmente, a seguir.

3.2. Valores de pH

Os valores médios do pH, medido a cada 48 horas após o início dos cultivos, são apresentados na Figuras 2.

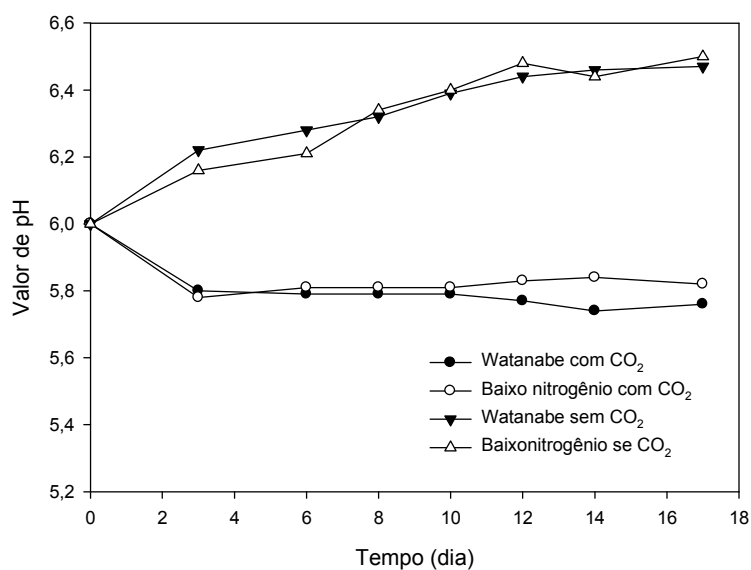


FIGURA 2 - Variação do pH durante o desenvolvimento das culturas de *Chlorella* sp.

O pH inicial das culturas apresentou valor médio de 6,0. As medidas do pH apresentaram tendência de variações discretas com elevação do valor de pH, ao longo do desenvolvimento das culturas, para ambas as condições sem suplementação com CO₂. Entretanto, o emprego do CO₂ gerou redução no valor de pH do meio de cultura, atingindo valor mínimo de 5,74 e se mantendo em torno de 5,77, para ambas as condições ao longo dos cultivos. É provável que estes valores de pH foram devidos ao próprio uso do CO₂, o qual é um gás que apresenta maior concentração de íons positivos e, portanto, causou a acidificação do meio de cultura.

Segundo Esteves (1988), em meio aquoso, o carbono inorgânico pode estar na forma de CO₂, H₂CO₃ (ácido carbônico), HCO₃⁻ (bicarbonato) ou CO₃²⁻ (carbonato) e suas proporções dependem do pH, sendo que, conforme o aumento do pH (alcalinização) as proporções bicarbonato e carbonato aumentam no meio de cultura.

Assim, numa cultura com pH ácido ocorre maior disponibilidade de CO₂, que é a fonte de carbono preferida pelas microalgas, uma vez que o CO₂ se difunde rapidamente (adsorção passiva) da água para o interior das células. É usado diretamente nos processos de fixação. Já o bicarbonato, é incorporado ativamente, gerando gasto energético para suportar este processo (RAVEN, 1988; FALKOWSKI; RAVEN, 1990).

Como neste experimento foi estudado o efeito da suplementação com carbono no crescimento e na composição bioquímica da biomassa microalgal, pode-se considerar muito importante essa variação do pH nas culturas com CO₂. O emprego do

CO₂ pode ter contribuído significativamente para o aumento na produtividade das culturas (especialmente no que se refere à densidade celular máxima alcançada e quanto à biomassa obtida) de maneiras distintas: como fonte (preferida) de carbono disponível para as células; por ter reduzido o pH o meio de cultura, aumentando a quantidade de CO₂ disponível em comparação com as demais formas possíveis de carbono encontradas na água; por disponibilização de outros nutrientes.

3.3. Biomassa Seca

Os dados da biomassa seca (em miligramas por litro de cultura microalgal) para cada condição de meio de cultivo avaliada são apresentados na Figura 3.

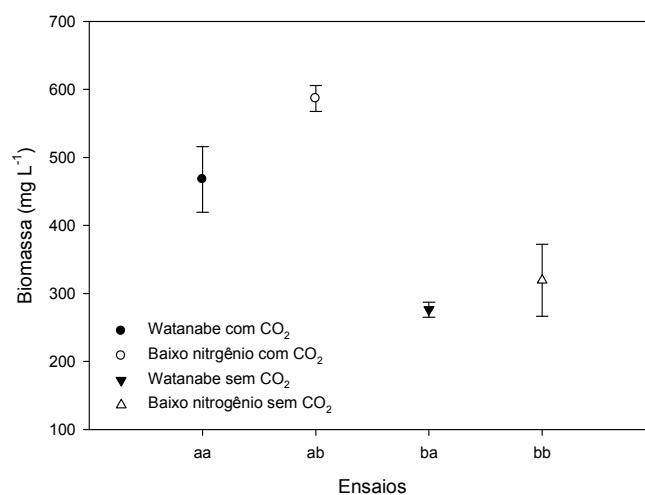


FIGURA 3 – Média e desvio padrão de biomassa seca em miligramas por litro de cultura, considerando cada condição avaliada (aa = Meio Watanabe com CO₂; ab = Meio com baixo teor de nitrogênio com CO₂; ba = Meio Watanabe sem CO₂; bb = Meio com baixo teor de nitrogênio).

Aparentemente, o emprego do CO₂ causou aumento na biomassa nas culturas de *Chlorella* sp. e, de maneira geral, as culturas apresentaram elevado rendimento em biomassa. Os dados obtidos são analisados estatisticamente, na qual é apresentada a ANOVA ($p < 0,05$) para a biomassa seca.

Na análise do rendimento de biomassa, a interação entre o conteúdo de nitrogênio no meio e suplementação com carbono foi não significativa em nível de probabilidade de 5 %. Portanto pode-se avaliar os efeitos principais separadamente. Observou-se que ambos foram significativos e, ainda, que o tratamento com

suplementação com carbono proporcionou maiores produções de biomassa, e que em meios de cultivo com baixo teor de nitrogênio produziu-se maior biomassa, de acordo com o teste de Duncan, tal como é apresentado nas Tabelas 1 e 2 (abaixo).

TABELA 1 – Teste de comparação de médias (Duncan com $p < 0,05$) para a biomassa seca para a condição de suplementação de carbono no meio de cultivo.

Grupos avaliados	Biomassa (mg L ⁻¹)	Grupos homogêneos
Baixo nitrogênio com CO ₂	586,67 ±18,9	a
Watanabe com CO ₂	467,67 ±48,2	b

TABELA 2 – Teste de comparação de médias (Duncan com $p < 0,05$) para a biomassa seca para a condição sem suplementação de carbono no meio de cultivo.

Grupos avaliados	Biomassa (mg L ⁻¹)	Grupos homogêneos
Watanabe sem CO ₂	276,33 ±11,1	a
Meio com baixo teor nitrogênio sem CO ₂	319,33 ±52,9	b

Ficou evidente o efeito positivo que o emprego do CO₂ proporcionou ao rendimento de biomassa da espécie *Chlorella* sp.. Foi possível observar, também, que o uso do CO₂ afetou em maior escala os cultivos com baixo teor de nitrogênio que para o meio Watanabe em se tratando da obtenção da maior rendimento de biomassa nas culturas microalgais. Igualmente, Castro Araújo e Garcia (2005) verificaram maior biomassa em cultivos da microalga *C. cf. weighamii* com o emprego de aeração enriquecida com CO₂.

A baixa produtividade de biomassa no meio Watanabe em relação ao meio com suplementação com carbono pode ser atribuída ao fato do CO₂ ser absorvido por difusão simples (transporte passivo) (TAIZ; ZEIGER, 2004). Segundo Grobbelaar (2004), ao contrário do que ocorre com as plantas terrestres, o CO₂ atmosférico não satisfaz quantitativamente os requerimentos de carbono em culturas intensivas de microalgas. Para a obtenção de altas taxas de crescimento sob condições autotróficas, o suprimento de CO₂ e/ou HCO₃⁻ é fundamental. Nas culturas, o CO₂ proveniente (por difusão) do ar atmosférico somente pode sustentar uma produtividade de aproximadamente 10 g m⁻² dia⁻¹ de biomassa seca, enquanto que até 70 g m⁻² dia⁻¹ de biomassa seca tem sido obtida com o enriquecimento do meio com CO₂. Concluiu-se que esta baixa disponibilidade de

carbono causa limitação do crescimento microalgal nos cultivos (OLAIZOLA et al., 1991; ISHIDA et al., 2000).

3.4. Proteínas Hidrossolúveis

Na Figura 4 são apresentados os dados médios dos valores obtidos das três repetições para cada condição do meio de cultivo ao teor de proteínas hidrossolúveis, em porcentagem (%), da biomassa liofilizada.

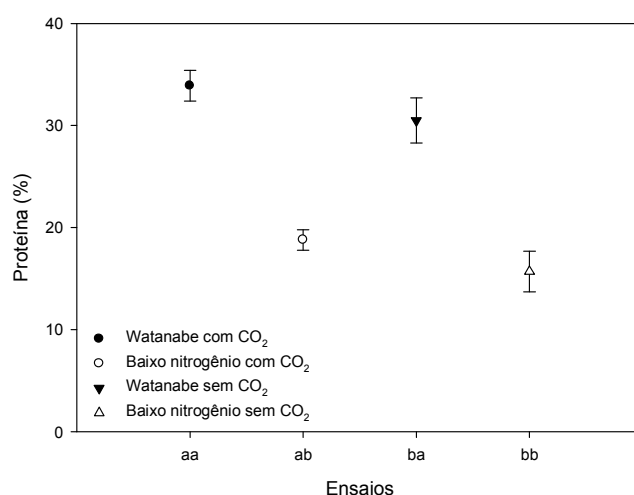


FIGURA 4 - Proteínas hidrossolúvel de biomassa liofilizada de *Chlorella* sp., considerando cada condição avaliada (aa = Meio Watanabe com suplementação de CO₂; ab = Meio com com baixo teor de Nitrogênio e suplementação de CO₂; ba = Meio Watanabe sem suplementação de CO₂; bb = Meio com baixo teor de Nitrogênio sem suplementação de CO₂).

A utilização do CO₂ causou aumento no conteúdo de proteínas, especialmente nas culturas do meio Watanabe. Os dados obtidos são analisados estatisticamente, a seguir, na Tabela 3. Foi realizado a NOVA ($p < 0,05$) para o teor de proteínas hidrossolúveis e o teste de comparação de médias.

Na análise estatística de proteínas hidrossolúveis, a interação entre nitrogênio e carbono foi não significativa em nível de 5 % de probabilidade, portanto pode-se avaliar os efeitos principais separadamente. Observou-se que o tratamento com suplementação de carbono não influenciou o rendimento em proteína, somente o conteúdo de nitrogênio, sendo que no meio Watanabe houve a maior produção de proteína, segundo o teste de Duncan.

TABELA 3 – Teste de comparação de médias (Duncan com $p < 0,05$) para proteínas hidrossolúveis em diferentes condições de nitrogênio no meio de cultivo.

Grupos avaliados	Proteína (%)	Grupos homogêneos
Watanabe sem CO ₂	30,5 ±2,2	a
Meio com baixo teor nitrogênio sem CO ₂	15,7 ±2,0	b

A concentração de proteínas hidrossolúveis verificada nas culturas de *Chlorella* sp. (30,5 ±2,2 %) foi similar àquela obtida por Olivera (1998) em culturas de *Chlorella calcitrans* (30,1 %). Entretanto foi inferior ao valor obtido por Renaud et al. (2002), os quais reportaram que em culturas de *Chaetoceros* sp. a concentração de proteínas alcançou concentração de 57,3 % da biomassa seca.

O nitrogênio é incorporado dentro do microrganismo na síntese de proteínas, sendo que sua ausência acarretaria a diminuição de aminoácidos e, conseqüentemente, do teor protéico (REINEHR, 2003), o que ficou evidenciado neste trabalho, concordando com os relatados por ILLMAN et al., (2000), SINGH & DHAR, (2007), LÓPEZ et al., (2010) e MUTLU et al., (2011).

3.5. Carboidratos Totais

Na Figura 5 são apresentados os dados médios dos valores obtidos das três repetições para cada condição de meio de cultivo ao teor de carboidratos totais, em porcentagem (%), da biomassa liofilizada.

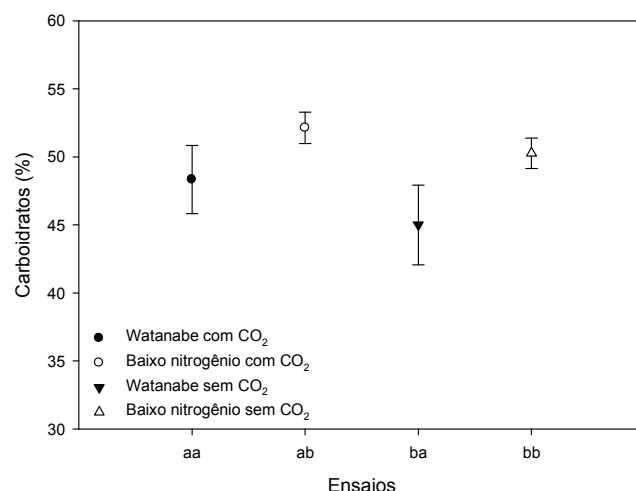


FIGURA 5- Carboidratos totais de biomassa liofilizada de *Chlorella* sp., considerando cada condição avaliada (aa = Watanabe com suplementação de CO₂; ab = Meio com baixo teor de Nitrogênio e com suplementação de CO₂; ba = Meio Watanabe sem suplementação de CO₂; bb = Meio com baixo teor de Nitrogênio e sem suplementação de CO₂).

Para determinar as diferenças quanto ao teor de carboidratos na biomassa seca foi desenvolvida a ANOVA ($p < 0,05$).

Na análise de carboidratos, a interação entre nitrogênio e carbono foi não significativa em nível de probabilidade de 5 %, portanto, pode-se avaliar os efeitos principais separadamente. Observou-se que o tratamento com suplementação de carbono não influenciou a resposta carboidratos, somente o tratamento considerando teor de nitrogênio, sendo que o meio com baixo conteúdo de nitrogênio gerou a maior produção de carboidrato, segundo o teste de Duncan apresentado na Tabela 4.

TABELA 4 – Teste de comparação de médias (Duncan com $p < 0,05$) para carboidratos totais em diferente condição de nitrogênio no meio de cultivo.

Grupos avaliados	Carboidratos (%)	Grupos homogêneos
Watanabe sem CO ₂	45,0 ±2,9	a
Meio com baixo teor nitrogênio sem CO ₂	50,3 ±1,1	b

A produção de carboidratos por microalgas é evidenciada por diversos autores (DE PHILIPPIS & VINCENZINI, 1998; OTERO & VINCENZINI, 2003; PARIKH & MADAMWAR, 2006), que relatam que a síntese de compostos exocelulares está

associada diretamente com as condições do meio em que o microrganismo se encontra. Nestes estudos, cita-se a possibilidade de estimular a produção de polissacarídeos extracelulares através da manipulação de determinadas variáveis ambientais como a intensidade luminosa, temperatura e disponibilidade de fontes de nitrogênio e carbono.

Observou-se, neste trabalho, que quando o conteúdo de nitrogênio é suprimido a forma preferível de armazenamento de energia pelas microalgas é na forma de lipídeos e carboidratos, o que justificaria o aumento no conteúdo de carboidrato nessas condições analisadas. De Philippis & Vincenzini, (1998) relatam que condições de stress metabólico favorecem a produção destes compostos. Por outro lado, Lee, Apel & Walton (2006) reportam que nestes sistemas de cultivo na captura de CO₂, uma fração muito pequena de carbono é convertida em biomassa, quando comparado à precipitação de espécies químicas na forma de bicarbonatos e carbonatos. Contudo, estudos de Shifrin & Chisholm, (1981) com 30 espécies de microalgas mostraram que algas verdes, com 17% de lipídios, aumentaram 2 ou 3 vezes o seu conteúdo lipídico após 4 a 9 dias de ausência de nitrogênio. E concluem que, quando nitrato, fosfato e bicarbonato estão em baixas concentrações, há aumento significativo na fração de carboidratos das células decrescendo a de proteína total (TEDESCO & DUERR, 1989). Santos et al. (2003), Quinn et al. (2011) e Packer et al. (2011) relataram que o aumento no conteúdo de carboidratos é influenciado significativamente pela luminosidade, temperatura, projeto do sistema e condições de escoamento do ar no sistema, essas variáveis não avaliadas separadamente neste estudo, pode justificar a pouca diferença no conteúdo de carboidratos quanto a suplementação com CO₂.

3.6. Lipídios Totais

Na Figura 6 são apresentados os dados médios dos valores obtidos das três repetições para cada condição de cultivo quanto ao teor de lipídios totais, em porcentagem (%), da biomassa liofilizada.

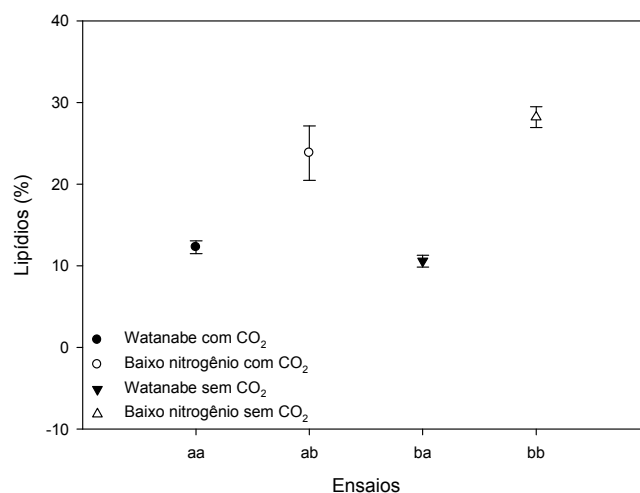


FIGURA 6- Lipídios totais de biomassa liofilizada de *Chlorella* sp., considerando cada condição avaliada (aa = Meio Watanabe com suplementação de CO₂; ab = Meio com baixo teor de Nitrogênio e com suplementação de CO₂; ba = Meio Watanabe sem suplementação de CO₂; bb = Meio com baixo teor de Nitrogênio sem suplementação de CO₂).

Aparentemente, o emprego do CO₂ causou redução no conteúdo de lipídios e o meio com baixo teor de nitrogênio proporcionou aumento no conteúdo lipídico das algas. Os dados obtidos são analisados a seguir, discutindo-se a ANOVA ($p < 0,05$) para o teor de lipídios totais.

Na análise de lipídeos, a interação entre nitrogênio e carbono foi não significativa, em nível de probabilidade de 5 %, portanto, pode-se avaliar os efeitos principais separadamente. Observou-se que o tratamento com suplementação de carbono não influenciou a resposta de lipídeos, somente o tratamento considerando o teor de nitrogênio foi significativo. Sendo que o meio com baixo teor de nitrogênio gerou a maior produção de lipídeos, segundo o teste de Duncan.

O emprego do meio com baixo teor de nitrogênio gerou maior conteúdo de lipídios totais na biomassa seca, com diferença significativa ($p < 0,05$) das demais variáveis avaliadas, sendo 62,5 % superior ao controle (Meio Watanabe). Segundo Widjaja et al. (2009), o emprego do meio com baixo conteúdo em nitrogênio favorece a síntese de lipídios pelas microalgas, uma vez que a síntese de proteína é diminuída pela diminuição do teor de nitrogênio no meio de cultivo. A síntese de lipídios é escolhida como material de reserva. O resultado obtido no presente estudo concorda com aquele

apresentado por Brennan e Owende (2009), uma vez que, segundo estes autores a concentração de lipídios é maior com o emprego de meios com baixo conteúdo de nitrogênio nas culturas de *Chlorella* sp..

A maioria das espécies de microalgas possui, naturalmente, conteúdo lipídico de cerca de 5-50% do peso seco. No entanto, é possível conseguir maior acúmulo deste componente, por meio da otimização de fatores determinantes durante o crescimento (HU et al., 2008) como por exemplo o controle da concentração de nitrogênio (WIDJAJA et al., 2009; WU & HSIEH, 2008). Entretanto, o aumento no conteúdo de lipídios não significa aumento de produtividade de lipídios, uma vez que a produtividade de biomassa e acúmulo de lipídios não estão necessariamente correlacionados (RODOLFI et al., 2008; SHEEHAN et al., 1998). Acúmulo de lipídios se refere ao aumento na concentração de lipídios no interior das células de microalgas, sem consideração da produção de biomassa. Enquanto, produtividade de lipídios leva em consideração tanto a concentração de lipídios no interior das células como a quantidade de biomassa produzida por essas células, sendo, portanto, um indicativo mais seguro para avaliação dos custos potenciais da produção de biocombustíveis a partir de microalgas.

Fica evidente, nesse trabalho, que para *Chlorella* sp. o acúmulo lipídico não seguiu o mesmo padrão que o rendimento em termos de biomassa. A maior produtividade em biomassa foi verificada nos meios com suplementação de CO₂, sendo que essa variável não teve significância para o conteúdo de lipídios das algas. O teor de nitrogênio foi o fator determinante ao conteúdo lipídico sendo que, na biomassa cultivada no meio com baixo teor de nitrogênio e com suplementação em CO₂, foi observada diminuição no conteúdo lipídico em relação à biomassa tratada com meio somente com a supressão de nitrogênio. Todavia, o rendimento em biomassa no meio com baixo teor de nitrogênio e com suplementação em CO₂ foi significativamente superior ao rendimento da biomassa tratada com meio apenas com a supressão de nitrogênio.

O método mais eficiente visando-se proporcionar aumento no conteúdo de lipídios de microalgas é a limitação de nitrogênio, que não só tem efeito em um maior acúmulo de lipídios, mas também resulta em uma mudança gradual da composição lipídica de ácidos graxos livres de triacilglicerídeos (TAG) (WELDY & HUESEMANN, 2007). Os Tags são mais úteis para a conversão em biodiesel (MENG X. et al., 2009).

O aumento no teor de lipídeos pelas microalgas ocorre quando um nutriente (geralmente nitrogênio) torna-se fator limitante no crescimento. A multiplicação celular no meio ocorre pela assimilação do carbono que é convertido em lipídios TAG, que são armazenados no interior das células, aumentando, assim, a concentração de lipídios (MENG X. et al., 2009). Vários fatores podem influenciar essa assimilação tais como o tempo de cultivo, a concentração de células no meio, a existência de sombreamento, dentre outros (REITH et al., 2004).

Como visto anteriormente, a depleção de nitrogênio. Pode proporcionar aumento no conteúdo lipídico de uma microalga (SANTOS et al., 2003; GRANT, 2001; ALONSO et al, 2000). Isso é explicado pelo fato de que a falta de nitrogênio direciona o metabolismo microalgal, antes voltado à multiplicação celular, para a produção de componentes de reserva, como os ácidos graxos saturados, para preparar a célula para um período de privação (ALONSO et al., 2000).

Youngmanitchai e Ward (1991) relataram que a concentração de nitrogênio no meio interfere no grau de insaturação dos lipídios produzidos. Para algumas microalgas, como a *Dunaliella salina* e *Botryococcus braunii*, a depleção de nitrogênio aumenta a produção de ácidos graxos polinsaturados. Santos et al. (2003) privaram a alga *Spirulina maxima* de nitrogênio, e obtiveram aumentos de até 207% no teor de lipídios totais por grama de biomassa seca. Kaixian e Borowitzka (1992) submeteram a microalga *Phaeodactylum tricornutum* à privação de nitrogênio e obtiveram aumento de aproximadamente 20% na produção de lipídios por grama de biomassa seca, em meio F/2 Guillard.

Neste trabalho, foi mostrado que a maior quantidade de lipídios não está relacionada com a maior produtividade de biomassa, sendo importante considerar essa informação ao formular um meio de cultura. Os resultados apontam que a privação de nitrogênio pode ter, primeiro, restringido a produção de biomassa e, segundo, direcionado o metabolismo da microalga à produção de lipídios de reserva para enfrentar o período de privação (ALONSO et al., 2000). O que gerou menor rendimento em biomassa nos ensaios com baixo teor de nitrogênio.

Wu & Hsieh (2008), investigando os efeitos da salinidade, concentrações de nitrogênio e intensidade de luz sobre a produtividade de lipídios, verificaram aumento de até 76% na produção de lipídios da microalga *Chlorella* sp. nas condições de crescimento específico com baixo teor de nitrogênio, quando comparado aos processos de crescimento tradicionais. Weldy & Huesemann (2007) ainda argumentaram que, para

a produção de lipídios, o percentual do conteúdo lipídico é menos importante do que o rendimento em biomassa.

Nesta pesquisa, focou-se na possibilidade da utilização do método de aumento do conteúdo lipídico em grande escala da biomassa de microalga *Chlorella* sp., com a possibilidade de produção de biodiesel a partir dessa biomassa. Assim, fica sugerido a opção pelo cultivo microalgal em meio com baixo teor de nitrogênio e com suplementação de CO₂, atentando-se às quantidades iniciais do teor de nitrogênio. O CO₂ utilizado para suplementação do meio de cultivo pode ser fornecido, por exemplo, por centrais elétricas a carvão, usinas de incineração de resíduos e outros processos que venham a dispersar o CO₂ no meio ambiente. Esse processo surge com importante papel no mecanismo de desenvolvimento limpo, como sugerido por Brown & Zeiler (1993) e Chelf et al. (1991).

4. CONCLUSÕES

A suplementação de CO₂ ao meio de cultivo proporcionou maior densidade celular e produtividade nas culturas de *Chlorella* sp. mas não influenciou o conteúdo de carboidratos, protéico e nem de lipídeos nas algas.

A concentração de nitrogênio no meio de cultivo não proporcionou diferenças de produtividade em relação ao controle, entretanto proporcionou aumento no conteúdo de proteínas hidrossolúveis. Baixa concentração de nitrogênio proporcionou aumento no conteúdo de carboidratos e lipídeos nas algas.

Visando-se possível utilização dos lipídios da microalga nativa *Chlorella* sp. como matéria prima para produção de biodiesel, sugere-se a utilização de um meio de cultivo com suplementação de CO₂ e com supressão do conteúdo de nitrogênio.

5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, FAPEMIG, Petrobrás e CAPES pelo apoio financeiro, a equipe do Laboratório de Ficologia e do Laboratório de Operações e Processo da Universidade Federal de Viçosa, que contribuíram de forma marcante para a realização desse trabalho.

6. REFERÊNCIAS

- ALONSO, D. L. Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. **Photochemistry**, n°54, p 461 – 471, 2000;
- BADGER, M.R., PRICE, G.D., CO₂ concentration mechanisms in cyanobacteria: Molecular components, their diversity and evolution. **Journal of Experimental Botany**. 54, 383, 609-622, 2003;
- BANERJEE, A., SHARMA, R., CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Botryococcus braunii: A renewable source of hydrocarbons and other chemicals. **Critical Reviews in Biotechnology** 22:245-79, 2002;
- BLIGH, G. E.; DYER, J. W. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**. v. 37, n. 3, p. 911-917, 1959;
- BOROWITZKA, M.A. Fats, oils and hydrocarbons. In Borowitzka M.A. and L.J. Borowitzka (ed.). *Micralgae biotechnology*. **Cambridge University Press**, Cambridge. 257-287, 1988;
- BRENNAN L., OWENDE, P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 805 (2009) 01–20. 2009;
- BROWN L. M.; ZEILER, K. G. – Aquatic biomass and carbon dioxide trapping. **Energy Conversion and Management**, 34, 1005-13, 1993;
- CASTRO ARAÚJO, S.; GARCIA, V. M. T. Growth and biochemical composition of the diatom *Chaetoceros cf. wighamii* brightwell under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. I. Protein, carbohydrates and lipids. **Aquaculture**, n. 246, p. 405-412, 2005;
- CHELF P, BROWN LM, WYMAN CE. Aquatic biomass resources and carbon dioxide trapping. **Biomass and Bioenergy**, 4:175–83, 1991;
- CHEN T.; ZHENG, W.; YANG, F.; BAI, Y.; WONG, Y. S. Mixotrophic culture of high selenium-enriched *Spirulina platensis* on acetate and the enhanced production of photosynthetic pigments. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 103-107 2006;
- CHISTI Y. An unusual hydrocarbon?; *J. Remy.Soc.*, 81. pp. 27-28, 1980;
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, 25: 294-306, 2007;
- COLLA, L. M.; B., T. E.; COSTA, J. A. V. Fatty acids of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. *Zeitschrift für Naturforschung*, v.59c, p.55- 59, 2004;

DE PHILIPPIS R, VINCENZINI M., Exocellular polysaccharide from cyanobacteria and their possible applications. **FEMS Microbiol Rev** 22:151–175, 1998 ;

DUNAHAY TG, JARVIS EE, DAIS SS, ROESSLER PG. Manipulation of microalgal lipid production using genetic engineering. **Appl Biochemistry and Biotechnology**, 57–58:223–31, 1996;

ESTEVEZ, F. A. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência – FINEP, 575 p., 1988;

FALKOWSKI, P. G.; RAVEN, J. A. **Aquatic Photosynthesis**. Oxford: Blackwell Science, 375 p., 1990;

FEDOROV, A.S., S. KOSOUROV, M.L. GHIRARDI AND M. SEIBERT, Continuous H₂ photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii* using a novel twostage, sulfatelimited chemostat system. **Appl. Biochemistry and Biotechnology**, 124: 403-12, 2005;

GAVRILESCU, M. & CHISTI, Y. Biotechnology--a sustainable alternative for chemical industry. **Biotechnology Advances** 23:471-99, 2005;

GORNALL, A. G.; BORDAWILL, C. S.; DAVID, M. M. The determination of protein by the biuret reaction. **Journal Biology Chemistry**, v. 177, p. 751-780, 1949;

GRANT, CORAL. **Characteristics of nitrogen- and iron-limited growth in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*, and in natural Phytoplankton population**, Thesis (Doctor in Philosophy). University of Auckland, 2001;

GROBBELAAR, J. U. Algal Biotechnology: real opportunities for África. **South African Journal of Botany**, n. 70 (1), p. 140-144, 2004;

HU Q, SOMMERFELD M, JARVIS E, GHIRARDI M, POSEWITZ M, SEIBERT M, DARZINS A., Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal**, 54: 621-639, 2008;

ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grow in low nitrogen medium. **Enzyme and Microbial Technology**., v. 27, p. 631-635, 2000;

ISHIDA, Y. et al. A highly CO₂-tolerant diatom *Thalassiosira weissflogii* H1, enriched from coastal sea, and its fatty acid composition. **Fisheries Science**, n. 66, p. 655-659, 2000;

KAIXIAN, Qian; BOROWITZKA, Michael A. Light and Nitrogen Deficiency Effects on the Growth and Composition of *Phaeodactylum tricornutum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 38, p. 93 – 103, 1993;

KAPDAN, I.K. AND F. KARGI, Biohydrogen production from waste materials. **Enzyme and Microbial Technology**, 38: 569-82, 2006;

KOCHERT, G. Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric method. In: HELLEMBUST, J. A., CRAIGIE, J. S. (eds.). *Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods*. Cambridge: Cambridge University, p. 95-97, 1978;

LEE, B.D.; APEL, W.A.; WALTON, M.R. Calcium carbonate formation *Synechococcus* sp. strain PCC 8806 and *Synechococcus* sp. strain PCC 8807. *Bioresource Technology*, n.97.p.2427-2434, 2006;

LÓPEZ, C. V. G.; GARCÍA, M. DEL C. C., FERNÁNDEZ, F. G. A.; BUSTOS, C. S.; CHISTI, Y.; SEVILLA, J. M. F., Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass, *Bioresource Technology*, 101, 7587–7591, 2010;

MATA, T.M., MARTINS, A.A., CAETANO, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14: 217-232, 2010;

MENDES, P. P. *Estatística Aplicada à Aqüicultura*. Recife: Bagaços, 265 p., 1999;

MENG X, YANG J, XU X, ZHANG L, NIE Q, XIAN M, Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renew Energy*. 34: 1-5, 2009;

METZGER, P. LARGEAU, C. *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Applied Microbiology and Biotechnology* 6 (25): 486–496, 2005;

MUTLU, Y. B.; IK, O. I.; USLU, L.; KOÇ, K.; DURMAZ, Y. A., The effects of nitrogen and phosphorus deficiencies and nitrite addition on the lipid content of *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae), *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(3), pp. 453-456, 2011;

NAGLE N, LEMKE P. Production of methyl-ester fuel from microalgae. *Appl Biochemistry and Biotechnology*;24–5:355–61, 1990;

OH-HAMA T, MIYACHI S. Microalgal biotechnology. (Borowitzka MA, Borowitzka LJ, editors) *Cambridge University Press*, Cambridge, 3–26, 1988;

OLAIZOLA, M.; DUERR, E. O.; FREEMAN, D. W. Effect of CO₂ enhancement in an outdoor algal production system using *Tetraselmis* sp. *Journal of Applied Phycology*, n. 3, p. 363-366, 1991;

OLIVERA, A. *Avaliação do valor nutricional das microalgas Chaetoceros calcitrans (PAULSEN) TAKANO e Tetraselmis tetrahele (KYLIN) BUTCH e do microcrustáceo Artemia franciscana (KELLOGG, 1906) utilizados como alimento inicial de larvas de Penaeus paulensis (PÉREZ FARFANTE, 1967)*. 1998. 128 f.. Tese (Doutorado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1998;

- OTERO A, VINCENZINI M., Extracellular polysaccharide synthesis by Nostoc strains as affected by N source and light intensity. **Journal of Biotechnology** 102:143–152, 2003;
- PACKER, A.; LI, Y.; ANDERSEN, T.; HU, Q.; KUANG, Y.; SOMMERFELD, M., Growth and neutral lipid synthesis in green microalgae: A mathematical model, **Bioresource Technology**, 102, 111–117, 2011;
- PARIKH A, MADAMWAR D., Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria. **Bioresource Technology** 97:1822– 1827, 2006;
- PATEL, A., MISHRA, S., PAWAR, R., GHOSH, P., K. Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. **Protein Expression and Purification**, v. 40, p. 248-255, 2005;
- PATIL, G.; CHETHANA, S.; SRIDEVI, A. S.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Method to obtain C-phycocyanin of high purity. **Journal of Chromatography A**, v. 1127, p. 76-81, 2006;
- PIORRECK, M., BAASZH, KLAUS-HINNERK AND POHL, P. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of fresh water green and blue-green algae under different nitrogen regimes. **Phytochem.**, 23: 207-216, 1984;
- RAVEN, J. A. Limits to growth. In: BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. (eds.). **Microalgal Biotechnology**, Cambridge: Cambridge University, p.331-356, 1988;
- REITH, J. H., ZESSEN, E., DRIFT, A., UIL, H., SNEIDER, E., BALKE, J., MATTHIJS, H. C. P., MUR, L. R., AND KILSDONK, K. Microalgal mass cultures for co-production of fine chemicals and biofuels & water purification. Presentation CODON Symposium, **Marine Biotechnology**, An ocean full of prospects 25th March, Wageningen, 2004;
- QUINN, J.; WINTER, L. DE ; BRADLEY, T., Microalgae bulk growth model with application to industrial scale systems, **Bioresource Technology**, 102, 5083–5092, 2011;
- REINEHR, C. O. **Estudo do cultivo semicontínuo de microalga Spirulina platensis utilizando água da lagoa Mangueira**. 2001. 132 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Alimentos) Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2001.
- REIS, A.; MENDES, A.; LOBO-FERNANDES, H.; EMPIS, J. A.; NOVAIS, J. M. Production, extraction and purification of phycobiliproteins from Nostoc sp. **Bioresource Technology**, v. 66, p. 181-187, 1998;
- RENAUD, S. M. et al. Effect of temperature on growth and fatty acid composition of tropical australian microalgae grown in batch cultures. **Aquaculture**, n. 211, p. 195-214, 2002;

ROESSLER PG, BROWN LM, DUNAHAY TG, HEACOX DA, JARVIS EE, SCHNEIDER JC, Genetic-engineering approaches for enhanced production of biodiesel fuel from microalgae. **ACS Symp Ser**, 566:255–70, 1994;

RODOLFI L, ZITTELLI GC, BASSI N, PADOVANI G, BIONDI N, BONINI G, Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, 102(1):100–12, 2008;

SANTOS, G. M. dos; MACEDO, R. V. T. de; ALEGRE, R. M. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de Spirulina máxima em duas temperaturas – Parte I: Alteração da Composição da Biomassa. **Ciência e Tecnologia em Alimentos**, Campinas, v. 23(Supl), 17–21, dez. 2003;

SAWAYAMA S, INOUE S, DOTE Y, YOKOYAMA S-Y. CO₂ fixation and oil production through microalga. **Energy Conversion and Management**, 36: 729–31, 1995;

SHEEHAN J, DUNAHAY T, BENEMANN J, ROESSLER P. A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program—biodiesel from algae. **National Renewable Energy Laboratory**, Golden, CO; 1998. Report NREL/TP-580–24190;

SHIFRIN, I. S.; CHISHOLM, S. W. – Phytoplankton lipids: Inespecific differences and effects of nitrate, silicate and light dark cycles. **Journal of Phycology**. v.17, p.374-384, 1981;

SINGH, NIRBHAY KUMAR; DHAR, DOLLY WATTAL, Nitrogen and phosphorous scavenging potential in microalgae, **Indian Journal of Biotechnology**, Vol 6, pp 52-56, 2007;

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

SUN, L.; WANG, S.; QIAO, Z. Chemical stabilization of the phycocyanin from cyanobacterium Spirulina platensis. **Journal of Biotechnology**, v. 121, p. 563-569, 2006;

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3^a ed. Porto Alegre: Artmed, 719p., 2004;

TEDESCO, M.A.; DUERR, E.O. – Light, temperature and nitrogen starvation effects on the total lipid and fatty acid content and composition of Spirulina platensis UTEX 1928. **Applied Phycology**, v.1, n.3, p.201-209, 1989.

YONGMANITCHAI, W.; WARD, P. Growth og and Omega-3 Fatty Acid Production by Phaeodactylum tricornutum under Different Culture Conditions. **Applied and Environmental microbiology**. February, p. 419 - 425. 1991;

WALTER, T. L.; PURTON, S.; BECKER, D. K.; COLLET, C., Microalgae as bioreactor. **Plant Cell Rep**. 24: 629–41, 2005;

WATANABE A. List of algal strains in the collection at the Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo. **The Journal of General and Applied Microbiology**, 6:283–92, 1960;

WELDY, C. S. & HUESEMANN, M. Lipid production by *Dunaliella salina* in batch culture: effects of nitrogen limitation and light intensity. U. S. Department of Energy, **Journal of Undergraduate Research** 7:115-122, 2007;

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

WU W-T, HSIEH C-H. Cultivation of microalgae for optimal oil production. **Journal of Biotechnology**, 136(Suppl. 1):S521–1521, 2008;

ZAK, E., NORLING, B., MAINTRA, R., HUANG, F., ANDERSSON, B., PAKRASI, B., The initial steps of biogenesis of cyanobacterial photosystems occurs in plasma membranes. **Plant Biology** 32, 13443-13448, 2001;

ZHU, M.; ZHOU, P. P.; YU, L. J. “Extraction of Lipids from *Mortierella alpina* and Enrichment of Arachidonic Acid from the Fungal Lipids,” **Bioresource Technology**., 84, 93, 2002;

**ARTIGO IV: COMPORTAMENTO REOLÓGICO DE SUSPENSÕES DA
MICROALGA NATIVA *Clhorella* sp.**

COMPORTAMENTO REOLÓGICO DE SUSPENSÕES DA MICROALGA NATIVA *Chlorella* sp.

RESUMO

Considerando o interesse crescente de novas matérias primas para o biodiesel, essa pesquisa teve por objetivo caracterizar o comportamento reológico da cultura da microalga nativa *Chlorella* sp. durante o cultivo em um meio com baixo teor de nitrogênio. O comportamento reológico do meio apresentado durante o cultivo foi do tipo não-Newtoniano com característica de dilatante, pois apresentou comportamento de viscosidade aparente crescente com o aumento da taxa de cisalhamento. O meio de cultivo exerceu influência no comportamento reológico da microalga *Chlorella* sp.. A viscosidade aparente do meio de cultivo com baixo teor de nitrogênio quando comparado ao meio de cultivo Watanabe foi menor. Este fato sugere que fatores como a densidade de células foi influenciada negativamente pela deficiência de nitrogênio no meio de cultivo, afetando, assim, as propriedades reológicas da suspensão. Propriedades como a quantidade, o tamanho e o volume das células da microalga *Chlorella* sp. podem ter sido influenciadas significativamente pelo meio de cultivo. Porém o índice reológico não demonstrou variações em função do meio de cultivo.

Palavras chave: microalgas, reologia, *Chlorella* sp., biodiesel.

RHEOLOGICAL BEHAVIOR IN THE CULTIVATION OF NATIVE MICROALGAE *CHLORELLA SP.*

ABSTRACT

Considering the growing interest of new raw materials for biodiesel, this research aimed to characterize the rheological behavior of the native culture of the microalgae *Chlorella* sp. during cultivation in a medium with low nitrogen content. The rheological behavior of the medium during cultivation was made of the non-Newtonian dilatant with characteristic, because it showed the behavior of apparent viscosity increased with increasing shear rate. The culture medium exerted influence on the rheological behavior of microalgae *Chlorella* sp .. The apparent viscosity of the medium with low nitrogen content when compared to the culture medium was lower Watanabe. This suggests that factors such as cell density was negatively influenced by nitrogen deficiency in the culture medium, affecting thus the rheological properties of the suspension. Properties such as quantity, size and volume of cells from the microalgae *Chlorella* sp. may have been influenced significantly by the medium. But the index did not show variations in rheological function medium.

Keywords: microalgae, rheology, *Chlorella* sp. Biodiesel.

1. INTRODUÇÃO

O Programa Nacional de Produção de Biodiesel vem incentivando a diversificação da matéria-prima para a produção de biodiesel. Entre as diversas matérias-primas para a produção de biodiesel, a biomassa de microalgas é aquela que apresenta a possibilidade de produção de biodiesel e permitirá a substituição sustentável do diesel (cerca de 40 bilhões de litros por ano).

As microalgas apresentam elevadas produtividades em biomassa seca, o que representa menor necessidade de área para o cultivo (TEIXEIRA; MORALES, 2007); a região de cultivo pode ser desértica e o solo pode estar degradado, já que o mesmo é somente utilizado como suporte para o sistema de cultivo; a produção da biomassa é contínua, não segue regime de safras; o meio de cultivo (que é aquoso) pode ser reaproveitado e como fontes de carbono podem ser utilizados o CO₂ residual de processos (BENEMANN, 1997) e fontes orgânicas residuais (VICHEZ et al., 1997). As microalgas apresentam maior eficiência fotossintética que os vegetais superiores e são eficientes fixadoras de CO₂ (BROWN; ZEILER, 1993). Portanto, são várias as vantagens do cultivo de microalgas em relação ao cultivo de oleaginosas; em relação, por exemplo, ao dendê, a oleaginosa de maior produtividade, as microalgas podem apresentar produtividade em óleo pelo menos cinco vezes superior.

As microalgas são cultivadas principalmente para a finalidade de suplemento alimentar, uso em aquicultura e extração de produtos de alto valor comercial. Não existem cultivos em escala comercial com a finalidade de produção de biodiesel; desta forma, não se tem informação sobre custos para este empreendimento; todavia, todos os projetos até agora implantados apresentam altos custos de implantação e de produção da biomassa (HUNTLEY; REDALJE, 2006). Estes custos são superiores ao custo de produção das oleaginosas utilizadas em geral (CÂMARA; HEIFFIG, 2006).

A viabilidade econômica da produção de biodiesel a partir de microalgas depende da diminuição nos custos de produção. Isto pode ser alcançado através do aumento da produtividade em biomassa e em óleo. É possível aumentar a produtividade em óleo por meio da utilização de algumas estratégias de manejo do cultivo, como por exemplo, diminuição na disponibilidade de nitrogênio (ILLMAN, 2000).

No desenvolvimento de novos projetos industriais, como é o caso do cultivo em larga escala de microalgas para matéria prima do biodiesel, a reologia possui grande importância. Segundo Campos *et al.* (1989), os dados reológicos são essenciais para os cálculos de engenharia de processos, envolvendo grande variedade de equipamentos,

tais como bombas, tubulações, misturadores, aeradores, trocadores de calor, dentre outros.

Nos cultivos microalgais, o escoamento não-newtoniano é geralmente o mais comum. Esses materiais têm sua viscosidade aparente aumentada gradualmente, à medida que aumenta a tensão de cisalhamento e, portanto, sua viscosidade não pode ser expressa por um único valor (SCHOTT, 1995). A viscosidade aparente pode ser obtida pela tangente em cada ponto da curva, obtida a partir de valores crescentes da tensão de cisalhamento (LEONARDI & MAIA CAMPOS, 2001). A viscosidade é uma expressão de resistência do fluido à deformação angular: quanto maior a viscosidade, maior a resistência ao escoamento (ALMEIDA, BAHIA, 2003).

Considerando-se a ausência de informações na literatura científica sobre estudos reológicos de cultivos microalgais, este trabalho foi concebido com o objetivo de analisar o comportamento reológico de suspensões em diferentes tempos de cultivo da microalga nativa *Chlorella* sp.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

O termo reologia, criado por M. Reiner e E.C. Bingham, provém da palavra Grega “*rheos*” e significa o estudo da deformação e fluxo da matéria, sendo que tal definição foi aceita pela Sociedade Americana de Reologia quando esta foi fundada em 1929 (BARNES et al., 1989, LAPASIN; PRICIL, 1995).

A reologia é a ciência que estuda as propriedades mecânicas dos materiais que determinam seu escoamento quando solicitados por forças externas. O campo da reologia estende-se desde a mecânica de fluidos newtonianos até a elasticidade de Hooke (BIRD et al., 2002).

Fluidos reais (ideais) deformam-se irreversivelmente, ou seja, quando tensões são aplicadas sobre esses materiais, eles escoam. A energia da deformação é dissipada dentro dos fluidos em forma de calor e não pode ser recuperada se a tensão aplicada for cessada. Aqui é importante ressaltar que devido ao escoamento, esses materiais são estudados na reologia, pela relação entre sua taxa de cisalhamento e tensão de cisalhamento (BARNES et al., 1989).

Para um fluido newtoniano ideal, a tensão de cisalhamento é função linear da taxa de cisalhamento e a constante de proporcionalidade para esta relação (μ) é chamada de viscosidade newtoniana (SHARMA et al., 2000).

O postulado de Newton introduziu o conceito de viscosidade, em que a tensão de cisalhamento (σ) ou “shear stress” foi relacionada à taxa de cisalhamento (γ) ou “shear rate”, por meio da equação:

$$\sigma = \eta\gamma \quad (1)$$

No sistema corrente (SI), é utilizado Pascal-segundo, cujo símbolo é Pa.s.

em que,

γ (s^{-1})= taxa de cisalhamento, também conhecida como taxa de deformação angular.

E a viscosidade η é dada por:

$$\eta = \sigma/\gamma \quad (2)$$

Onde σ = força aplicada sobre uma área = Pa

Os fluidos viscosos não-newtonianos não apresentam proporcionalidade entre a taxa de deformação e a tensão de cisalhamento (IBARZ & BARBOSA-CÁNOVAS, 1999). A viscosidade de fluidos não-newtonianos pode ser dependente ou independente

do tempo. A viscosidade aparente de fluidos não-newtonianos independente do tempo, à temperatura e de composição constantes, depende apenas da taxa de cisalhamento ou da tensão de cisalhamento (RAO & RIZVI, 1986).

Para fluidos não-newtonianos o termo viscosidade é substituído por η_{ap} que é a viscosidade aparente e é função do gradiente de velocidade. Entre os líquidos não Newtonianos podem ser citados alguns exemplos como:

Fluidos pseudoplásticos (Shear Thinning): Este tipo de fluido demonstra um decréscimo na viscosidade com um aumento na tensão de cisalhamento (FARIA-TISCHER, 2006), sendo que a taxa de cisalhamento versus a tensão de cisalhamento forma uma linha convexa (SHARMA et al., 2000). Esses fluidos em repouso apresentam um estado desordenado, e quando submetidos a uma tensão de cisalhamento, suas moléculas tendem a se orientar na direção da força aplicada. Quanto maior a tensão aplicada, maior será a ordenação. Consequentemente, a viscosidade aparente será menor (HOLDSWORTH, 1971).

Fluidos Dilatantes: Os fluidos dilatantes apresentam o comportamento inverso ao fenômeno da pseudoplasticidade, ou seja, a viscosidade do fluido aumenta à medida que aumenta a taxa de cisalhamento. Esse tipo de fluxo somente é encontrado em líquidos que contém uma alta proporção de partículas rígidas insolúveis em suspensão (SHARMA et al., 2000).

Fluidos Plástico ou de Bingham: O fluido de Bingham é aquele em que é necessária a aplicação de uma tensão inicial mínima, o ponto de ruptura ou “yield stress” para que o material comece a fluir. Ou seja, o sistema apresenta em repouso altas forças de interações intermoleculares, dando a substância um caráter sólido, que o impede de fluir, até que a força externa seja superior à força da rede, onde possamos observar o ponto de ruptura (BOURNE, 1982).

Fluidos tixotrópicos: Os fluidos desse grupo apresentam um comportamento reológico dependente do tempo. Um fluido tixotrópico é aquele no qual a viscosidade aparente diminui com o tempo quando o fluido é submetido a uma taxa de cisalhamento constante. Fluidos desse tipo são conhecidos por conter pequenas partículas (cristais ou biopolímeros) que são mantidos juntos por forças fracas. O cisalhamento do material separa as partículas agregadas e então ocorre uma menor resistência ao escoamento e a viscosidade decresce com o tempo até um valor constante ser alcançado (FARIA-TISCHER, 2006).

Fluidos reopéticos: Em alguns alimentos, a viscosidade aparente do fluido aumenta com o tempo quando sujeito a uma taxa constante de cisalhamento. Há diferentes razões para este comportamento. A mais importante é que o cisalhamento aumenta a frequência das colisões entre as moléculas ou partículas dos fluidos, que pode levar para um aumento de agregados e conseqüentemente um aumento na viscosidade aparente (FARIA-TISCHER, 2005).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultura e condições de cultivo

A microalga nativa *Chlorella* sp. foi coletada na Universidade Federal de Viçosa e isolada no Laboratório de Ficologia da mesma instituição. O cultivo foi realizado com o meio Watanabe (WATANABE, 1960) e em um meio com baixo teor de nitrogênio (ILLMAN, 2000). Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores, que consistiram de Erlenmeyer de 75 mL, com volume inicial de 50 mL, com agitação controlada por mesa de agitação orbital. O fotobiorreator permaneceu a uma temperatura controlada de 24 °C, com fotoperíodo de luz/escuro de 16/8 h, com intensidade luminosa de 66 $\mu\text{mol/s}$. O crescimento foi observado de forma a manter o meio estéril, recolhendo amostras diariamente durante o período 20 dias e avaliando quanto à contaminação.

3.2. Medidas reológicas

O aparelho utilizado neste estudo foi um reômetro rotacional, com cilindros concêntricos (S1), com sistema CR-Tests (3022.1), marca Rheotest modelo RN 4.1 (Rheotest, Alemanha). O procedimento de medida consiste em ajustar uma velocidade de rotação para o cilindro interno. Então, é medido o torque correspondente para cada velocidade de rotação. Os valores de torque e de velocidade rotacional são transformados, respectivamente, em tensão de cisalhamento e taxa de deformação. Após a obtenção das curvas de tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação é possível calcular a viscosidade das soluções por meio da análise de regressão.

As culturas microalgais foram colocadas no cilindro do reômetro e, mantendo a temperatura constante, as leituras de torque foram registradas. As velocidades rotacionais usadas situaram-se na faixa de (0,1 a 350) rpm, seguindo-se metodologia proposta por Michels et al. (2010), com algumas adaptações.

O objetivo deste estudo foi caracterizar o comportamento reológico do cultivo da microalga *Chlorella* sp. em meio Watanabe e em meio com baixo teor de nitrogênio.

3.3. Determinação da densidade relativa durante o cultivo da microalga nativa *Chlorella* sp.

A densidade relativa dos cultivos de microalga *Chlorella* sp. foram determinadas com o auxílio de um picnômetro. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os valores obtidos correspondem à média dos valores das densidades.

Para se proceder à medida da densidade relativa dos meios de cultivos, inicialmente os picnômetros foram calibrados com água destilada a 25 °C e, então, seu volume foi calculado. Em seguida, amostra do cultivo de cada dois dias de cultivo foi colocada no picnômetro e, por meio da determinação do peso das soluções e do volume do picnômetro calculado anteriormente, a densidade relativa foi obtida. Essa análise foi realizada para os cultivos de microalga no meio Watanabe e no meio com baixo teor de nitrogênio.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Curvas de tensão-deformação foram obtidas para as culturas da microalga *Chlorella* sp. em meio Watanabe e com baixo teor de nitrogênio a 24 °C e podem ser observadas nas Figuras 1 e 2.

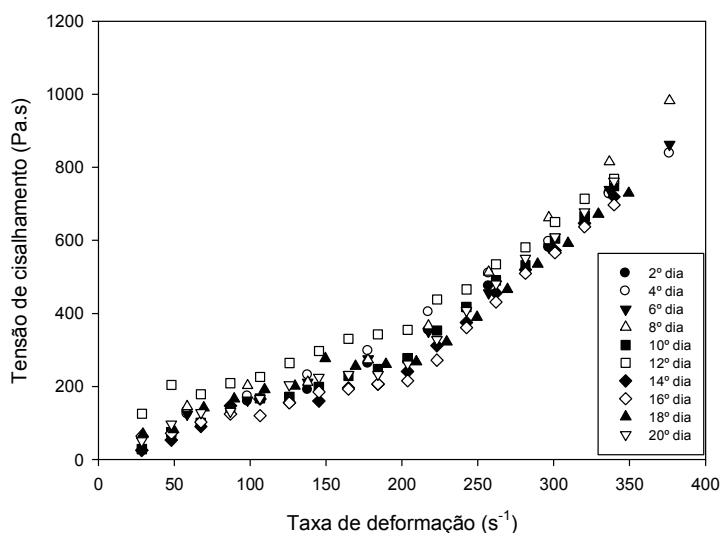


Figura – 1. Comportamento reológico durante os dias de cultivo de *Chlorella* sp. em meio Watanabe.

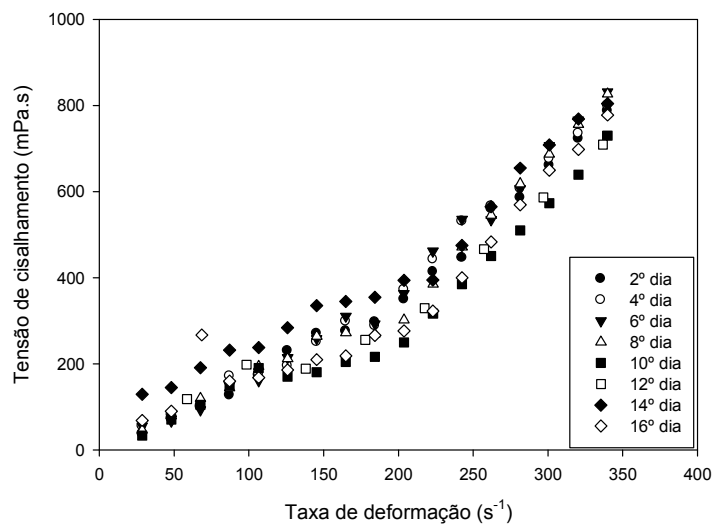


Figura – 2. Comportamento reológico durante os dias de cultivo de *Chlorella* sp. em meio com baixo teor de nitrogênio

Na figura 3 e Tabela 1 mostra-se a tendência dos valores dos índices de consistência no decorrer dos dias de cultivo de *Chlorella* sp. no meio de cultivo com baixo teor de nitrogênio. Observa-se aumento no valor do índice de consistência, do primeiro ao quarto dia de cultivo e uma diminuição no sexto e oitavo dia de cultivo, seguido de novo acréscimo do décimo ao décimo quarto dia de cultivo, em meio com baixo teor de nitrogênio. Como a densidade celular no meio de cultivo é alta, a tendência inicial dos parâmetros reológicos evidencia a fase de multiplicação celular. Nesta fase, as células de *Chlorella* sp., incorporam os nutrientes e realizam a síntese de novas células, proporcionando aumento na viscosidade aparente no cultivo microalgal. No sexto e oitavo dia ocorreu diminuição do índice de consistência, levando a uma provável estabilização em relação à multiplicação celular e possível morte de parcela das cepas. Com a excreção do suco celular no meio, ocorreu uma diminuição na viscosidade aparente. Este comportamento mostra a evolução da viscosidade aparente com um máximo de atividade celular no quarto dia de cultivo e posterior diminuição até o décimo dia, com renovação da atividade celular até o décimo quarto dia de cultivo. O comportamento reológico durante o cultivo da microalga *Chlorella* sp. em meio contendo baixo teor de nitrogênio, mostra-se com tendência a ser do tipo não newtoniano, porém se aproximando a um comportamento Newtoniano.

O modelo de Ostwald-De-Waele também conhecido como Lei da Potência, é bastante utilizado para descrever o comportamento reológico de fluidos, por ser um

modelo simples e de ampla aplicação (BRANCO e GASPARETTO, 2003). Muitos autores utilizaram o modelo de Ostwald-De-Waele para descrever o comportamento reológico de substâncias aquosas (SATO e CUNHA, 2009; BRANCO e GASPARETTO, 2003). Sendo assim, para a determinação do seu comportamento do cultivo de *Chlorella* sp. em meio contendo baixo teor de nitrogênio, utilizou-se o modelo Lei da Potência (Equação 3), e a viscosidade para fluidos não newtonianos pela Equação 4

$$\tau = K\gamma^n \quad (3)$$

$$\eta = K(\dot{\gamma})^{n-1} \quad (4)$$

sendo:

K = o índice de consistência [P.sⁿ];

n = o índice de comportamento [adimensional];

τ = a tensão de cisalhamento;

$\dot{\gamma}$ = a taxa de deformação (s⁻¹); e

η = a viscosidade (Pa.s)

Tabela 1. Parâmetros do modelo de Ostwald-de-Waele (Lei da Potência) durante o cultivo de *Chlorella* sp. em meio contendo baixo teor de nitrogênio.

Dias de cultivo de <i>Chlorella</i> sp. em meio com baixo teor de nitrogênio	k	Erro padrão	n	Erro padrão	R² ajustado
2 dias	0,25	0,07	1,37	0,05	98,98
4 dias	0,30	0,08	1,34	0,04	98,97
6 dias	0,22	0,06	1,40	0,05	98,99
8 dias	0,14	0,07	1,47	0,08	97,48
10 dias	0,07	0,04	1,56	0,11	96,04
12 dias	0,28	0,04	1,33	0,02	99,69
16 dias	0,15	0,13	1,45	0,16	90,50

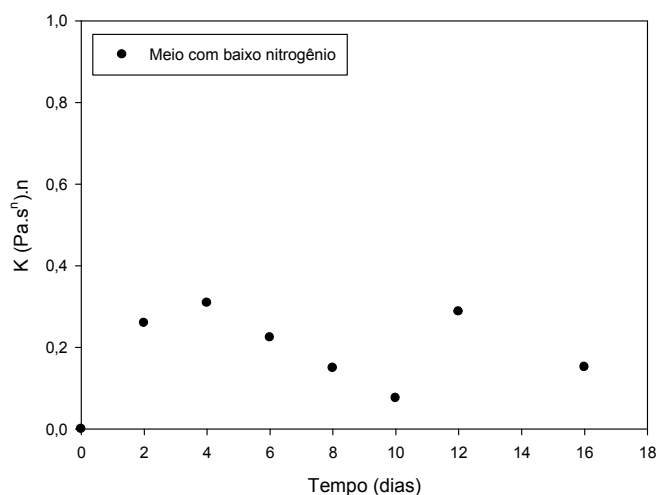


Figura – 3. Comportamento dos parâmetros reológicos durante os dias de cultivo de *Chlorella* sp. em meio contendo baixo teor de nitrogênio.

O comportamento da viscosidade aparente durante o cultivo em meio contendo baixo teor de nitrogênio está resumido na Figura 4. Os valores de viscosidade aparente durante o cultivo de *Chlorella* sp. em meio Watanabe variaram em máximo e mínimo de 2,48 mPa s a 1,51 no oitavo dia de cultivo e décimo sexto dia de cultivo, respectivamente. Os valores de viscosidade aparente durante o cultivo de *Chlorella* sp. em meio contendo baixo teor de nitrogênio variaram em máximo e mínimo de 2,08 mPa s a 1,56 no décimo dia de cultivo e décimo segundo dia de cultivo, respectivamente.

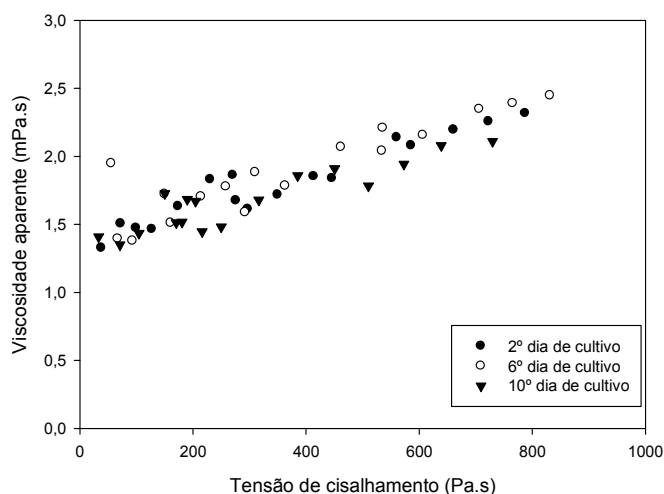


Figura – 4. Viscosidade aparente durante o cultivo de *Chlorella* sp. no meio com baixo teor de nitrogênio em função da tensão de cisalhamento aplicada.

A viscosidade aparente durante o cultivo de *Chlorella* sp. no meio Watanabe apresenta-se maior que a viscosidade aparente observada do meio contendo baixo teor de nitrogênio. Este fato sugere que fatores como a densidade de células foi influenciada negativamente pela deficiência de nitrogênio no meio de cultivo, afetando, assim, as propriedades reológicas da suspensão. Propriedades como a quantidade, o tamanho e o volume das células da microalga *Chlorella* sp. podem ser influenciadas significativamente pelo meio de cultivo (CHEN et al., 1997).

Em altas densidades celulares é possível que ocorram problemas na movimentação (aeração) dos cultivos microalgais, assim como na transferência de calor e de massa no meio. O comportamento reológico também implica na formação de zonas mortas quando as células microalgais forem cultivadas em fotobiorreatores com alta densidade celular (RUSSO, 2011).

Para que isso seja evitado, as células de *Chlorella* sp. precisam ser cultivadas sob as mais altas taxas de agitação possíveis. Todavia, deve haver preocupação, quanto ao consumo de energia no sistema utilizado (RUSSO, 2011).

Em culturas com baixa concentração celular, já foi observado comportamento Newtoniano, que tinha sua característica diferenciada para não-newtoniano quando em altas densidades que foram relatadas nos trabalhos de Reuss et al. (1982), Fatile (1985) e Chen et al. (1997). Observações semelhantes foram evidenciadas neste estudo.

Os dados experimentais de densidade relativa durante o cultivo da microalga nativa *Chlorella* sp. em meio Watanabe e em meio contendo baixo teor de nitrogênio são mostrados na Figura 5. Os valores correspondem às médias da densidade relativa nos dias de cultivo específicos, já que as análises foram realizadas em triplicata.

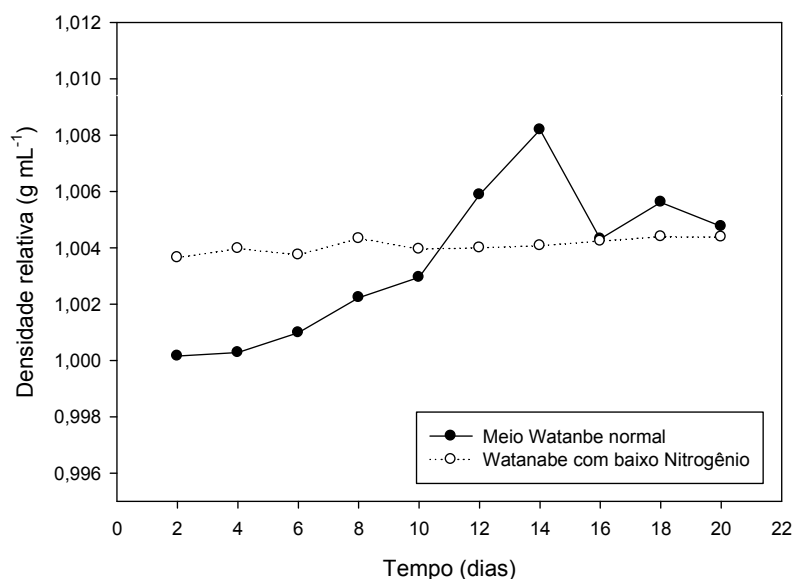


Figura – 5. Densidade relativa durante o cultivo de *Chlorella* sp. em meio Watanabe e em meio contendo baixo teor de nitrogênio.

A densidade relativa média aumentou durante o cultivo, o que já era esperado. Uma vez, que ocorreu aumento na concentração celular no meio pelo acúmulo de metabólitos pelas células microalgais e ainda a multiplicação celular. O aumento na densidade relativa durante o cultivo denota aumento nas taxas de crescimento das culturas e confirma o desempenho regular da microalga *Chlorella* sp. cultivada em meio contendo baixo teor de nitrogênio.

Verifica-se que, conforme a finalidade dos cultivos, pode-se utilizar condições específicas predeterminadas. Entretanto, na produção comercial de microalgas para bicompostíveis devem-se proporcionar condições que permitam a otimização e o rápido crescimento da espécie cultivada (MARCHIORI, 1996; LEE et al., 2000; CONVERTI, 2009). Neste contexto, a utilização do meio de cultivo contendo baixo teor de nitrogênio surge como promissora alternativa.

5. CONCLUSÕES

O modelo de Ostwald-de-Waelle proporcionou bom ajuste aos dados experimentais. O comportamento reológico durante o cultivo da microalga *Chlorella* sp. em meio Watanabe e em meio contendo baixo teor de nitrogênio, mostra-se com tendências a ser do tipo não newtoniano, com características dilatante, sendo esta característica mais evidente na suspensão formada no cultivo de algas em meio

Watanabe. No geral, foi observado aumento na viscosidade aparente durante o cultivo de *Chlorella* sp. conforme o aumento da tensão de cisalhamento aplicada. Observou-se, ainda, aumento na densidade relativa média durante o cultivo da microalga *Chlorella* sp. nos dois meios avaliados, sendo os maiores valores observados no meio Watanabe.

6. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, FAPEMIG, Petrobrás e CAPES pelo apoio financeiro, a equipe do Laboratório de Ficologia e do Laboratório de Operações e Processo da Universidade Federal de Viçosa, que contribuíram de forma marcante para a realização desse trabalho.

7. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, I. F.; BAHIA, M. F.. Reologia: interesse e aplicações na área cosmético-farmacêutica. **Cosmetics Toiletries**, v. 15, n. 3 , p.96-100, maio/jun. 2003
- BARNES, H. A., HUTTON, J. F., WALTERS, K. **An introduction to rheology**. 1. ed. New York: Elsevier, 199 p. (Rheology Series, 3), 1989;
- BENEMANN, J. R. – CO₂ Mitigation with microalgae systems. **Energy Conversion Management**, 38, S475-479, 1997;
- BIRD RB, STEWART WE E LIGHTFOOT. **Transsport Phenomena**, 2^a edição, John Wiley & Sons Inc, Nova Iorque. 2002;
- BRANCO, I.G.; GASPARETTO, C.A. Aplicação da metodologia de superfície de resposta para o estudo do efeito da temperatura sobre o comportamento reológico de misturas ternárias de polpa de manga e sucos de laranja e cenoura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23 (supl), p. 166-171, 2003.
- BROWN L. M.; ZEILER, K. G. – Aquatic biomass and carbon dioxide trapping. **Energy Conversion and Management**, 34, 1005-13, 1993;
- BOURNE, M. C., **Food texture and viscosity: concept and measurement**. New York: Academic Press, p.325, 1982;
- CÂMARA, G. M. S., HEIFFIG, L. S. - **Agronegócio de Plantas Oleaginosas: Matérias-Primas para Biodiesel**. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Dep. De Produção Vegetal, Piracicaba, São Paulo, 2006.
- CAMPOS, S. D.S. et al **Reologia e textura em alimentos**. Campinas: ITAL, 1989, 84p.
- CHEN, FENG; CHEN, HUI; GONG, XIANDI Mixotrophic and heterotrophic growth of aematococcus lacustris and rheological behaviour of the cell suspensions, **Bioresource Technology**, 62, 19-24, 1997;
- CONVERTI A., CASAZZA A.A., ORTIZ E.Y., PEREGO P. AND DEL BORGHI M., , 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**, 48, 1146–1151, 2009;
- FATILE, I. A. Rheological behaviour of concentrated yeast suspension **Journal of hemical Technology and Biotechnology**. 35, 94–100, 1985;
- FARIA-TISCHER, P. C. DE S. **Estrutura química, propriedades reológicas e Atividade antiviral das galactanas sulfatadas das algas vermelhas *Meristiella gelidium* e *Gymnogongrus griffithsiae* (gigartinales)**, Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em bioquímica e biologia molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006;

HOLDSWORTH, S. D. Applicability of rheological models to the interpretation of flow and processing behaviour of fluid food products. **Journal of Texture Studies**, v.2, n.4, p.393-418, 1971;

HUNTLEY, M. E.; REDALJE, D. G. CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal – Mitigation and Adaptation Strategies for **Global Change**, 2006;

ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grow in low nitrogen medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 631-635, 2000;

LEE, J. H., J. S. LEE, C. S. SHIN, S. C. PARK, AND S. W. KIM. Effects of NO and SO₂ on growth of highly-CO₂- tolerant microalgae, **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 10: 338-343. 2000;

LEONARDI , G. R .;MAIA CAMPOS , P. M. B . G. Estabilidade de formulações cosméticas. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, v. 3, n. 4, p.154-156, 2001;

MARCHIORI, M. A. **Guia ilustrado de maturação e larvicultura do camarão rosa *Penaeus paulensis* Pérez Farfante**, 1967. Rio grande: ed FURG, 79p. 1996;

MICHELS, MICHEL H. A; GOOT, ATZE J. VAN DER; NORSKER, NIELS-HENRIK; WIJFFELS, RENE´ H. Effects of shear stress on the microalgae *Chaetoceros muelleri*, **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 33:921–927, 2010;

RAO, M. A., & RIZVI, S. S. **Engineering properties of foods**, New York, Marcel Dekker, 1986;

REUSS, M.; DEBUS, D.; ZOLL, G. Rheological properties of fermentation fluids. **Journal of Chemical Engineering**. v.183, p.233-236.1982;

RUSSO, D. A. M. T. **Estudo do crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* numa água residual tratada, sob diferentes condições de fotoperíodo e temperatura**, Dissertação apresentada à Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Lisboa, 2011

SATO, A. C. K; CUNHA, R. L. da; Effect of particle size on rheological properties of jaboticaba pulp. **Journal of Food Engineering**. V. 91, (566-570), 2009;

SCHOTT, H. Reologia. **In: Remington Pharmacia**. 19. ed. Phennsylvania: Mack Publishing Company, 1995. p. 426- 455.

SHARMA, S. K., MULVANEY, S. J., RIZVI, S. S. H. **Food processing engineering : theory and laboratory experiments**. United States of America : Wiley-Interscience. 348p. 2000;

TEIXEIRA C. M.; MORALES M. E. Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel. **Revista: Biodiesel o Novo combustível do Brasil**, pp. 91–6, 2007;

VICHEZ, C.; GARBAYO, I.; LOBATO M. V.; VEGA, J. M. – Microalgae-mediated chemicals production and waste removal. **Enzyme Microbial Technology**, 20, 562-72, 1997;

WATANABE A. List of algal strains in the collection at the Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo, **The Journal of General and Applied Microbiology**, 6:283–92, 1960;

ARTIGO V: SEPARAÇÃO DA BIOMASSA DE *Chlorella* sp. EM MEIO DE CULTIVO CONTENDO BAIXO TEOR DE NITROGÊNIO

SEPARAÇÃO DA BIOMASSA DE *Chlorella* sp. EM MEIO DE CULTIVO CONTENDO BAIXO TEOR DE NITROGÊNIO

RESUMO

A separação da biomassa de microalgas do meio de cultivo geralmente requer um ou mais processos de separação sólido-líquido. A cultura ou caldo microalgal é diluída (0,5 a 4 kg m⁻³ de biomassa seca) e, conseqüentemente, grandes volumes precisam ser manipulados para a obtenção da biomassa. Não existe um método de separação bem definido, podendo ser adaptado um ou uma junção de métodos para cada caso. A recuperação microalgal representa de 20 a 30% do custo total da produção de biomassa. Com isso, no presente trabalho, objetivou-se avaliar a sedimentação, centrifugação e a influência das condições de coagulação/floculação, que maximizem a remoção da biomassa de *Chlorella* sp. em suspensão no meio de cultivo contendo baixo teor de nitrogênio, visando a possibilidade da utilização da biomassa como matéria prima para a produção do biodiesel. Da análise dos dados do processo de sedimentação, conclui-se que um elevado tempo de processo seria necessário em um sedimentador industrial, resultando em unidades de grandes volumes, capazes apenas de concentrar a biomassa microalgal em torno de 40 % em massa seca. Foi observado que a floculação com Fe₂(SO₄)₃ e Al₂(SO₄)₃ é capaz de separar mais de 80 % das células de *Chlorella* sp. em tempo inferior a uma hora. Por fim, foi verificado que a centrifugação a 600 rpm foi capaz de separar mais de 90 % das células de *Chlorella* sp. em 5 minutos de processo.

Palavras-chave: *Chlorella* sp.; biodiesel; processo de separação; biomassa.

SEPARATION OF BIOMASS *Chlorella* sp. IN THE MIDDLE GROWING WITH LOW NITROGEN PERCENTAGE

ABSTRACT

The separation of the biomass of the microalgae middle culture usually requires one or more process of solid-liquid separation. Microalgae culture or broth are diluted (0.5 to 4 kg m⁻³ dry biomass) and, consequently, large volumes need to be manipulated to obtain the biomass. There is no exists a separation method well defined, it can be adapted one or make a junction of methods for each case. Recovering microalgae represents 20 to 30% of the total cost of biomass production. Thus, this study seek to evaluate the sedimentation, centrifugation and the influence of the conditions of coagulation / flocculation, which maximize the removal of the biomass of *Chlorella* sp. hanging in culture middle with low nitrogen percentage, aiming at the possibility of using biomass as raw material for biodiesel. From the data analysis process of sedimentation, we conclude that a high processing time would be needed in an industrial sedimentation, resulting in units of large volumes only able to focus microalgae biomass nearly 40% in dry weight. It was observed that flocculation with Fe₂(SO₄)₃ and Al₂(SO₄)₃ is able to separating more than 80% of the cells of *Chlorella* sp. in less than an hour. Finally, it was found that centrifugation at 600 rpm was able to separate more than 90% of the cells of *Chlorella* sp. in 5 minutes processing.

Keywords: *Chlorella* sp.; Biodiesel; separation process, biomass.

1. INTRODUÇÃO

Estudos envolvendo o uso de microalgas na produção de biocombustível têm sido intensificados em função do advento de alterações climáticas globais, na busca de fontes renováveis de energia que não venham a competir diretamente com a produção de alimentos, além da emergencial depleção e redução na concentração de gás carbônico na atmosfera (NAGLE & LEMKE, 1990; GAVRILESCU & CHISTI, 2005). Outro fato relevante para a produção de microalgas é a possibilidade da utilização dos co-produtos da extração do óleo para diversos fins, inclusive o estudo da potencial atividade biológica apresentada pelos extratos e frações obtidos desse material (HONG et al., 2008; CHANG et al., 2008; STAUBER, 1998).

Diferentes tipos de biocombustíveis são originados de microalgas. O gás metano pode ser gerado por meio da digestão aeróbica da biomassa de microalgas como matéria-prima (SPOLAORE et al., 2006). O diesel vegetal pode ser obtido por meio de dois processos distintos: o diesel, oriundo da pirólise do óleo ou da biomassa; e o biodiesel, produzido por meio da transesterificação dos triglicerídeos presentes na fração lipídica da biomassa (BANERJEE et al., 2002; GAVRILESCU & CHISTI, 2005).

O cultivo de microalgas para a obtenção de biomassa e de seus produtos de síntese é uma atividade industrial estabelecida em escala comercial em alguns países, estando a produção está a cargo de grandes empresas. Segundo Spolaore et al. (2006), atualmente, a indústria de biomassa de microalgas produz mais de 5000 t de massa seca/ano, gerando renda superior a US\$ 1,25 bilhões por ano, não incluindo os produtos processados, o que demonstra o potencial de exploração deste tipo de processo biotecnológico. Porém, MOLINA-GRIMA (2003) alerta para um dos fatores que pode onerar consideravelmente o custo de produção da biomassa microalgal, trata-se do processo de separação da biomassa no meio de cultivo. A recuperação da biomassa geralmente requer um ou mais processos de separação sólido-líquido. A cultura ou caldo microalgal é diluída (0,5 a 4 kg m⁻³ de biomassa seca) e, conseqüentemente, grandes volumes precisam ser manipulados para a obtenção da biomassa. Não existe um método de separação bem definido, podendo ser adaptado um ou uma junção de métodos para cada caso. A recuperação microalgal representa de 20 a 30% do custo total da produção de biomassa (MOLINA-GRIMA, 2003).

O método de separação deve ser capaz de demandar os grandes volumes típicos do processamento de biomassa microalgal. Em alguns casos a recuperação da biomassa

por filtração pode ser insatisfatória, devido ao fato do procedimento ser relativamente lento. Para produtos de baixo valor comercial, tais como biocombustíveis, a sedimentação, precedida por floculação, pode ser a melhor escolha. Tanques agitados são, geralmente, utilizados na recuperação da biomassa, tendo-se como base os processos de tratamento de esgoto (PORTELLA et al., 2003). E para esses sistemas os métodos de floculação e flotação são, geralmente, utilizados para separação da biomassa microalgal (KNUCKEY et al., 2006). Há, ainda, a utilização de centrifugas, porém, apesar de centrifugas processarem grandes volumes de água colonizada por algas, em tempo relativamente curto, e toda a biomassa permanecer no recipiente durante o procedimento de recuperação, o método de centrifugação só é viável para produtos de alto valor agregado (SPOLAORE et al., 2006; BENEMANN, 2008).

Outra consideração a ser feita na escolha do método de recuperação é o nível aceitável de umidade do produto recuperado. O lodo sedimentado por gravidade é mais diluído que a biomassa recuperada por centrifugação. Alto teor de água no produto recuperado pode influenciar substancialmente nos custos de obtenção do produto final (ANDREOLI, 2001).

No presente trabalho, objetivou-se avaliar a sedimentação, centrifugação e a influência das condições de coagulação/floculação, que maximizem a remoção da biomassa de *Chlorella* sp., em suspensão no meio de cultivo contendo baixo teor de nitrogênio, visando-se a possibilidade da utilização da biomassa como matéria prima para a produção do biodiesel.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cultura e condições de cultivo

A microalga de água doce *Chlorella* sp. foi coletada nos reservatórios da Piscicultura da Universidade Federal de Viçosa e isolada no Laboratório de Ficologia da mesma instituição.

Os cultivos foram realizados em meio contendo baixo teor de nitrogênio, constituído por 203 mg L⁻¹ de (NH₄)₂ HPO₄, 2,236 g L⁻¹ de KCl, 2,465 g L⁻¹ de MgSO₄, 1,361 g L⁻¹ de KH₂PO₄ e 10 mg L⁻¹ de FeSO₄. O meio de cultivo teve o valor de pH fixado em 6, sendo posteriormente acondicionado em autoclave, como sugerido por Illman (2000).

Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores de 20 L, com volume inicial de 16 L. O fotobiorreator permaneceu a temperatura ambiente de ± 25 °C, com fotoperíodo de luz/escuro de 16/8 h, com intensidade luminosa de $83 \mu\text{mol s}^{-1}$ e aeração constante. Como fonte de carbono suplementar, foi utilizado o CO_2 , produzido por processo fermentativo. Neste processo, foi usado fermento biológico comercial, açúcar e bicarbonato de sódio, disposto de forma que a aeração do meio de cultivo pudesse ser suplementada com o CO_2 gerado por essa cultura. O crescimento foi observado de forma a manter o meio estéril, recolhendo-se amostras em dias alternados durante o período de 14 dias e avaliando-se o nível de contaminação e o valor de pH.

2.2. Sedimentação

Para avaliação da sedimentação da cultura microalgal, foi realizado o ensaio em coluna de sedimentação de acrílico, de 100 mm de diâmetro e 1,00 m de altura. O preenchimento da coluna de sedimentação com a cultura de microalga de *Chlorella* sp. foi realizado de forma a manter, inicialmente, a concentração de sólidos suspensos uniformemente distribuída ao longo da mesma, sendo, para isso, feita uma homogeneização da amostra. Logo após o preenchimento da coluna com a cultura microalgal, uma haste metálica de 1,20 m foi introduzida no tubo para efetuar a mistura da suspensão, realizada por meio de movimentos circulares, durante o período de 1 minuto, em todos os ensaios. Após a realização da mistura, a suspensão contida no tubo de sedimentação foi deixada em repouso. A coleta de amostras da suspensão em estudo foi realizada a cada 0,20 m de profundidade da coluna líquida, por meio de torneiras instaladas nas paredes da coluna de sedimentação (Figura 1). Alíquotas de 10 mL do meio contendo microalgas foram coletadas, de cima para baixo, ao longo da coluna (0, 20, 40, 60 e 80 cm), no tempo zero e em intervalos de tempos regulares de 30 minutos (0, 30, 180, 240, 300, 360 e 480 min.)

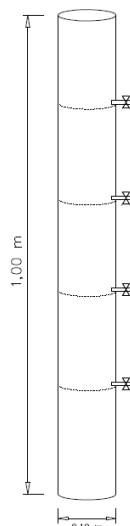


Figura – 1. Desenho esquemático da coluna de sedimentação

Fonte: Matos et al. (2006).

A concentração da biomassa foi determinada por meio da medida de densidade ótica das culturas em espectrofotômetro a 670 nm, utilizando curva padrão que relaciona densidade ótica com massa seca de biomassa (RADMANN et al., 2007).

Foram realizadas diluições sucessivas de um volume fixo de massa celular da microalga *Chlorella* sp. (COSTA et al., 2006), concomitantemente à leitura em espectrofotômetro a 670 nm (COSTA et al., 2002). Foi traçada a curva-padrão absorvância *versus* biomassa (g L^{-1}), por meio da qual, com posterior regressão linear, obteve-se a seguinte equação:

$$\text{Conc.} = 0,4283\text{abs} - 0,0181$$

em que;

Conc. = Concentração de biomassa de *Chlorella* sp. em meio contendo baixo teor de nitrogênio.

abs = Absorvância a 670 nm.

2.3. Ensaio com coagulante utilizando “Jar-test”

Para a realização deste ensaio, a cultura microalgal de *Chlorella* sp., obtida após o tempo de cultivo no Laboratório de Ficologia da Universidade Federal de Viçosa, foi levada ao Laboratório de Qualidade da Água do Departamento de Engenharia Agrícola, da mesma instituição, sendo transportada em galão de 20 L e armazenada sob condições de iluminação e aeração adequadas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Sedimentação

Os resultados do ensaio de sedimentação da cultura de microalga *Chlorella* sp. em meio contendo baixo teor de nitrogênio estão apresentados na Tabela 1 e Figura 2, observa-se que para um mesmo tempo, as diferentes alturas expressaram percentuais de remoção diferentes.

Tabela 1 – Porcentagem de remoção de sólidos para a sedimentação de *Chlorella* sp.

Profundidade (cm)	Tempo (min.)						
	0	30	180	240	300	360	480
20	0,0	0,52	-6,79	15,14	11,23	21,67	13,58
40	0,0	1,31	12,79	27,42	28,98	33,42	18,54
60	0,0	6,53	12,01	8,88	20,89	22,72	47,26
80	0,0	13,58	23,76	31,85	45,69	44,65	52,22

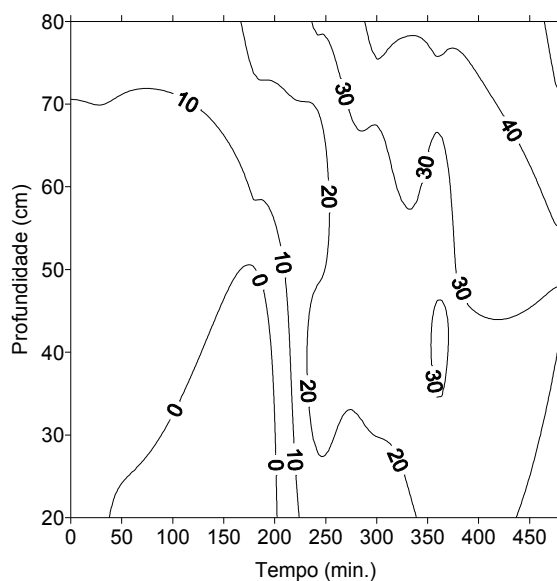


Figura 2. Isocurvas a porcentagem de remoção de sólidos.

A teoria da sedimentação baseia-se na hipótese de que qualquer partícula não coloidal, suspensa em meio líquido em repouso, de menor massa específica, será acelerada pela gravidade até que as forças de resistência viscosa e de deformação do líquido sejam iguais à resultante do peso específico da partícula (OLIVEIRA, 2005). A partir de então, a velocidade será constante, conhecida como velocidade de sedimentação

(DI BERNARDO, 1993). Estas partículas são denominadas partículas discretas, isto é, partículas cuja forma, densidade ou tamanho não se alteram.

Porém, as microalgas comportam-se como partículas não discretas ou como floculentas (OLIVEIRA, 2005). Estas se aglomeram formando flocos que tendem a crescer à medida que sedimentam, de maneira que, por aumentarem de tamanho, tem sua velocidade maior e crescente.

Naturalmente, foi observado que à medida que a profundidade aumentava, a porcentagem de remoção foi maior, devido à concentração de partículas mais grosseiras e do efeito do arraste dos primeiros flocos sobre os localizados abaixo destes, como citado nos estudos de Oliveira (2005), Di Bernardo (1993) e Von Sperling (1996). Esta constatação pode ser verificada na Figura 2, onde a maior remoção é verificada na região superior e esquerda, que corresponde à parte mais profunda da coluna e após os 300 minutos de sedimentação. Segundo Ramalho (1996), a velocidade de sedimentação das partículas aumenta, devido ao efeito de coalescência com outras partículas. Como a floculação ocorre à medida que as partículas se dirigem para o fundo, quanto mais chances de contato elas tiverem, maior a formação de flocos, assim sendo, a sedimentação floculenta tem a sua eficiência aumentada com o aumento da profundidade H e do tempo t .

Algumas divergências a este raciocínio foram encontradas entre as alturas de (40 e 60) cm para os tempos de (180, 240, 300 e 360) minutos. Isto pode acontecer devido ao tamanho mínimo das células, que podem permanecer em suspensão por longos períodos sem sedimentarem. O comportamento de sedimentação linear em relação ao tempo é geralmente verificado para soluções diluídas. Desvios deste comportamento ocorrem durante a compactação e ao adensamento das partículas. Estes desvios podem ser justificados, ainda, pela carga elétrica das células.

Observou-se, para uma mesma profundidade, aumento na porcentagem de remoção de células à medida que o tempo de sedimentação aumentou, confirmando os estudos de Oliveira (2005), Di Bernardo (1993) e Von Sperling (1996). A exceção deu-se para a profundidade de 20 e 40 cm ao tempo de 480 minutos, que apresentou percentual de remoção de células inferior à obtida no tempo de 360 minutos. Este fato também foi constatado na profundidade de 20 cm entre os tempos (30 e 180) minutos, e na profundidade de 60 cm entre os tempos de (180 e 240) minutos. Isto pode ser explicado pelo fato de a maior parte das células já terem decantado, restando para

sedimentar as partículas mais finas, de mais difícil remoção ou pelo potencial de ressuspensão das diminutas partículas.

Shelef et al. (1984), afirmam que para remover partículas finas com diâmetro de poucos microns estas devem ser induzidas a formar grandes flocos que possuem velocidade de sedimentação razoável.

Nos decantadores reais, a floculação ocorre à medida que as partículas dirigem-se ao fundo. Portanto, quanto mais chances de contato elas tiverem, maior a formação de flocos. Por conseguinte, a sedimentação floculenta da microalga *Chlorella* sp. pode ter sua eficiência melhorada com o aumento da profundidade do tanque e do tempo médio de detenção. No entanto, a área superficial do decantador e a taxa de escoamento superficial são os variáveis ainda mais importantes a serem considerados (Di Bernardo, 1993; Von Sperling, 1996). Segundo Kawamura (2000), existem diversos fatores que podem afetar o processo de sedimentação em tanques de cultivo, tais como as características do meio de cultivo, a velocidade de sedimentação das partículas suspensas, as condições climáticas, as características geológicas do local, as variações de vazão, a ocorrência de curtos-circuitos hidráulicos, método de remoção da biomassa.

Por meio do ensaio de sedimentação, foi possível verificar que o tempo de residência em um decantador industrial seria muito elevado (8 horas ou 480 minutos) e atingindo remoção de sólidos pouco acima de 50 %, sendo necessário o emprego de uma segunda unidade de decantação, de grande volume. Isso justifica o uso de coagulantes, que foi testado em um ensaio seguinte.

Segundo Molina-Grima (2003), os coagulantes mais indicados para separação de culturas microalgais são sulfato de alumínio ($Al_2(SO_4)_3$), cloreto férrico ($FeCl_3$), sulfato ferroso ($FeSO_4$), sulfato férrico ($Fe_2(SO_4)_3$), cloreto de polialumínio ($Al(OH)_x(Cl)_y$) e polímeros catiônicos. Relata ainda, que o tipo e a dosagem do coagulante dependem de alguns fatores como a natureza da microalga a ser separada e as características químicas do meio de cultivo.

3.2. Floculação

Segundo Arboleda (1992), o processo de coagulação-floculação é usado para facilitar a remoção de turbidez orgânica e inorgânica, cor verdadeira e aparente e ajudar na eliminação de bactérias, vírus, patógenos, algas e plânctons em geral, bem como substâncias produtoras de sabor e odor.

A floculação tem sido investigada como processo de separação de microalgas a ser adotado em nível industrial. Diante do exposto, dois flocculantes conhecidos foram testados, o sulfato de alumínio e o de ferro.

Os testes de floculação foram realizados com o meio de cultivo que propiciou maior concentração de lipídeos (Experimento 3). Nas Figuras 3 e 4, observam-se os resultados dos ensaios efetuados com a adição do coagulante sulfato de alumínio e do sulfato férrico, respectivamente.

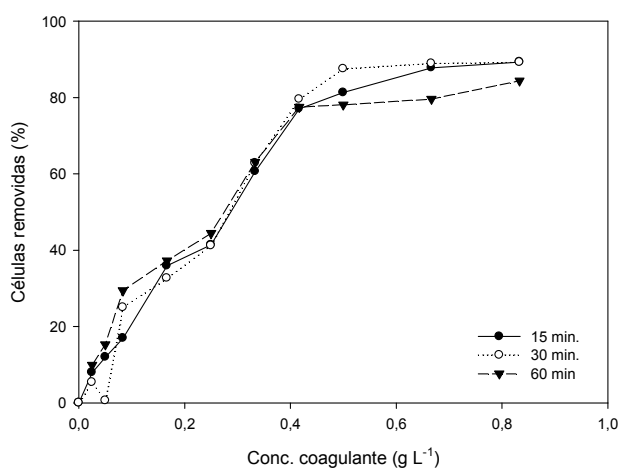


Figura 3- Ensaios de floculação com sulfato de alumínio da cultura da microalga *Chlorella* sp. em meio contendo baixo teor de nitrogênio.

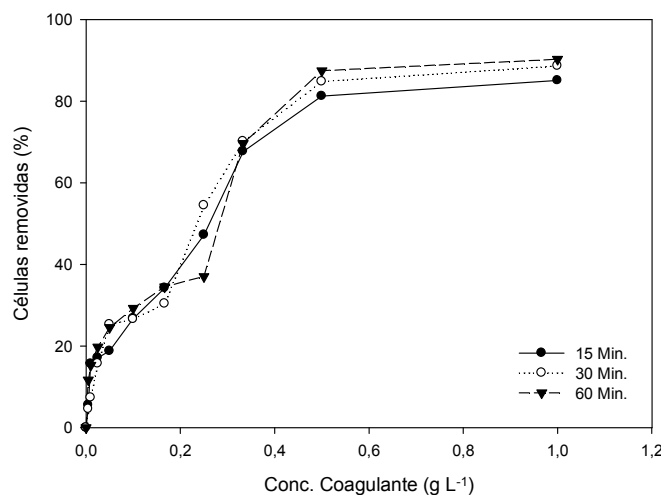


Figura 4- Ensaios de floculação com sulfato de ferro da cultura da microalga *Chlorella* sp. em meio contendo baixo teor de nitrogênio.

Na utilização de sulfato de alumínio (Figura 3), as porcentagens de remoção para a concentração de 0,50 g L⁻¹ foram superiores às obtidas com o sulfato de ferro, para os tempos de (15 e 30) minutos. Para os tempos de (15, 30 e 60) minutos, a porcentagem

de remoção foi 81,3 %, 87,5 % e 78,1 %, respectivamente. A adição de mais coagulante mostrou-se significativa apenas para os tempos de (15 e 60) minutos, nos quais a porcentagem de remoção aumentou para 89,3 % e 84,4 %, respectivamente, para a concentração de 0,83 g L⁻¹ de sulfato de alumínio.

No ensaio realizado com sulfato de ferro (Figura 4), verificou-se boa porcentagem na remoção de sólidos, em todos os intervalos de tempo, na dose de coagulante em torno de 0,50 g L⁻¹. A adição de mais coagulante influenciou pouco na remoção de células, de maneira que para o tempo de 15 minutos, a remoção aumentou de 81,2 % para 85,1 % para concentrações de coagulantes de 0,50 g L⁻¹ e 1,00 g L⁻¹, respectivamente. No tempo de 30 minutos o aumento foi de 84,8 % para 88,6 % e para 60 minutos de 87,5 % para 90,3 %, para a mesma alteração de concentração de coagulante.

O comportamento evidenciado no ensaio com sulfato de alumínio, mostrou certa lentidão no processo de decantação das células microalgais floculadas. O mecanismo de coagulação ocorrente está relacionado à desestabilização das partículas coloidais, que consiste em minimizar ou eliminar as forças de repulsão entre elas, podendo ocorrer de diferentes formas. Os mecanismos de desestabilização das partículas podem ser: compressão da dupla camada elétrica; adsorção e neutralização de carga; varredura; e adsorção e formação de pontes. A desestabilização pode ocorrer por meio de um mecanismo ou pela combinação de mecanismos distintos. Os sais de alumínio e de ferro, quando adicionados à água, sofrem reações de hidrólise, produzindo espécies hidrolisadas em solução, que não são íons indiferentes, e hidróxidos, que precipitam quando o limite de solubilidade é excedido. A formação e equilíbrio entre as espécies hidrolisadas dependem da dosagem do coagulante e do pH de coagulação (OLIVEIRA, 2005).

No mecanismo de adsorção e neutralização de cargas com uso de sulfato de alumínio e ferro, como os avaliados nos ensaios efetuados neste trabalho, o íon positivo adicionado não é um íon indiferente e tem maior afinidade pela superfície da partícula do que pela água, sendo adsorvido na superfície do colóide, reduzindo sua carga, e, por consequência, as forças de repulsão, podendo, dessa forma, neutralizar a carga da partícula ou promover sua restabilização (reversão de carga), se houver disponibilidade de coagulante e superfície livre no colóide. Segundo Masschelein (1992), a adsorção de íons na superfície do colóide não é regida pela carga superficial da partícula, assim, qualquer energia que se aplique no sistema provocará a agregação das partículas. Como,

para a formação posterior do floco, a partícula não precisa ser necessariamente neutralizada, alguns pesquisadores (BERNHARDT, 1991; BERNHARDT, 1994; CHOW et al., 1998; DRIKAS et al., 2001) preferem denominar esse mecanismo de adsorção e desestabilização de cargas.

Outros autores afirmam que o alumínio é o floculante efetivo de *Scenedesmus* e *Chlorella* (GOLUEKE & OSWALD, 1965). Contudo, a floculação por sais de metal podem ser inapropriadas dependendo do uso pretendido da biomassa.

Utilizando uma faixa de pH de 5,3 a 5,6, Moraine et al. (1980) e Friedman et al. (1977) encontraram doses ótimas de sulfato de alumínio para floculação de microalgas na ordem de 80 a 250 mg L⁻¹, enquanto que, para o uso de sulfato de ferro, na faixa de pH de 3,0 a 9,0, a dose ótima encontrada foi de 50 a 90 mg L⁻¹ (FUNK et al., 1969; BARE et al., 1975).

Para sedimentação de *Microcystis aeruginosa*, Vlaski et al. (1996) conseguiram, com pH 8 e coagulante sulfato de ferro a 10 mg L⁻¹, a remoção de 87 % das células.

De acordo com Sheehan et al. (1998), o uso de coagulantes é muito caro para a produção de biocombustíveis, devendo-se combinar técnicas de separação para barateamento do processo como flotação, biofloculação e autofloculação.

A autofloculação é induzida por pH alto, na presença de fosfato ou cátions bivalentes (Mg²⁺ e Ca²⁺) e floculação induzida pela limitação de nitrogênio (SHEEHAN et al., 1998).

Lacerda et al. (1996) estudaram a influência do pH e do tempo de floculação no processo de flotação por ar dissolvido em água residuária contendo algas. Observou-se que, para todos os valores de pH, nos ensaios em que a dosagem de coagulante propiciou a formação de flocos, foi possível obter elevados níveis de remoção de algas, atingindo-se, em casos pontuais, remoções próximas de 100%, comprovando a alta eficiência da flotação de ar dissolvido no processo de remoção de algas, conforme também relatado em diversas pesquisas (EDZWALD & WINGLER, 1990; GEHR et al., 1993; JANSSENS & BUEKENS, 1993; REALI & GIANOTTI, 1993; EDZWALD, 1993; VLASKI et al., 1996).

3.3. Centrifugação

A biomassa de microalgas pode ser obtida por meio de diversos processos como: floculação química, eletrofloculação, sedimentação, decantação, filtração, centrifugação

(HEASMAN et al., 2000; HEASMAN et al., 2001) ou ainda, por meio da combinação entre estes (PONIS et al., 2003).

O método de centrifugação, além de ser o mais viável, é o que tem apresentado os melhores resultados para a obtenção de grande biomassa visando-se a produção de composto de alto valor a partir de microalgas (MONTAINI et al., 1995; MCCAUSLAND et al., 1999; HEASMAN et al., 2000; HEASMAN et al., 2001; ROBERT et al., 2001). Como vantagem, este processo possibilita melhorar a qualidade da biomassa, por meio da diminuição das bactérias agregadas às células e em suspensão, no meio de cultivo (VIEIRA, 1975; NELL & O'CONNOR, 1991; HEASMAN et al., 2000).

Os resultados para os ensaios de centrifugação da biomassa das microalgas *Chorella* sp. foram expressos em termos de porcentual de remoção de sólidos, avaliando-se a concentração do sobrenadante em relação à concentração inicial, ou seja, do meio de cultivo. A porcentagem de remoção de sólidos é apresentada na Tabela 2 e na Figura 5.

Tabela 2 – Porcentagem de remoção de sólidos para a centrifugação de *Chlorella* sp.

Tempo (min.)	300 g	600 g	1400 g	2200 g	3000 g
5	35,28	88,71	98,94	95,81	99,32
10	35,78	91,06	99,15	98,61	99,70
15	35,88	94,57	99,39	98,70	99,76
30	46,50	94,22	99,73	99,60	99,87
60	56,89	98,13	99,83	99,69	99,88

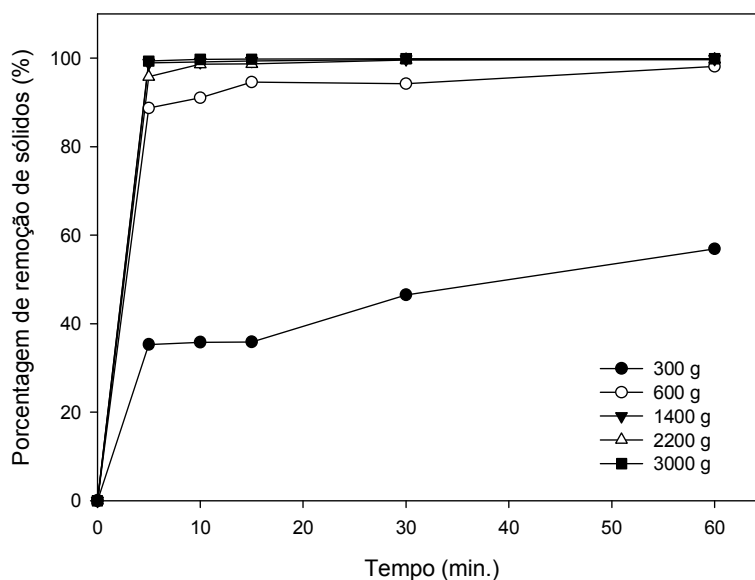


Figura 5 - Porcentagem de remoção de sólidos na centrifugação.

Por meio dos resultados do ensaio de centrifugação, verifica-se que aumentos da aceleração centrífuga (rotação) promovem aumento na remoção de células, a partir de 600 rpm, que é considerada uma baixa rotação para centrífugas industriais. No entanto, o tempo de residência necessário é, ainda, elevado (5 minutos).

Nota-se que, com rotações de 300 rpm, não foi possível a separação das células. Aumentando-se a rotação para 600 rpm houve elevação significativa da porcentagem de remoção, mesmo para o menor tempo de centrifugação. Para rotações de 3000 rpm, essa diminuição é ainda mais significativa, verificando-se remoção próxima a 100 %, mesmo para o menor tempo de processo de centrifugação (5 min.).

Grima *et al.* (2003) concluíram que a centrifugação é o método preferido para a separação de biomassa de microalgas, mesmo destacando o custo elevado de operação, que pode chegar a 35% do custo de produção. Uma grande quantidade de energia deve ser gerada para obter-se uma recuperação da biomassa de microalgas do caldo por meio da centrifugação. Além disso, a exposição de células de microalgas a elevadas forças gravitacionais pode danificar a estrutura celular (KNUCKEY *et al.*, 2006).

O processo de centrifugação ainda não deve ser descartado, pois é passível de otimização. Pela análise dos resultados, pode ser possível a utilização de rotações em torno de 1000 rpm.

O método de centrifugação é o mais citado (MONTAINI *et al.*, 1995; MCCAUSLAND *et al.*, 1999; ROBERT *et al.*, 2001) e o que apresenta os melhores resultados para a obtenção de grande biomassa de microalgas, sendo utilizado por empresas produtoras de biomassa comercial (Instant Algae, 2005). Sabe-se que não é somente o método que influencia no resultado, mas, também a qualidade das células e do cultivo a ser concentrado.

4. CONCLUSÕES

O processo de sedimentação livre mostrou-se inadequado para a separação da microalga *Chlorella* sp., tendo em vista que demanda elevado tempo de processo em um sedimentador industrial, resultando em unidades de grandes volumes, capazes apenas de concentrar a biomassa microalgal em torno de 40 % em massa seca.

A floculação com $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ e $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ é capaz de separar mais de 80 % das células de *Chlorella* sp. em tempo inferior a uma hora. No entanto, as doses de coagulante necessárias são muito elevadas, quando comparadas à separação de partículas com diâmetros equivalentes ao das células.

A centrifugação a 600 g foi capaz de separar mais de 90 % das células de *Chlorella* sp. em 5 minutos de processo. A redução na velocidade de rotação da centrifuga implicou em menor consumo de energia, podendo até viabilizar sua utilização em alguns processos de produção de biomassa microalgal.

5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, FAPEMIG, Petrobrás e CAPES pelo apoio financeiro, a equipe do Laboratório de Qualidade da Água do Departamento de Engenharia Agrícola e a equipe do Laboratório de Ficologia do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, que contribuíram de forma marcante para realização deste trabalho

6. REFERÊNCIAS

ANDREOLI, C.V. (Coord.) **Resíduos sólidos do saneamento: Processamento, reciclagem e disposição final**. Rio de Janeiro: Rima, ABES, 282 p., 2001;

ARBOLEDA, J.V. **Teoria y Practica de la Purificación Del Agua**. Asociación Colombiana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental – ACODAL, 684p., 1992;

BANERJEE A, SHARMA R, CHISTI Y, BANERJEE UC. Botryococcus braunii: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. **Critical Reviews in Biotechnology**, 22:245–79, 2002;

BARE, W. F. R. Algae removal using dissolved air flotation. **Journal (Water Pollution Control Federation)**, Volume 47, Number 1, January 1975.

BENEMANN, J. R., Overview: **Algae Oil to Biofuels**, National Renewable Energy Laboratory - Air Force Office of Scientific Research Workshop on Algal Oil for Jet Fuel Production - February, 2008;

BERNHARDT, H. E CLASEN, J. Flocculation of micro-organisms. **Journal Water SRTAqua**, 40(2), 76-81. 1991;

BERNHARDT, H. E CLASEN, J. Investigations into the flocculation mechanisms of small algal cells. **Journal Water SRT-Aqua**, 43(5), 222-232. 1994;

CHANG, S.F.; YANG, L.M.; LO, C.H.; LIAW, J.H.; WANG, L.H. E LIN, S.J.; Microbial transformation of isosteviol and bioactivities against the glucocorticoid/androgen response elements. **Journal of Natural Products**, 71, 87-92, 2008;

CHOW, C. W. K., HOUSE, J., VELZEBOER, R.M.A., DRIKAS, M. E BURCH, M.D. E STEFFENSEN, D. A. The effect of ferric chloride flocculation on cyanobacterial cells. **Water Research**, 32(3), 808-814. 1998;

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K. E WEBER, A. Modelling of Spirulina platensis growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 18, p. 603-607, (2002);

COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G.; DALCANTON, F.; REICHERT, C. C.; DURANTE, A. J. Simultaneous cultivation of Spirulina platensis and the toxigenic cyanobacteria Microcystis aeruginosa. **Zeitschrift fur Naturforschung**, Tübingen, v. 61c, p. 105-110, 2006;

DI BERNARDO, L. Métodos e técnicas de tratamento de água. **ABES**, 1993;

DRIKAS, M., CHOW, C.W.K., HOUSE, J. E BURCH, M.D. Using coagulation, flocculation and settling to remove toxic cyanobacteria. **Journal AWWA**, 93(2), 100-11. 2001;

EDZWALD, J. K. Algae, bubbles, coagulants, and dissolved air flotation. **Water Science & Technology**, Volume 27, Number 10, 1993;

EDZWALD, J. K. & WINGLES, B. J. Chemical and physical aspects of dissolved air flotation for the removal of algae. **Jour. Water SRT - Aqua**, Volume 39, 1990;

FRIEDMAN, A. A. *et al.* Algae separation from oxidation pond effluents. **Journal (Water Pollution Control Federation)**, Volume 49, Number 1, January 1977;

FUNK, W. H. *et al.* Dissolved air flotation for harvesting unicellular algae. **Water & Sew. Works**, 1968.

GAVRILESCU M. & CHISTI Y. Biotechnology – a sustainable alternative for chemical industry. **Biotechnology Advances**, Volume 23, Issues 7-8, November 2005;

GEHR, R. *et al.* Removal of trihalomethane precursors from eutrophic water by dissolved air flotation. **Water Research**, Volume 27, Issue 1, January 1993;

GOLUEKE, C. G. & OSWALD, W. J. Harvesting and processing sewage-grown planktonic algae. **Journal (Water Pollution Control Federation)**, Volume 37, Number 4, April 1965.

HEASMAN, M.P., J. DIEMAR, W.A. O. CONNOR, T.M. SUSHAMES AND L.A. FOULKES, Development of extended shelf-life microalgae concentrates diets harvested by centrifugation for bivalves mollusc-a summary. **Aquaculture Research.**, 31: 637-659. 2000;

HEASMAN, M.P., T.M. SUSHAMES, J.A. DIEMAR, W.A. O'CONNOR AND L.A. FOULKES, Production of microalgal concentrates for aquaculture part 2: Development and evaluation of harvesting, preservation, storage and feeding technology. **NSW Fisher Final Rep.** Ser. Aust., 2001;

HONG Y. *et al.* Responses of enzymatic antioxidants and non-enzymatic antioxidants in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to the allelochemical ethyl 2-methyl acetoacetate (EMA) isolated from reed (*Phragmites communis*). **Journal of Plant Physiology**, Volume 165, Issue 12, 25 August 2008;

ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in Chlorella strains calorific values when grow in low nitrogen medium. **Enzyme and Microbial Technology.**, v. 27, p. 631-635, 2000;

INSTANT ALGAE. **Marine Microalgae Concentrates. Marine Larviculture & Aquarium Feeds.** Acesso em: 20 de Abril de 2005, disponível: <http://www.instantalgae.com>. 2005;

JANSSENS, J. G. & BUEKENS, A. Assessment of process selection for particle removal in surface water treatment. *Jour. Water SRT - Aqua*, v.42, n.5, pp. 279-288, 1993;

KAWAMURA, S. *Integrated Design and Operation of Water Treatment Facilities*. 2ª edição. **John Wiley e Sons, Inc.**, E.U.A., 74-104. 2000;

KNUCKEY, R. M. *et al.* Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. **Aquacultural Engineering**, Volume 35, p. 300–313, 2006.

LACERDA, M. R. S. *et al.* Influência do tempo de floculação na filtração direta de águas com baixa turbidez e teor elevado de algas. **Anais do VII Simpósio Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, Lisboa, 1996.

MCCAUSLAND, M.A., M.R. BROWN, S.M. BARRETT, J.A. DIEMAR AND M.P. HEASMAN, Evaluation of live microalgae and microbial pastes as supplementary food for juvenile Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **Aquaculture**, 174: 323-342. 1999;

MASSCHELEIN, W. **Unit Processes in Drinking Water Treatment**. Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, E.U.A. 321-363., 1992;

MATOS, A. T. DE; CABANELLAS, C. F. G., BRASIL, M. DA S. Ensaio de sedimentação em água utilizada no descascamento/despolpa de frutos do cafeeiro, **Engenharia na Agricultura**, Viçosa, MG, v.14, n.3, 148-155, 2006;

MOLINA-GRIMA, E. M. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advance**, Volume 20, Issues 7-8, January 2003;

MONTAINI, E., G. CHINI-ZITTELLI, M.R. TREDICI, E. MOLINA-GRIMA, J.M. Fernandez-Sevilla and J.A. Sanchez-Perez, Long-term preservation of *Tetraselmis suecica*: influence of storage on viability and fatty acid profile. **Aquaculture**, 134: 81-90. 1995;

MORAINE, R. *et al.* Recovery of sewage born algae: flocculation and centrifugation techniques. **Algae Biomass**, 1980;

NAGLE, N. & LEMKE, P. Production of methyl ester fuel from microalgae. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Volume 24-25, Number 1, March 1990;

NELL J.A., W.A. O'CONNOR. The evaluation of fresh algae and stored algal concentrates as a food source for Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis*, larvae. **Aquaculture** 99,277-284. 1991;

OLIVEIRA, J. M. B. Remoção de *Cylindrospermopsis raciborskii* por meio de sedimentação e de flotação: avaliação em escala de bancada. Dissertação de Mestrado, **Universidade de Brasília**, 141p, 2005.

PONIS E, ROBERT R, PARISI G. Nutritional value of fresh and concentrated algal diets for larval and juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). **Aquaculture** 221:491–505. 2003;

PORTELLA, K. F.; ANDREOLI, C. V.; HOPPEN, C.; SALES, A. BARON, O. Caracterização físico-química do lodo centrifugado da estação de tratamento de água Passaúna - Curitiba - PR. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA AMBIENTAL**, 22., 2003, Joinville. Anais... Rio de Janeiro: ABES, 2003;

RADMANN, E., REINEHR, C., COSTA, J. Optimization of the repeated batch cultivation of microalga *Spirulina platensis* in open raceway ponds. **Aquaculture** 265, 118–126, 2007;

RAMALHO, R. S. **Tratamiento de águas residuales**. Barcelona: Editorial Reverte, 705 p., 1996;

REALI, M. A. P. & GIANOTTI, E. P. Remoção de algas por flotação: testes de laboratório. **Anais do XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Volume 2**, 1993;

ROBERT, R., G. PARISI, L. RODOLFI, B. M. POLI, AND M. R. TREDICI. Use of fresh and preserved *Tetraselmis suecica* for feeding *Crassostrea gigas* larvae. **Aquaculture** 192:333–346. 2001;

SHEEHAN, J. *et al.* A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae. Close-out report. **National Renewable Energy Lab, Department of Energy**, Golden, Colorado, U.S.A. Report number NREL/TP-580-24190, July 1998.

SHELEF, G. *et al.* Microalgae harvesting and processing: a literature review. **U. S. Department of Energy**, 1984;

SILVA, E. M. da; AZEVEDO, J. A. de. Influência do período de centrifugação na curva de retenção de água em solos de Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.1487-1494, 2002;

SPOLAORE, P. *et al.* Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Volume 101, Issue 2, February 2006;

STAUBER, J. L. Toxicity of chlorate to marine microalgae. **Aquatic Toxicology**, Volume 41, Issue 3, April 1998;

VIEIRA, A. A. H. **Estudos experimentais em fitoplâncton marinho. Culturas e aspectos ecofisiológicos**. M.Sc. Dissertation. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico. 106 p. 1975;

VLASKI, A. *et al.* The algae problem in the Netherlands from a water treatment perspective. **Journal Water SRT - AQUA**, Volume 45, Number 4, 1996.

VLASKI A, VAN BREEMEN AN, ALAERTS GJ. Optimisation of coagulation conditions for the removal of cyanobacteria by dissolved air flotation or sedimentation. **J Water SRT** 45:253–261. 1996;

VON SPERLING, M. **Lagoas de Estabilização**. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais: Volume 3.; 1996;