

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS LONDRINA
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL**

THAIS BORINI DE MELO

**REMOÇÃO DE NITRATO E FOSFATO PRESENTE EM EFLUENTE
SINTÉTICO, POR MEIO DO CULTIVO DE *CHLORELLA VULGARIS*,
COM FOCO PRELIMINAR PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**LONDRINA
2014**

THAIS BORINI DE MELO

**REMOÇÃO DE NITRATO E FOSFATO PRESENTE EM EFLUENTE
SINTÉTICO, POR MEIO DO CULTIVO DE *CHLORELLA VULGARIS*,
COM FOCO PRELIMINAR PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II, do Curso Superior de Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental.

Orientadora: Profa. Dra. Kátia Valéria Marques Cardoso Prates

Co-orientador: Prof. Dr. Chen-Lu Yang

LONDRINA

2014



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Londrina
Coordenação de Engenharia Ambiental



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Monografia

Remoção de nitrato e fosfato presente em efluente sintético, por meio do cultivo de *Chlorella vulgaris*, com foco preliminar para produção de biodiesel

por

Thais Borini de Melo

Monografia apresentada no dia 06 de março de 2014 ao Curso Superior de Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Londrina. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho _____
(aprovado, aprovado com restrições ou reprovado).

Profa. Dra. Joseane Debora Peruço Theodoro
(UTFPR)

Prof. MSc. Bruno de Oliveira Freitas
(UTFPR)

Profa. Dra. Kátia Valéria Marques Cardoso Prates
(UTFPR)
Orientador

Profa. Dra. Joseane Debora Peruço Theodoro
Responsável pelo TCC do Curso de Eng. Ambiental

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Cristina (*In memoriam*), com muito amor, pela parceria com Deus ao me dar o dom da vida e por ter sido a melhor mãe do mundo. Sua memória e seus ensinamentos sempre se farão presentes.

À minha avó, Maria, pelo exemplo de vida, dedicação, amor ao próximo, e por ter conduzido e incentivado minha educação formal.

AGRADECIMENTOS

Foi preciso muito esforço, determinação e paciência para chegar até aqui. Muitos me auxiliaram, de forma direta ou indireta, nesses cinco anos. Sou muito grata por ter tido a oportunidade do convívio com pessoas tão especiais, com as quais aprendi e ensinei, nessa troca diária que chamamos de vida.

Primeiramente, agradeço a Deus pelo seu amor infinito e por, nos momentos mais difíceis, ter me levantado e dado forças para continuar. À minha família, especialmente minha avó, Maria Borini, meus tios, Júlio Borini, João dos Reis e Ricardo Borini, e minhas tias, Andréia Borini, Carina Borini e Alessandra Ceolin, por terem estado presentes quando ninguém mais estava e quando a esperança de um futuro melhor parecia não mais existir, e também pelo apoio, incentivo e orações em meu favor.

Às minhas amigas, Monica Rivaroli, Paula Wessling, Rafaela Kawata, Tiyoko Hashimoto e Veronika Sassen, pela parceria e cumplicidade ao longo do curso, e por terem tornado as aulas, as horas de iniciação científica e os finais de semana mais alegres e inesquecíveis. Aos meus amigos, Julianderson Silva e Nicolas Przyvitowski, e ao meu namorado, Pedro Castro, por terem proporcionado os melhores momentos do meu intercâmbio nos Estados Unidos, pela amizade verdadeira, embora tão recente, e pela paciência, apoio e carinho.

A todos os professores do curso, mas em especial ao Prof. Dr. Admir Créso de Lima Targino, pela oportunidade de realizar uma iniciação científica de qualidade e com muito aprendizado, e pela dedicação no tempo em que foi meu orientador.

Por fim, agradeço imensamente aos meus orientadores, Prof. Dr. Chen-Lu Yang, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e pelo auxílio na formulação e execução desta pesquisa, e Prof^a. Dr^a. Kátia Valéria Marques Cardoso Prates, por orientar de forma tão dedicada este trabalho e por permitir que eu o finalizasse com êxito.

Ninguém pode construir em teu lugar as pontes que precisarás passar para atravessar o rio da vida. Ninguém, exceto tu, só tu. Existem, por certo, atalhos sem números, e pontes, e semideuses que se oferecerão para levar-te além do rio, mas isso te custaria a tua própria pessoa: tu te hipotecarias e te perderias. Existe no mundo um único caminho por onde só tu podes passar. Aonde leva? Não perguntes, siga-o! (NIETZSCHE, Friedrich, 1883).

RESUMO

MELO, Thais Borini de. Remoção de nitrato e fosfato presente em efluente sintético, por meio do cultivo de *Chlorella vulgaris*, com foco preliminar para produção de biodiesel. 2014. 111f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso Superior de Engenharia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2014.

Os fenômenos da industrialização e urbanização, bem como as práticas de agricultura, vêm produzindo uma quantidade cada vez maior de efluentes. Antes de serem despejados em rios e lagos, esses efluentes devem passar por processos de tratamento e remoção de nutrientes, pois o excesso de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, leva à eutrofização de ecossistemas aquáticos. A eutrofização causa o aumento de populações algais e de plantas aquáticas, podendo acarretar na perda de espécies e da função do ecossistema. Estudos demonstram que microalgas possuem um excelente potencial para remoção de nitrogênio e fósforo em efluentes e que sua biomassa pode ser uma interessante fonte renovável para geração de biocombustível. Neste contexto, este trabalho teve por objetivo cultivar a microalga *Chlorella vulgaris* em efluente sintético dentro de fotobiorreatores em batelada, em quatro condições de crescimento (luz natural, 16000 lux, 11000 lux – com aeração, e 9500 lux), avaliando a capacidade de crescimento, remoção de nutrientes e o potencial oleaginoso da biomassa com vistas no futuro à obtenção de biodiesel. Foram realizadas cinco semanas de testes, utilizando três culturas mães diferentes, mantidas sob luz natural (C1), luz artificial com aeração (C2) e luz artificial sem aeração (C3). As concentrações iniciais de nitrato da primeira à quinta semana, respectivamente, foram 130 mg/L, 60 mg/L, 40 mg/L, 4 mg/L e 7,5 mg/L. Já as concentrações iniciais de fosfato da primeira à quinta semana, respectivamente, foram 32,1 mg/L, 15 mg/L, 10,8 mg/L, 1,02 mg/L e 2,3 mg/L. Obteve-se um aumento máximo de biomassa de 2700%, com aumento de pH de 3,67, pela cultura mantida sob 16000 lux, na primeira semana (inoculada com C2). A maior eficiência na remoção de nitrato foi de 96,67%, pela cultura mantida sob 11000 lux com aeração, na quinta semana (inoculada com C2) e a maior eficiência na remoção de fosfato foi de 95,10%, pela cultura mantida sob 11000 lux com aeração, na quarta semana (inoculada com C2). Concluiu-se que C2 possuía condições de crescimento mais próximas das ideais, gerando células mais eficientes na remoção de nutrientes e com taxas de crescimento maiores. Pode-se inferir que a aeração apresentou-se como fator determinante para que isto ocorresse. Após a remoção de nitrato e fosfato por meio do cultivo de *C. vulgaris* em efluente sintético, focou-se no tratamento da biomassa para extração de lipídios e na transesterificação desses lipídios visando a obtenção de biodiesel. Concluiu-se que foi possível produzir biodiesel similar ao diesel tradicional a partir da biomassa seca obtida, a qual era constituída em 10,12% por lipídios.

Palavras-chave: Remoção de nutrientes. Tratamento de efluentes. *Chlorella vulgaris*. Produção de biodiesel.

ABSTRACT

MELO, Thais Borini de. Removal of nitrate and phosphate present in synthetic wastewater, through the cultivation of *Chlorella vulgaris*, with primary focus for biodiesel production. 2014. 111f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso Superior de Engenharia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2014.

Industrialization, urbanization and agriculture practices have generated an increasing amount of effluent in the past years. Effluents contain nutrients such as nitrogen and phosphorus that can lead to the eutrophication of aquatic ecosystems. The eutrophication phenomenon is strongly correlated to the bloom of algae and aquatic plants, which can result in the loss of component species and loss of the ecosystem functions. For these reasons, it is important to submit the effluent to the correct treatment in order to decrease the concentration of nitrogen and phosphorus compounds. Therefore, this project aimed to cultivate the microalgae *Chlorella vulgaris* in batch systems inside photobioreactors in four different growth conditions (sun light; 16000 lux; 11000 lux with aeration; and 9500 lux) and subsequently evaluate their growing capacity, nutrient removal and the biomass oleaginous potential in order to assess their suitability for biodiesel production. Five weeks of tests were held, in which three different mother cultures were used (sun light – C1 –, artificial light with aeration – C2 –, and artificial light without aeration – C3). The initial concentrations of nitrate were 130 mg/L, 60 mg/L, 40 mg/L, 4 mg/L and 7.5 mg/L in the first, second, third, fourth and fifth week of study, respectively. The initial concentrations of phosphate were 32.1 mg/L, 15 mg/L, 10.8 mg/L, 1.02 mg/L and 2.3 mg/L in the first, second, third, fourth and fifth week of study, respectively. The greater biomass growth obtained was 2700%, with a pH increasing of 3.67, by the culture kept under 16000 lux, in the first week of experiment (inoculated with C2). The greater nitrate removal was 96.67%, by the culture kept under 11000 lux with aeration, in the fifth week of experiment (inoculated with C2), while the greater phosphate removal was 95.10%, by the culture kept under 11000 lux as well, but in the fourth week (inoculated with C2). The results indicate that C2 provided the best growth conditions and that it generated more efficient cells in terms of nutrient removal and growth rates. Aeration was probably a driving factor in those results. After using *C. vulgaris* to remove nitrate and phosphate in synthetic wastewater, the biomass was treated in order to extract lipids and convert them into biodiesel by using the transesterification method. It was concluded that the biodiesel obtained from microalgae biomass, which contained 10.12% of their dry mass formed by lipids, was similar to traditional diesel.

Keywords: Nutrient removal. Wastewater treatment. *Chlorella vulgaris*. Biodiesel production.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – PROCESSO DE SÍNTESE BIOLÓGICA DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES: 1 – ACETIL-COA-ACP ACIL TRANSFERASE. 2 – MALONIL COA-ACP ACIL TRANSFERASE. 3 – B-CETOACIL-ACP. 4 – B-CETOACIL-ACP REDUTASE. 5- B-HIDROXIACIL-ACP DE-HIDRASE. 6 – ENOIL-ACP REDUTASE.	21
FIGURA 2 – BIOSÍNTESE DE TRIGLICERÍDEOS EM MICROALGAS.....	22
FIGURA 3 – <i>CHLORELLA VULGARIS</i> : A) VISTA AO MICROSCÓPIO ÓPTICO; B) MICROSCOPIA ELETRÔNICA DA CÉLULA, EM SEÇÃO LONGITUDINAL, ONDE CW = PAREDE CELULAR, CH = CLOROPLASTO, T = TILACÓIDES, ST = LEUCOPLASTOS, N = NÚCLEO, NL = NUCLÉOLO E M= MITOCÔNDRIA.	23
FIGURA 4 – CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i>	25
FIGURA 5 – TIPOS DE CONFIGURAÇÃO DE FOTOBIORRETORES: A) TANQUE DO TIPO “RACEWAY POND” TÍPICO PARA SISTEMA ABERTO; B) BIORREATOR FECHADO (ERLENMEYERS).	31
FIGURA 6 – FOTOBIORREATOR TUBULAR VERTICALMENTE INCLINADO PARA O CULTIVO FECHADO DE MICROALGAS.....	32
FIGURA 7 – BIORRETORES PROTEGIDOS POR ESTUFA: A) BIORREATOR ABERTO EM FORMA DE TANQUE PEQUENO; E B) BIORREATOR ABERTO EM TANQUE GRANDE.	33
FIGURA 8 – MATRIZ ENERGÉTICA NO BRASIL E NO MUNDO EM 2006.....	36
FIGURA 9 – EQUAÇÃO GERAL DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO, ONDE R REPRESENTA A CADEIA CARBÔNICA DOS ÁCIDOS GRAXOS E R ¹ A CADEIA CARBÔNICA DO ÁLCOOL REAGENTE.....	40
FIGURA 10 – ADVANCED TECHNOLOGY & MANUFACTURING CENTER (ATMC), FALL RIVER, USA.	41
FIGURA 11 – ETAPAS PRINCIPAIS DA EXECUÇÃO DO PROJETO.	42
FIGURA 12 – ETAPAS REALIZADAS DURANTE A INOCULAÇÃO E CRESCIMENTO DA MICROALGA, E TESTES NA REMOÇÃO DE NUTRIENTES.	42
FIGURA 13 – TRATAMENTO DA BIOMASSA ALGAL PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL E SUA POSTERIOR ANÁLISE.....	43
FIGURA 14 – DESIGN DO FOTOBIORREATOR: A) TERMÔMETRO DIGITAL MIN/MAX TRACEABLE; B) HIGRO-TERMÔMETRO DIGITAL EXTECH 445713; C) BOMBA DE AR TETRA 77855 WHISPER; D) FILTRO DE AR; E) MECANISMO DE CONTROLE DE INTENSIDADE DE AERAÇÃO; F) SAÍDA DE TUBOS DE	

AERAÇÃO; G) LÂMPADAS DO FOTOBIORREATOR; H) TIMER HEAVY DUTY 15075; E) MEDIDOR DE INTENSIDADE DE LUZ EXTECH 401025.....	44
FIGURA 15 – CONFIGURAÇÃO DO FOTOBIORREATOR: A) INTERNA; B) LATERAL ESQUERDA; C) ATRÁS; E D) FRONTAL.....	46
FIGURA 16 – A) <i>CHLORELLA VULGARIS</i> EM PROTEOSE ÁGAR E B) ALGA-GRO® FRESHWATER MEDIUM PRONTO PARA USO.....	47
FIGURA 17 – TRANSFERÊNCIA DA MICROALGA <i>C. VULGARIS</i> PARA O MEIO DE CULTURA.....	48
FIGURA 18 – CULTIVO INICIAL DE <i>C. VULGARIS</i> EM FOTOBIORREATOR:	48
FIGURA 19 – CULTIVO DE <i>C. VULGARIS</i> EM: A) LUZ NATURAL, SEM AERAÇÃO; B) LUZ ARTIFICIAL, COM AERAÇÃO; E C) LUZ ARTIFICIAL, SEM AERAÇÃO.....	49
FIGURA 20 – MICRO ALGAE GROW: A) PART A E MASS PACK (PART B); E B) MEIO PREPARADO.....	50
FIGURA 21 – CONFIGURAÇÃO DO EXPERIMENTO: TESTE DE REMOÇÃO DE NITRATO E FOSFATO POR MICROALGAS ORIUNDAS DE TRÊS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DIFERENTES.....	53
FIGURA 22 – HEMOCITÔMETRO REICHERT BRIGHT LINE 1492: A) EMBALAGEM; B) PLACA PARA CONTAGEM DE CÉLULAS.....	55
FIGURA 23 – ÁREA DE CONTAGEM DE CÉLULAS NO HEMOCITÔMETRO.....	55
FIGURA 24 – MICROSCÓPIO OLYMPUS BH2 COM CÂMERA ACOPLADA: A) VISTA FRONTAL; B) VISTA LATERAL DA LENTE DIREITA.....	56
FIGURA 25 – CENTRÍFUGA COLE-PARMER EW-17250-10 UTILIZADA PARA CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	57
FIGURA 26 – ESPECTROFOTÔMETRO HACH DR/4000.....	57
FIGURA 27 – PHMETRO DENVER INSTRUMENT ULTRABASIC BENCHTOP.....	58
FIGURA 28 – CENTRÍFUGA CENTRIFIC™ DA MARCA FISCHER SCIENTIFIC: A) FRONTAL E B) INTERIOR.....	59
FIGURA 29 – <i>C. VULGARIS</i> NA FORMA CONCENTRADA: A) TUBOS DE ENSAIO CONTENDO AS MICROALGAS DE CADA ENSAIO; B) AMOSTRA OBTIDA DEPOIS DA CENTRIFUGAÇÃO FINAL.....	59
FIGURA 30 – <i>C. VULGARIS</i> NA FORMA CONCENTRADA: A) PESAGEM DA AMOSTRA EM BALANÇA ANÁLITICA; B) PROCESSO DE SECAGEM DA AMOSTRA EM ESTUFA.....	60

FIGURA 31 – A) MATERIAL UTILIZADO NA DISRUPÇÃO DAS CÉLULAS; E B) DETALHE DA BIOMASSA SECA PRESENTE NA PLACA DE PETRI.	61
FIGURA 32 – A) PROCESSO DE MACERAÇÃO DAS CÉLULAS; B) HEXANO 95% UTILIZADO NA EXTRAÇÃO DOS LIPÍDIOS; E C) EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS UTILIZANDO UM SHAKER A 155 RPM.....	61
FIGURA 33 – A) FILTRAÇÃO DA AMOSTRA À VÁCUO; E B) EVAPORAÇÃO DO HEXANO 95% DENTRO DA CAPELA POR 24 HORAS.	62
FIGURA 34 – TRANSESTERIFICAÇÃO DOS LIPÍDIOS: A) METANOL UTILIZADO COMO FONTE DE ÁLCOOL; B) HIDRÓXIDO DE SÓDIO UTILIZADO COMO CATALIZADOR; C) AMOSTRA DENTRO SHAKER; E D) AMOSTRA OBTIDA NO FINAL DO PROCESSO.....	63
FIGURA 35 – CROMATÓGRAFO GASOSO BUCK SCIENTIFIC MODELO 910.	64
FIGURA 36 – A) <i>C. VULGARIS</i> CULTIVADA SOB LUZ NATURAL, AUMENTO DE 400X; B) <i>C. VULGARIS</i> CULTIVADA SOB 16000 LUX, AUMENTO DE 400X; C) <i>C. VULGARIS</i> CULTIVADA SOB 11000 LUX, COM AERAÇÃO, AUMENTO DE 400X; D) <i>C. VULGARIS</i> CULTIVADA SOB 9500 LUX, AUMENTO DE 400X.	66
FIGURA 37 – FUNDO DO FOTOBIORREATOR DIVIDIDO EM QUADRANTES COM OS VALORES DE INTENSIDADE DE LUZ.....	69
FIGURA 38 – REMOÇÃO DE NITRATO DURANTE AS CINCO SEMANAS DE EXPERIMENTO, EM AMOSTRA CULTIVADA SOB LUZ NATURAL.	73
FIGURA 39 – REMOÇÃO DE NITRATO DURANTE AS CINCO SEMANAS DE EXPERIMENTO, EM AMOSTRA CULTIVADA SOB 16000 LUX.....	74
FIGURA 40 – REMOÇÃO DE NITRATO DURANTE AS CINCO SEMANAS DE EXPERIMENTO, EM AMOSTRA CULTIVADA SOB 11000 LUX, COM AERAÇÃO.	75
FIGURA 41 – REMOÇÃO DE NITRATO DURANTE AS CINCO SEMANAS DE EXPERIMENTO, EM AMOSTRA CULTIVADA SOB 9500 LUX.....	76
FIGURA 42 – REMOÇÃO DE FOSFATO DURANTE AS CINCO SEMANAS DE EXPERIMENTO, AMOSTRA CULTIVADA SOB LUZ NATURAL.....	80
FIGURA 43 – REMOÇÃO DE FOSFATO DURANTE AS CINCO SEMANAS DE EXPERIMENTO, AMOSTRA CULTIVADA SOB 16000 LUX.	81
FIGURA 44 – REMOÇÃO DE FOSFATO DURANTE AS CINCO SEMANAS DE EXPERIMENTO, AMOSTRA CULTIVADA SOB 11000 LUX, COM AERAÇÃO.	82
FIGURA 45 – REMOÇÃO DE FOSFATO DURANTE AS CINCO SEMANAS DE EXPERIMENTO, AMOSTRA CULTIVADA SOB 9500 LUX.	83

FIGURA 46 – DENSIDADE CELULAR DURANTE AS CINCO SEMANAS DE EXPERIMENTO, AMOSTRA CULTIVADA SOB LUZ NATURAL.....	85
FIGURA 47 – DENSIDADE CELULAR DURANTE AS CINCO SEMANAS DE EXPERIMENTO, AMOSTRA CULTIVADA SOB 16000 LUX.	86
FIGURA 48 – DENSIDADE CELULAR DURANTE AS CINCO SEMANAS DE EXPERIMENTO, AMOSTRA CULTIVADA SOB 11000 LUX, COM AERAÇÃO.	86
FIGURA 49 – DENSIDADE CELULAR DURANTE AS CINCO SEMANAS DE EXPERIMENTO, AMOSTRA CULTIVADA SOB 9500 LUX.	87
FIGURA 50 – <i>C. VULGARIS</i> CULTIVADA SOB LUZ NATURAL NO PRIMEIRO E ÚLTIMO DIA, RESPECTIVAMENTE: A) E B) PRIMEIRA SEMANA; C) E D) SEGUNDA SEMANA; E) E F) TERCEIRA SEMANA; G) E H) QUARTA SEMANA; I) E J) QUINTA SEMANA.	88
FIGURA 51 – <i>C. VULGARIS</i> CULTIVADA SOB 16000 LUX, 11000 LUX COM AERAÇÃO E 9500 LUX NO PRIMEIRO E ÚLTIMO DIA, RESPECTIVAMENTE: A) E B) PRIMEIRA SEMANA; C) E D) SEGUNDA SEMANA; E) E F) TERCEIRA SEMANA; G) E H) QUARTA SEMANA; I) E J) QUINTA SEMANA.	89
FIGURA 52 – LIPÍDIOS EXTRAÍDOS EM HEXANO.....	92
FIGURA 53 – LIPÍDIOS EXTRAÍDOS DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i>	93
FIGURA 54 – CROMATOGRAMA DO BIODIESEL OBTIDO A PARTIR DOS LIPÍDIOS DE <i>C. VULGARIS</i>	94
FIGURA 55 – CROMATOGRAMA DE DIESEL TRADICIONAL.....	95

LISTA DE TABELAS

TABELA 1– CONTEÚDO DE ÓLEO PRESENTE EM DIFERENTES ESPÉCIES DE MICROALGAS.	20
TABELA 2– CONFIGURAÇÃO GENERALIZADA DAS CONDIÇÕES PARA O CULTIVO DE MICROALGAS.	26
TABELA 3 – PADRÕES DE QUALIDADE DE ÁGUA PARA ÁGUAS DOCES CLASSE II.	34
TABELA 4– COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA <i>MICRO ALGAE GROW</i>	51
TABELA 5– DILUIÇÕES UTILIZADAS NO EFLUENTE EM TESTE A CADA SEMANA E SUAS CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES.	51
TABELA 6 – TEMPERATURAS MÉDIAS DIÁRIAS DO AR EXTERNO NAS CINCO SEMANAS DE EXPERIMENTO.	67
TABELA 7 – TEMPERATURAS MÉDIAS DIÁRIAS DENTRO DO FOTOBIOREATOR DURANTE O EXPERIMENTO.	67
TABELA 8 – INTENSIDADE MÁXIMA DE RADIAÇÃO SOLAR INCIDENTE NA AMOSTRA CULTIVADA SOB “LUZ NATURAL”.	68
TABELA 9 – PORCENTAGEM DE REMOÇÃO DE NITRATO.	71
TABELA 10 – PORCENTAGEM DE REMOÇÃO DE FOSFATO.	78
TABELA 11 – DENSIDADE CELULAR INICIAL E FINAL DURANTE AS CINCO SEMANAS DE EXPERIMENTO.	84
TABELA 12 – DENSIDADE CELULAR E PH DURANTE OS SETE DIAS DAS CINCO SEMANAS DE ESTUDO SOB LUZ NATURAL.	90
TABELA 13 – DENSIDADE CELULAR E PH DURANTE OS SETE DIAS DAS CINCO SEMANAS DE ESTUDO SOB 16000 LUX.	90
TABELA 14 – DENSIDADE CELULAR E PH DURANTE OS SETE DIAS DAS CINCO SEMANAS DE ESTUDO SOB 11000 LUX COM AERAÇÃO.	90
TABELA 15 – DENSIDADE CELULAR E PH DURANTE OS SETE DIAS DAS CINCO SEMANAS DE ESTUDO SOB 9500 LUX.	91

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
3.1 MICROALGAS, UMA ABORDAGEM GERAL	17
3.1.1 Composição lipídica das microalgas	19
3.1.2 Biossíntese de Ácidos Graxos e Acil gliceróis por microalgas	20
3.1.3 Sobre a biologia e o crescimento de <i>Chlorella vulgaris</i>	23
3.2 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO MICROALGAL.....	24
3.2.1 Luminosidade	26
3.2.2 Temperatura.....	27
3.2.3 Aeração e agitação.....	28
3.2.4 Nutrientes	29
3.2.5 pH.....	30
3.3 FOTOBIOREACTORES	31
3.4 TRATAMENTO DE EFLUENTES CONVENCIONAL E SUAS LIMITAÇÕES.....	33
3.5 LEGISLAÇÃO PERTINENTE AO LANÇAMENTO DE EFLUENTES EM CORPOS RECEPTORES.....	34
3.6 MICROALGAS E REMOÇÃO DE NUTRIENTES.....	35
3.7 MICROALGAS, POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E ENERGÉTICO	36
3.8 BIODIESEL DE MICROALGAS	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 LOCAL E PERÍODO DA REALIZAÇÃO DO PROJETO	41
4.2 FASES DE EXECUÇÃO DO PROJETO	41
4.3 DESIGN DO FOTOBIOREATOR.....	43
4.4 MICRO-ORGANISMO E MEIO DE CULTURA.....	46
4.5 EFLUENTE SINTÉTICO	50
4.6 REMOÇÃO DE NITRATO E FOSFATO	52
4.6.1. Contagem de células e análise da morfologia celular	55
4.6.2. Concentrações de nitrato e fosfato.....	57
4.6.3. pH.....	58
4.7 PRODUÇÃO DE BIODIESEL	58
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1 MORFOLOGIA CELULAR	65
5.2 TEMPERATURA E INTENSIDADE LUMINOSA	66
5.3 REMOÇÃO DE NITRATO.....	71
5.4 REMOÇÃO DE FOSFATO.....	77
5.5 CRESCIMENTO MICROALGAL E PH.....	84
5.5.1 Densidade Celular	84
5.5.2 pH.....	89
5.6 PRODUÇÃO DE BIODIESEL	92
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
REFERÊNCIAS.....	99

1 INTRODUÇÃO

Sabe-se que, desde o homem primitivo, as atividades humanas vêm interferindo nos ciclos biogeoquímicos. Com a intensificação de práticas de agricultura e da urbanização e industrialização, a humanidade tem contribuído para o aumento da entrada de nutrientes nos ciclos bioquímicos, especialmente nitrogênio e fósforo, fato que acarreta em sérios problemas ambientais. O aumento da concentração de nutrientes leva à eutrofização de ecossistemas aquáticos, aumentando a quantidade de algas e plantas aquáticas no ambiente e acarretando na perda de espécies e da função do ecossistema. Por essas razões, diversos estudos têm focado na remoção de nitratos e fosfatos em efluentes (KARGI; UYGUR, 2003; OBAJA et al., 2005).

Estudos demonstram que microalgas possuem um excelente potencial para remoção de nitrogênio e fósforo. As vantagens da utilização de microalgas para este propósito incluem: baixo custo de operação; possibilidade de reciclagem de nutrientes assimilados na biomassa de algas (como fertilizante, por exemplo) e possibilidade de reciclagem da biomassa algal para geração de biodiesel, ambas eliminando o problema de tratamento de esgotos/lodos; e a descarga de efluente oxigenado em corpos de água. Além disso, tal processo não requer adição de carbono, sendo atrativo para complementação do tratamento secundário (ASLAN; KAPDAN, 2006).

As microalgas amplamente utilizadas para remoção de nutrientes são espécies do gênero *Chlorella* (LEE; LEE, 2001; GONZALES et al., 1997), *Scenedesmus*, e *Spirulina* (OLGUÍN et al., 2003). A capacidade de remoção de nutrientes de *Nannochloris*, da microalga *Botryococcus braunii*, e da cyanobacteria *Phormidium* também vem sendo investigada (MARTINEZ et al., 1999). Tais microorganismos podem assimilar nutrientes essenciais ao seu crescimento (como nitrogênio e fósforo) de uma grande variedade de efluentes, tais como de agricultura, alimentação de animais, efluentes municipal e industrial. Elas são de rápido crescimento: estudos apontam que certas espécies podem dobrar sua biomassa dentro de 24 horas (SCHENK et al., 2008; BECKER, 2004).

Além de serem uma alternativa para o tratamento terciário de efluentes, microalgas possuem um amplo potencial industrial e econômico (RAI et al., 2000),

principalmente servindo como matéria-prima para a indústria farmacêutica (LIU et al., 2000) e para as indústrias de corantes, produtos químicos finos e biocombustíveis (MARKOV et al., 1997). Ao contrário da produção de combustíveis a partir de plantações de milho, soja e cana-de-açúcar, a produção de combustíveis a partir de algas não compete com a cadeia de suprimentos alimentícios (CHISTI, 2007).

Após realizar o balanço energético para o processo de produção de biodiesel a partir de microalgas, Chisti (2008) concluiu que o processo é energeticamente viável. Chisti (2008) encontrou um valor de NET (*Net Energy Ratio*), que é a razão entre a energia total produzida a partir do biocombustível e a energia total consumida no processo, de 2,8. Ou seja, a energia gerada pelo biodiesel é maior do que a energia consumida para sua produção. O autor também afirma que dependendo do conteúdo lipídico das microalgas, o NET pode alcançar um valor superior a 7.

Sendo assim, o cultivo de microalgas pode solucionar duas questões ambientais simultaneamente: eutrofização de corpos de água devido a excesso de nutrientes e a necessidade de fontes de energia limpas. Portanto, pode-se dizer que iniciativas e pesquisas na área são interessantes. Esforços para o desenvolvimento de técnicas que tornem o tratamento de efluentes e geração de biocombustível utilizando microalgas eficientes e que interliguem as duas práticas podem ser mais economicamente viáveis do que tratar de tais questões separadamente. Nesse sentido, este trabalho teve por objetivo cultivar a microalga *Chlorella vulgaris* em fotobiorreatores, promovendo a remoção de nutrientes em efluentes sintéticos e produzindo biodiesel no final do processo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo geral cultivar a microalga *Chlorella vulgaris* utilizando fotobiorreatores em batelada promovendo a remoção de nitratos e fosfatos em efluente sintético, e produzir biocombustível utilizando a biomassa algal obtida neste processo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i) Monitorar as concentrações de nitrato e fosfato, pH, contagem de células e morfologia das células durante o experimento;
- ii) Identificar as melhores condições de crescimento da microalga e qual possui maior eficiência na remoção de nutrientes;
- iii) Produzir biodiesel a partir da biomassa algal obtida.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 MICROALGAS, UMA ABORDAGEM GERAL

Ficologicamente, organismos que contenham clorofila *a* e talo não diferenciados em raízes, caule e folhas são denominados algas. Algas não formam um grupo único e monofilético, por isso não é possível defini-las facilmente. Tais organismos são produtores primários de oxigênio, fotossintéticos e ocupam habitats específicos. Devido a sua diversidade ecológica e capacidade de adaptação fisiológica, as microalgas podem ser encontradas em praticamente todos os biótipos, mas estas estão presentes principalmente em meios aquáticos - águas doces, salobras e salgadas (TOMASELLI, 2004; RICHMOND; QIANG, 2013, p.3; LEE, 2008).

Espécies algais também podem ser encontradas aderidas a substratos ou na forma móvel. Algumas são encontradas suspensas em água; em superfícies úmidas de rochas, nascentes quentes, no ar, neve e desertos; podem crescer em solos, árvores e animais; e outras formam relações simbióticas com outros organismos (TOMASELLI, 2004; LEE, 2011; RICHMOND; QIANG, 2013, p.3;).

Na ficologia aplicada, utiliza-se o termo “microalga” quando se trata de algas microscópicas e bactérias fotossintéticas aeróbias, as cianobactérias (RICHMOND; QIANG, 2013, p.3). Entretanto, é importante ressaltar que existem muitos outros modos de se definir e classificar uma “microalga” (TOMASELLI, 2004). Toda alga é constituída por componentes como carboidratos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. A porcentagem desses constituintes varia de acordo com a espécie (ARCEO, 2012).

Diversos critérios são levados em consideração na classificação sistemática das microalgas, como, por exemplo, tipo de pigmento, natureza química das substâncias de reserva, constituintes da parede celular. Aspectos citológicos e morfológicos, como a ocorrência ou não de células flageladas, os processos de formação do núcleo e da divisão celular, a presença e a caracterização de envoltório dos cloroplastos, dentre outros, também são avaliados (TOMASELLI, 2004; DERNER et al., 2006).

De acordo com Vonshak (2003), estima-se que existam entre 22000 e 26000 espécies de microalgas, que podem ser classificadas em cinco Filos, distinguindo-se entre si fundamentalmente pela coloração e natureza das substâncias de reserva. Guimarães et al. (2009) define os cinco Filos como:

- Filo Cyanophyta ou Cyanobacteria (algas azuis), que possuem coloração azul-esverdeada, avermelhada ou arroxeadada, apresentam organização procariótica e seus produtos de armazenamento são o amido e a cianoficina (proteína).
- Filo Chlorophyta (algas verdes), formado por microalgas que possuem plastos verdes e as substâncias de reserva são o amido intraplastidial e a celulose.
- Filo Euglenophyta, no qual os plastos possuem coloração esverdeada e as substâncias de reserva são o paramilo extraplastidial e a celulose.
- Filo Rhodophyta é composto por algas vermelhas, que possuem plastos avermelhados, arroxeados, ou azulados e a sua substância de reserva é o amido florídeo.
- Filo Chromophyta, constituído por algas castanhas, douradas e amarelo-esverdeadas, sendo a laminarina e os lipídios as substâncias de reserva.

Já Hoek et al. (1995) classifica “microalgas” de acordo com dois tipos de estrutura celular: aquelas que possuem estrutura celular procariótica (Divisões Cyanophyta – cianobactérias - e Prochlorophyta); e aquelas que possuem estrutura celular eucariótica (Divisões Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, entre outras). Abalde et al. (1995) enfatiza que, embora existam diferenças estruturais e morfológicas entre os membros de cada divisão, eles são fisiologicamente similares e apresentam metabolismo parecido com os das plantas.

Embora possuam mecanismo fotossintético similar ao das plantas terrestres, as condições em que vivem (meio líquido) e estrutura simples faz com que as

microalgas realizem trocas mais eficientes de água, gás carbônico e nutrientes, conseqüentemente conduzindo a taxas mais elevadas de conversão de energia solar em biomassa (SALISBURY; ROSS, 1985; CARLSSON et al., 2007).

3.1.1 Composição lipídica das microalgas

De acordo com Solomons (2005), lipídios são substâncias que não caracterizados por um grupo funcional comum, mas pela sua alta solubilidade em solventes orgânicos e baixa solubilidade em água. Lipídios são geralmente caracterizados por serem neutros ou polares. Dentre os lipídios polares, têm-se os fosfolipídios e glicolipídios, que estão presentes na maioria das microalgas na composição total de lipídios. Os lipídios neutros incluem triacilgliceróis, glicerídeos, carotenóides, entre outros (MOLINA et al., 1999; HUANG, 2010).

Glicolipídios são estruturas presentes na parede celular, enquanto os triacilgliceróis são considerados produtos de estocagem de energia. Geralmente os lipídios são compostos por triacilgliceróis, glicolipídios, fosfolipídios, lipoproteínas e ácidos graxos contendo entre 12 e 22 carbonos, que podem ser saturados e poli-insaturados (MOLINA et al., 1999).

Bobbio e Bobbio (1995) classificam lipídios como simples, compostos e derivados. Lipídios simples são aqueles que geram ácidos graxos e álcool após o processo de hidrólise (óleos, gorduras e ceras, por exemplo). Lipídios compostos contém, além de ácidos graxos e álcool, compostos como fosfolipídios, ceras e sulfolipídios. Já os derivados geralmente são obtidos por hidrólise de lipídios simples e compostos (ácidos graxos, álcoois de cadeia linear de alto peso molecular, hidrocarbonetos, vitaminas lipossolúveis, dentre outros).

As microalgas são, em geral, formadas por 15 a 40% de óleo em peso seco, quantidade maior do que a produzida por oleaginosas como girassol e mamona. Vale ressaltar que existe grande similaridade entre os ácidos graxos das microalgas e os dos demais óleos vegetais. Além disso, devido ao seu rápido crescimento e acúmulo considerável, elas são consideradas alternativas interessantes na produção de óleo. Os triacilglicerídios armazenados no citosol podem constituir até 64% de sua fração lipídica (ARCEO 2012; HUANG, 2010).

A Tabela 1 mostra o conteúdo lipídico de algumas microalgas. Segundo Pereira et al. (2012), o conteúdo de óleo varia de acordo com a composição bioquímica da microalga e o tipo de cultivo utilizado. Observando a Tabela 1, nota-se que algumas espécies podem ultrapassar o valor de 50% de ácidos graxos. No entanto, há autores que afirmam ser possível uma porcentagem ainda maior em conteúdo lipídico, como é o caso de Arceo (2012) e Spolaore et al. (2006), que afirmam que microalgas podem alcançar níveis lipídicos de 85 e 90%, respectivamente, caso cultivadas em condições ideais.

Tabela 1– Conteúdo de óleo presente em diferentes espécies de microalgas.

Microalga	Conteúdo de óleo (% peso seco)
<i>Botryococcus braunii</i>	25 – 75%
<i>Chlorella sp.</i>	28 – 32%
<i>Chlorella vulgaris</i>	5 – 58%
<i>Euglena gracilis</i>	14 – 20
<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Scenedesmus obliquus</i>	11 – 55
<i>Scenedesmus sp.</i>	19,6 – 21,1
<i>Spirulina maxima</i>	4 – 9
<i>Spirulina platensis</i>	4 – 16,6
<i>Tetraselmis suecica</i>	15 – 23
<i>Tetraselmis sp.</i>	12,6 – 14,7

Fonte: Adaptado de Khan et al. (2009) e Mata et al. (2010).

É importante ressaltar que o teor de lipídios não é fator determinante na capacidade de produção de óleo de microalgas. Este deve ser avaliado concomitantemente com a produção de biomassa, dando, então, uma ideia da produtividade lipídica da cultura (CHEN, 2011).

3.1.2 Biossíntese de Ácidos Graxos e Acil gliceróis por microalgas

A partir do processo de fotossíntese, microalgas podem sintetizar ácidos graxos diretamente, utilizando fontes de carbono orgânico (como, por exemplo, glicose ou acetato), ou então a partir de gás carbônico. Pode-se dividir essa síntese

em três etapas principais: síntese de acetil coenzima A (acetil CoA) no citoplasma; síntese de ácido graxo saturado com 16-18 carbonos, com dessaturação e alongamento da cadeia de carbonos (Figura 1); e síntese de acil gliceróis – triglicerídeos (Figura 2) (HUANG et al., 2010).

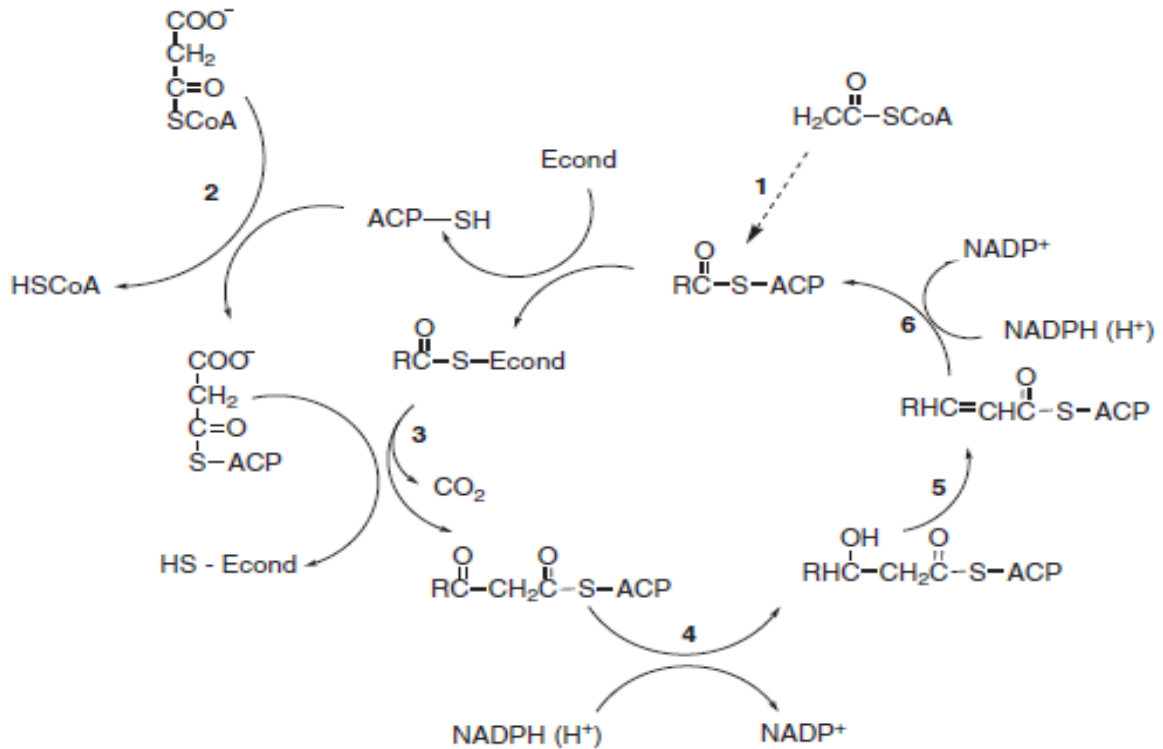


Figura 1 – Processo de síntese biológica de ácidos graxos livres: 1 – Acetil-CoA-ACP acil transferase. 2 – Malonil CoA-ACP acil transferase. 3 – β-cetoacil-ACP. 4 – β-cetoacil-ACP redutase. 5- β-hidroxiacil-ACP de-hidratação. 6 – Enoil-ACP redutase. Fonte: Pereira et al. (2012).

Para a síntese de acetil CoA é necessário gliceraldeído fosfato (GAP) como intermediário chave. Na via fotossintética, a formação de GAP acontece dentro dos cloroplastos e inclui as reações durante a fase clara e do Ciclo de Calvin. Após isso, GAP é exportado para o citoplasma e encaminhado para a síntese de açúcares ou oxidado até piruvato, podendo produzir energia ou ser usado como substrato para a síntese de ácidos graxos (HUANG et al., 2010).

Já a síntese de ácidos graxos saturados ocorre através das enzimas acetil CoA carboxilase e o complexo de uma sintase de ácido graxo (AGS). A acetil CoA é o primeiro composto da síntese e também é a fonte das unidades de dois carbonos

para o alongamento da cadeia, que ocorre através da incorporação de novas acetilas em um processo cíclico. Os compostos finais dessa reação são ácidos graxos saturados com 16-18 carbonos, formados através de ciclos de AGS. O alongamento e dessaturação ocorre através de alongases e dessaturases, com ácidos graxos de 18 carbonos. O produto final varia de 20 a 22 carbonos, dependendo da espécie de microalga (Figura 1) (HUANG et al., 2010).

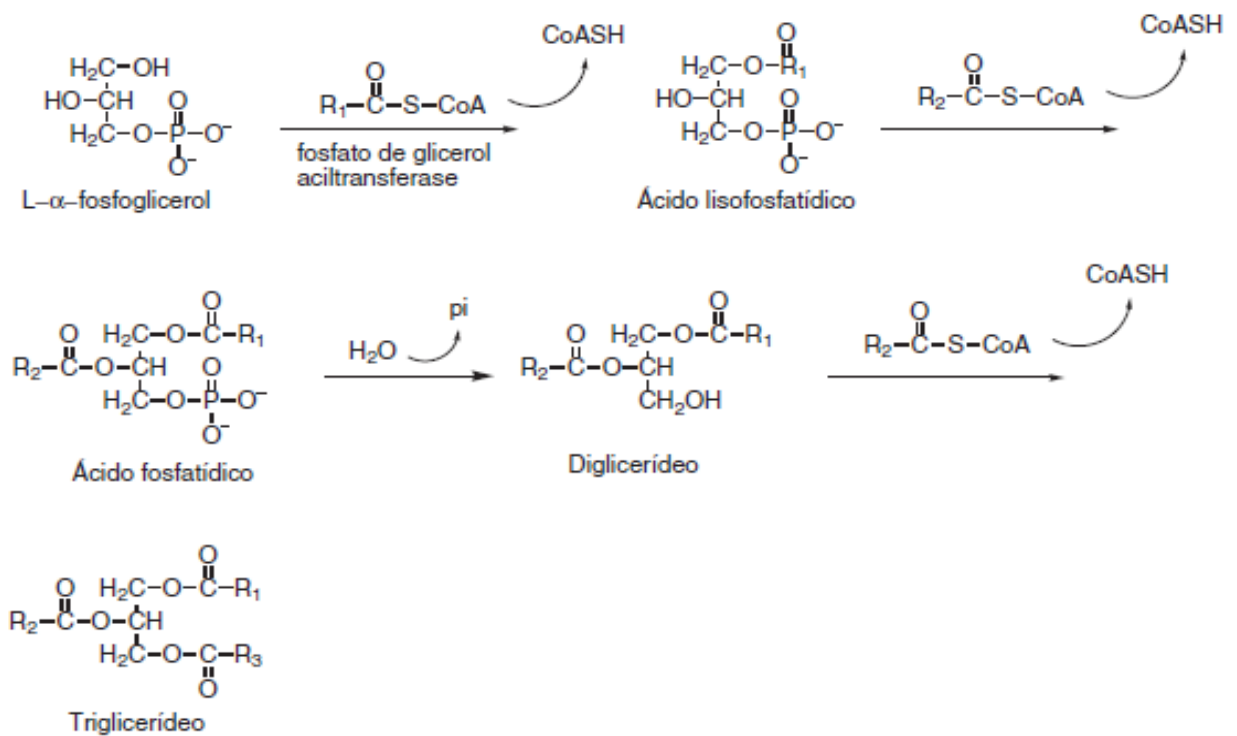


Figura 2 – Biossíntese de triglicerídeos em microalgas.
 Fonte: Pereira et al. (2012).

As microalgas sintetizam e estocam acil gliceróis como fonte de energia e carbonos. Essa síntese ocorre a partir do L- α -fosfoglicerol e acil CoA. A acil CoA transferase transfere os resíduos de acilas, formando ácido lisofosfatídico, que através da L-acilglicerol-3-fosfato-aciltransferase, transfere outra acila e forma o ácido L- α -fosfatídico (Figura 2). Este composto é a origem dos fosfolipídios e se transforma em tracilglicerol.

3.1.3 Sobre a biologia e o crescimento de *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris é uma espécie de alga verde unicelular (Figura 3a) pertencente à divisão Chlorophyta, ordem Chlorococcales e família Oocystaceae. É conhecida como uma microalga de crescimento rápido e possui diâmetro de 2 à 10 μm . Nos últimos anos, tais micro-organismos têm sido considerados como eficientes células-combustível microbianas e sua composição inclui, em peso seco: 18-40% de lipídios (em condições fototróficas); 51-58% de proteínas; 12-17% de carboidratos; e 4-5% de ácido nucleicos (KLOK, 2010; MCCORMICK et al., 2001; BECKER, 2004; ILLMAN et al., 2000).

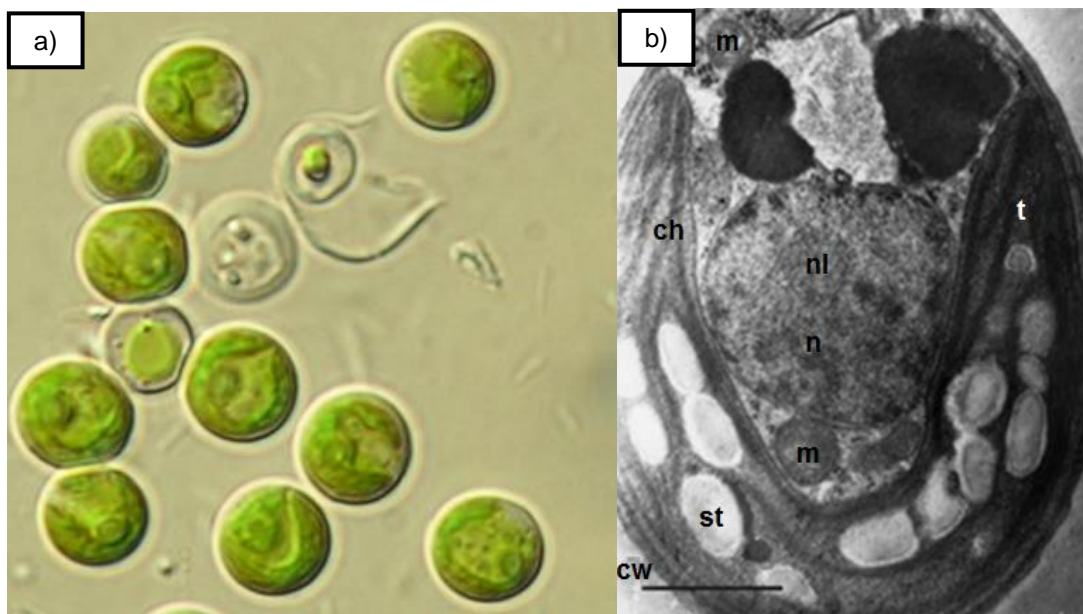


Figura 3 – *Chlorella vulgaris*: a) Vista ao microscópio óptico; b) Microscopia eletrônica da célula, em seção longitudinal, onde cw = parede celular, ch = cloroplasto, t = tilacóides, st = leucoplastos, n = núcleo, nl = nucléolo e m= mitocôndria.
Fonte: Culture (2013) e Richmond & Qiang (2013).

Apresentam forma de vida unicelular ou podem formar colônias. Além disso, podem acumular pigmentos como clorofila a e b, β -caroteno e xantofilas. Utilizam amido como forma de reserva de carbono intracelular (KLOK, 2010). Podem se reproduzir por meio de divisão binária, esporos assexuais (células filhas com o mesmo formato da célula mãe) e reprodução sexual. O gênero *Chlorella* pode

crescer a partir de condições autotróficas, heterotróficas ou condições mistas (TOMASELLI, 2004; RICHMOND; QIANG, 2013, p.15). A Figura 3b de Richmond e Qiang (2013) mostra detalhes da organização celular de *C. vulgaris*. Segundo os autores, as células do gênero *Chlorella* apresentam uma fina parede celular e cloroplastos em forma de copo. Pirenóides podem estar presentes ou não. A acumulação de amido ocorre dentro dos cloroplastos. Chinnasamy et al. (2009) cultivaram *Chlorella vulgaris* sob diferentes condições de temperatura e CO₂ e concluíram que temperaturas acima de 30 °C prejudicaram o crescimento algal. Converti et al. (2009) concluiu em seu estudo que *Chlorella vulgaris* diminuiu em 17% sua taxa de crescimento quando a temperatura de cultivo excedia 30 °C.

3.2 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO MICROALGAL

O crescimento celular ocorre quando todos os componentes químicos celulares aumentam de forma ordenada. Quando esse crescimento é equilibrado, significa que os micro-organismos estão completamente adaptados dentro de um meio de cultura adequado. Sendo assim, ocorre a duplicação da biomassa, acompanhada da duplicação de proteínas, DNA, RNA e demais moléculas orgânicas. Tal crescimento é normalmente quantificado em termos de massa ou número de células (RUSSO, 2011).

Em relação ao crescimento da microalga *C. vulgaris*, Oshe et al. (2008) obteve em seu estudo uma curva de crescimento (Figura 4), que foi elaborada utilizando a densidade celular diária da média de três repetições utilizando o meio de cultura W.C. A curva de crescimento foi ajustada pela aproximação à curva logística, segundo Pindich e Rubenfeld (1981).

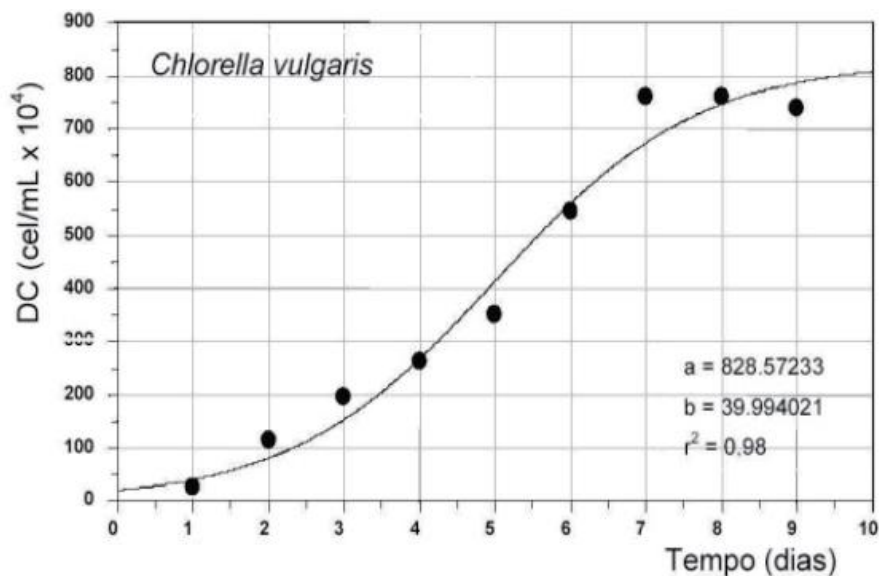


Figura 4 – Curva de crescimento de *Chlorella vulgaris*.
Fonte: Oshe et al. (2008).

A Figura 4 indica que houve aumento da densidade celular de *C. vulgaris* até o sétimo dia de cultivo. Após isso, o cultivo alcança uma fase estacionária de crescimento. Baseando-se neste estudo, o tempo de cultivo para remoção de nutrientes de *C. vulgaris* nesse projeto foi de sete dias, como será detalhado na metodologia.

No geral, o crescimento microalgal é muito mais rápido do que o das culturas terrestres. Durante o pico de crescimento, algumas espécies podem se duplicar a cada 3,5 horas. Esse crescimento acelerado é considerado um ponto positivo e torna as culturas de microalgas promissoras para uso econômico (OWENDE; BRENNAN, 2010)

As condições ideais de crescimento para culturas de microalgas são bastante específicas, e a produção de biomassa depende de diversos fatores. Dentre estes têm-se os fatores abióticos como temperatura, pH, qualidade de água, minerais, dióxido de carbono, ciclo e intensidade de luz; e fatores bióticos como fragilidade celular e densidade de células. Fatores mecânicos incluem agitação, tamanho e distribuição da bolha de gás e transferência de massa. Tais fatores são de principal interesse quando se trata de fotobiorreatores. A produtividade das culturas aumenta com a nutrição mineral ótima (SCHENK et al., 2008).

Pode-se dizer que as condições ótimas de crescimento variam de acordo com a espécie, porém, existem sugestões de condições generalizadas consideradas ideais para o cultivo de microalgas, como é o caso da Tabela 2 de Lavens e Sorgeloos (1996, p.10).

Tabela 2– Configuração generalizada das condições para o cultivo de microalgas.

Parâmetros	Faixa de alcance	Faixa ótima
Temperatura (°C)	16 – 27	18 - 24
Salinidade (g.L ⁻¹)	12 – 40	20 - 24
Intensidade de luz (lux)	1.000 – 10.000 (depende do volume e da densidade)	2.500 – 5.000
Fotoperíodo (claro:escuro, horas)	-	16:8 (mínimo)
	-	24:0 (máximo)
pH	7 – 9	8,2 – 8,7

Fonte: Lavens e Sorgeloos (1996, p.10).

3.2.1 Luminosidade

Grande parte das espécies de microalgas é fotoautotrófica: retira energia da luz e utiliza carbono na construção de sua biomassa, por meio do processo de fotossíntese. Sendo assim, a manutenção de luz deve ser mantida e monitorada com cautela em culturas microalgais (OSHE et al., 2007). Nesse sentido, o efeito da intensidade de luz – irradiância ou iluminação – no crescimento e cultivo de microalgas vem sendo estudado detalhadamente (SOARES, 2010).

A síntese de material orgânico é reflexo da atividade fotossintética, e é expressa pelo aumento da população microalgal (GLADUE, 1991; DERNER, 2006). De acordo com Darley (1982), a variação de luz influencia no tamanho da população tanto no espaço, em termos de profundidade e latitude, quanto no tempo, em termos de sazonalidade.

A faixa de aproveitamento das radiações luminosas pelos vegetais ocorre entre 400 e 700 nm (radiações fotossinteticamente ativas). Tais radiações representam apenas 50% da radiação solar – aproximadamente 400 Wm⁻² ou 1.800 μmol fóton m⁻² s⁻¹. A luz é absorvida pelos pigmentos fotossintetizantes, que são

classificados em clorofilas, carotenóides e ficolibinas. Cada uma dessas unidades fotossintéticas absorve radiação em um determinado comprimento de onda (CARIOCA; ARORA, 1984; SUH; LEE, 2003; SOARES, 2010).

De acordo com Masojídek (2004 apud GRESSLER, 2011, p.20)¹, após ser absorvida pelos pigmentos fotossintéticos, a energia em forma de luz é transferida para dentro dos centros de reação, ocorrendo, posteriormente, as reações fotoquímicas necessárias, que acarretam na fixação de carbono e produção de biomassa. Em relação aos valores de intensidade de iluminação, a Tabela 2 indica 2500 a 5000 lux como sendo os valores ideais, porém, estudos com *Chlorella sp.* relatam a eficiência no cultivo da microalga usando câmara de iluminação contínua com 13000 lux (KOTZABASIS et al., 1999). É importante considerar que a intensidade de luz ideal depende de fatores como os já citados acima: sazonalidade, densidade e volume da cultura microalgal.

A produtividade de biomassa aumenta com o aumento de intensidade luminosa até um determinado momento, após isso, existe o sombreamento feito pelas próprias células já existentes no meio de cultura (auto-sombreamento), fato que diminui a disponibilidade de luz por célula. Sendo assim, o processo de fotossíntese perde sua eficiência e ocorre uma certa diminuição da produtividade de biomassa (SOARES, 2010). Tal situação pode ser descrita também como fotoinibição (RICHMOND; QIANG, 2013).

3.2.2 Temperatura

A temperatura afeta diretamente no crescimento e na atividade da biomassa. Primeiro, devido a sua ação na estrutura dos componentes celulares, como proteínas e lipídios. E também devido a sua ligação com coeficientes cinéticos, os quais são extremamente influenciados pela mesma, pois dependem das energias de ativação das reações (BORGHETTI, 2009). Embora a maioria das espécies algais

¹ MASOJÍDEK, J.; KOBLÍZE K, M.; TORZILLO, G. **Photosynthesis in microalgae**. In: RICHMOND, A. Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology. Oxford: Blackwell Science, 2004. p. 20-39.

sobreviva em uma ampla faixa térmica, só há aumento na síntese orgânica na chamada faixa ótima de crescimento, que varia de acordo com a espécie. Caso a temperatura ótima de cultivo diminua, pode ocorrer um aumento no grau de insaturação dos sistemas de membranas lipídicas das células. É importante ressaltar também que baixas temperaturas aumentam a estabilidade e fluidez das membranas celulares, protegendo o cultivo do fenômeno da fotoinibição (OHSE et al., 2007; GRESSLER, 2011).

Decréscimos na temperatura ótima podem fazer com que as células adotem um mecanismo adaptativo: aumentam a produção de enzimas, para que haja manutenção das taxas fotossintéticas e respiração. A temperatura ótima para o crescimento pode acarretar em células menores, com menor volume de carbono e nitrogênio. Ou seja, fora do ótimo fisiológico é necessário mais carbono e nutrientes para gerar uma célula com a mesma taxa de crescimento (THOMPSON et al., 2002; HARRIS, 1988; DARLEY, 1982).

3.2.3 Aeração e agitação

A aeração é um processo mecânico que aumenta o nível de oxigênio dissolvido nas culturas de microalgas. Aerar as culturas é importante para promover a homogeneização dos nutrientes e para evitar a sedimentação das microalgas e estratificação térmica. Tal processo também possibilita o acesso das células à luz e auxilia as trocas gasosas. Além disso, a injeção de CO₂ pode auxiliar no processo de fotossíntese, especialmente para cultivos de grande escala (BORGHETTI, 2009; SOARES, 2010).

A injeção de CO₂ também serve de aporte parcial de CO₂ inorgânico e proporciona estabilidade do pH. A literatura afirma que cultivos em pequena escala (um litro ou menos) não necessitam aeração. Sugere-se uma agitação manual diária. Para os cultivos em grande escala, recomenda-se que se inicie a aeração dois dias após a inoculação (COLLA et al., 2002).

Quando o cultivo é de pequena escala e ocorre em bancadas, a agitação pode ser feita com indução de ar atmosférico por mangueiras de silicone. Cultivos de maior escala podem ser agitados utilizando aeradores, pás giratórias ou bombas de

recirculação (TAVARES; ROCHA, 2003). Para fotobiorreatores tubulares, é recomendado o uso de bombas mecânicas para promover a mistura (OWENDE; BRENNAN, 2010).

Convém ressaltar que um fluxo turbulento muito alto promovido pelo bombeamento de ar pode causar danos às células devido ao estresse hidrodinâmico. Por isso, é importante se atentar à escolha da geometria do fotobiorreator, ao tipo de bomba e à morfologia celular (BORGHETTI, 2009).

3.2.4 Nutrientes

O crescimento ótimo das microalgas está estritamente relacionado com a disponibilidade de macronutrientes (carbono, nitrogênio, oxigênio, hidrogênio, cálcio, magnésio, enxofre e potássio) e micronutrientes (manganês, ferro, zinco, molibdênio, cobre). Algumas espécies requerem também a adição de vitaminas ao meio de cultura (OHSE et al., 2007).

Carbono (constitui cerca de 50% da biomassa algal), nitrogênio e fósforo são considerados os elementos nutritivos mais importantes. Manganês e cobalto auxiliam na manutenção das atividades vitais (SOARES, 2010; SCHENK et al., 2008; LIMA et al., 1999). Já os íons minerais são essenciais para auxiliar na estrutura celular e metabolismo e também para facilitar a osmorregulação (KIRST, 1977). Em relação ao carbono, carboidratos são considerados sua fonte mais importantes. Dióxido de carbono também é uma fonte importante, que contribui para o crescimento fotossintético e autotrófico das microalgas. Por isso, em determinadas culturas se faz necessário sua adição (no ar existem apenas 0,03% de CO₂) (LIMA et al., 1999).

Nitrogênio constitui de 7% a 10% do peso seco celular das microalgas, e é um constituinte das proteínas (RICHMOND, 2004). Amônia, nitrito, nitrato e uréia são usados como fontes de nitrogênio no cultivo de microalgas. Ureia é a fonte de nitrogênio orgânico usada em ampla escala no cultivo de algas, especialmente para *Chlorella* e *Scenedesmus*, devido ao seu baixo custo (BECKER, 2004). Nitrato é utilizado como fonte de nitrogênio para diversas algas verdes. O nitrato absorvido pelas células é reduzido a nitrito por um "NADH dependente" de nitrato redutase. O

nitrito é então reduzido a amônia por uma "NADPH ligada" localizada de nitrito redutase. O amônio resultante é assimilado para formar aminoácidos pela glutamina sintetase e glutamato sintetase (MORRIS, 1974).

Fósforo é um macronutriente que possui papel importante no crescimento e metabolismo das algas. Ele é necessário na maioria dos processos celulares que envolvem transferência de energia e síntese de ácidos nucléicos (KULL, 1962). As formas de fósforo mais utilizadas pelas algas são o HPO_4^- e HPO_4^{2-} . Fosfatos orgânicos são encontrados em maior concentração na água do que os fosfatos inorgânicos. Eles devem ser hidrolizados por enzimas extracelulares como as fosfodiesterases ou fosfatases (POWELL et al., 2008).

Algas armazenam fósforo principalmente na forma de polifosfatos e metafosfatos. Esses compostos estão presentes na forma granular em algas sob condições de excesso de fósforo e desaparecem em condições limitantes. Polifosfatos estão presentes nas formas de ácido solúvel ou ácido insolúvel. Algas utilizam a forma solúvel no seu metabolismo e armazenam a forma insolúvel quando a quantidade de fosfato presente no meio de cultura é limitado (POWELL et al., 2008). A taxa de consumo de fósforo pelas algas depende da concentração de fósforo no ambiente e na célula, do pH e da temperatura (SANCHO et al, 1997).

3.2.5 pH

pH é definido pela NBR 9896/1993 como sendo o logaritmo do inverso da concentração hidrogeniônica. É uma característica físico-química expressa em valores de 0 a 14, sendo que pH menor do que 7 caracteriza um meio ácido, pH igual a 7 caracteriza um meio neutro e pH maior do que 7 caracteriza um meio alcalino. De acordo com Becker et al. (1988), o valor do pH de um meio de cultura é o resultado de fatores diversos, como, por exemplo, sua composição, quantidade de dióxido de carbono e minerais dissolvidos, temperatura – que influencia na solubilidade de CO_2 -, capacidade tamponante do meio e metabolismo das células.

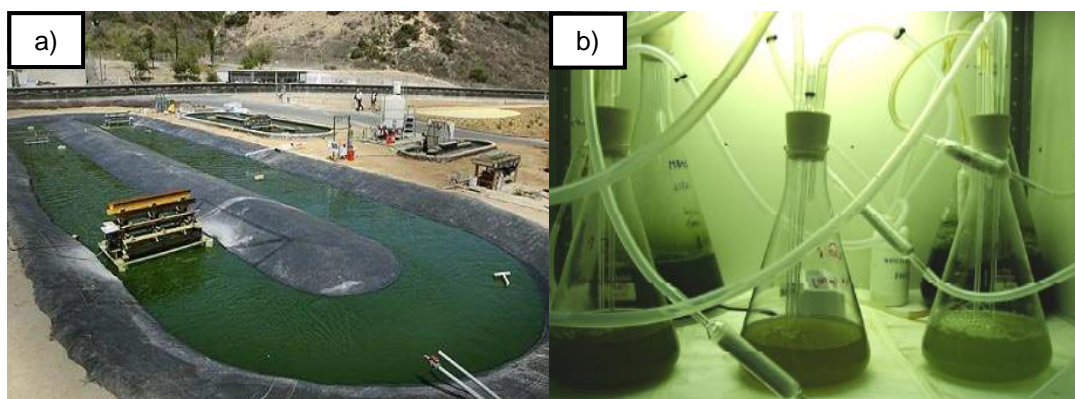
O aparato fotossintético das algas transporta íon hidróxido para o exterior da célula durante o consumo de formas inorgânicas de carbono, fato que eleva o pH. Esse processo ocorre com a ajuda da enzima anidrase carbônica, que age como

catalizador e se associa à captação de íons hidróxido para dentro das membranas tilacóides (LOPES, 2007; CUARESMA et al., 2006). Também ocorre variação de pH devido ao consumo de substratos e à degradação de metabólitos (GRIMA et al., 1999). O pH interfere na eficiência de remoção de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, através do processo de volatilização da amônia e precipitação de ortofosfato (NURDOGAN; OSWALD, 1995).

3.3 FOTOBIORREADORES

Microalgas podem ser cultivadas em lagoas abertas e em fotobiorreatores, sendo que fotobiorreatores utilizam menos água e produtos químicos, e produzem maior quantidade de biomassa, quando comparados com lagoas abertas, embora sua construção seja mais cara (BARBOSA et al., 2003).

Fotobiorreatores podem ser definidos como sistemas usados no desenvolvimento de reações fotossintéticas. Eles são classificados conforme o modo de alimentação (descontínuo ou contínuo), tipo de escoamento (mistura completa ou pistonado), forma de cultivo utilizada (células livres ou imóveis). Também são classificados conforme sua configuração: reatores abertos (Figura 5a – em contato com a atmosfera) ou fechados (Figura 5b – o contato com atmosfera significativamente reduzido ou inexistente) (MUÑOZ, 2005; GRESSLER, 2011).



**Figura 5 – Tipos de configuração de fotobiorreatores: a) tanque do tipo “raceway pond” típico para sistema aberto; b) biorreator fechado (erlenmeyers).
Fonte: Gressler (2011) e Borghetti (2009).**

Em relação à produtividade, esta é aumentada cinco vezes com relação ao volume do reator (BARBOSA et al., 2003). A eficiência do processo, sua estabilidade e custos também estão diretamente relacionados com a hidrodinâmica do meio (LOPES, 2007). Fotobiorreatores tubulares do tipo coluna de bolhas (Figura 6) e sistemas tubulares dispostos em espiral são os mais comuns (GRIMA et al., 1999). Os tanques e fotobiorreatores podem ser protegidos por estufa, como é o caso da Figura 7, que mostra um biorreator aberto em forma de tanque pequeno e biorreator aberto em tanque grande, ambos cobertos por estufa.

Fotobiorreatores fechados são geralmente projetados como reatores de tela plana, reatores tubulares, reatores de placas, ou reatores de coluna de bolhas. Luz deve ser uniformemente fornecida para todo o volume do fotobiorreator para que as células fiquem expostas a moderada intensidade de luz (GRESSLER, 2011; CARLOZZI, 2003). Racault e Boutin (2005) afirmam que fotobiorreatores abertos têm limitações decorrentes das taxas de evaporação da água, requerimento de grandes áreas para construção e elevado risco de contaminação.



Figura 6 – Fotobiorreator tubular verticalmente inclinado para o cultivo fechado de microalgas.

Fonte: Gressler (2011).

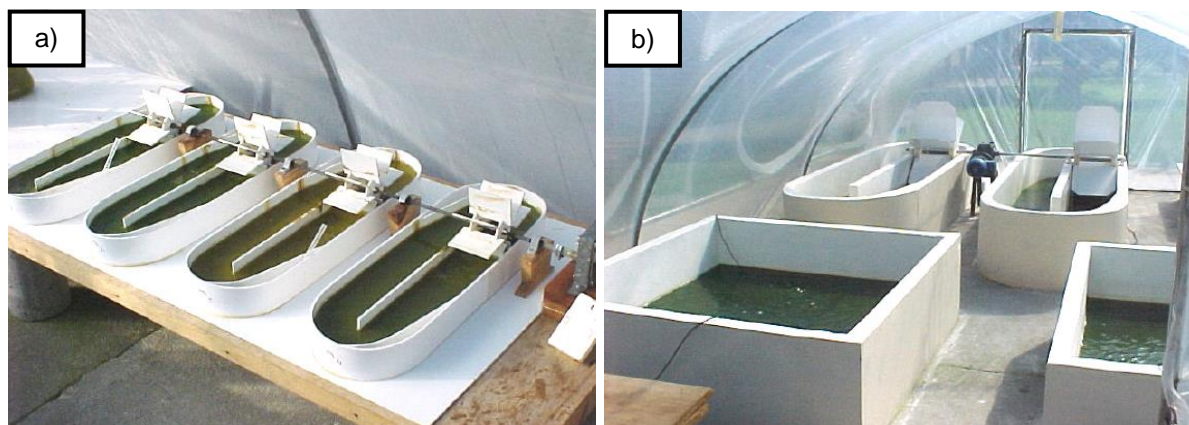


Figura 7 – Biorreatores protegidos por estufa: a) biorreator aberto em forma de tanque pequeno; e b) biorreator aberto em tanque grande.
Fonte: Borghetti (2009).

3.4 TRATAMENTO DE EFLUENTES CONVENCIONAL E SUAS LIMITAÇÕES

Sabe-se que as estações de tratamento de efluentes executam diversas etapas. O tratamento preliminar remove sólidos grosseiros em suspensão. O tratamento primário remove sólidos em suspensão e parte da matéria orgânica e inorgânica. O tratamento secundário elimina sólidos dissolvidos, como carboidratos, proteínas, lipídios e sólidos suspensos finos. O tratamento terciário visa remover nutrientes e patógenos. A partir do tratamento terciário obtém-se água de qualidade superior, com elevada remoção de matéria orgânica e nutrientes - como nitrogênio, fósforo e sódio - assim como bactérias patogênicas (MACHADO, 2005).

O tratamento secundário pode ser realizado utilizando diversas técnicas: tanque séptico, filtros anaeróbios, reator UASB, lagoas de estabilização, reatores aeróbios com biofilmes, lodos ativados, dentre outros (COPASA, 2014). Dentre estes métodos, alguns são de alto custo, outros possuem difícil controle e execução, além de produzir odores. Considerando que a descarga de efluente tratado em corpos de água só deve acontecer quando este alcança os limites estabelecidos pelas legislações pertinentes para nitrato, fosfato e demais substâncias, a remoção dos mesmos utilizando microalgas torna-se uma interessante alternativa, visto que micro-organismos utilizam esses compostos em seu metabolismo de forma simples.

3.5 LEGISLAÇÃO PERTINENTE AO LANÇAMENTO DE EFLUENTES EM CORPOS RECEPTORES

De acordo com Von Sperling (2005) existe a necessidade de estabelecimento de padrões de qualidade embasados por um suporte legal. As entidades envolvidas com a água a ser utilizada devem cumprir estes padrões, seguindo, assim, a legislação. O autor ainda afirma que, em termos práticos, existem alguns padrões de interesse no que diz respeito à qualidade dos corpos de água e ao reúso de efluentes tratados: padrões de lançamento no corpo receptor, padrões de qualidade do corpo receptor e padrões ou diretrizes de qualidade para determinado uso do efluente tratado.

Em relação ao lançamento no corpo receptor, existe a Resolução CONAMA nº 357 de 2005, complementada pela CONAMA nº 430, de 2011. Estas resoluções dispõem sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes. Tal legislação não aborda os limites de lançamento de nitrato e fosfato, nem de fósforo total, apenas atribui como limite de lançamento de nitrogênio amoniacal total o valor de 20,0 mg/L N, e desobriga o controle dessa substância no caso de esgoto sanitário.

De acordo com a CONAMA nº 357/05, para corpos de águas doces (Classe II – águas doces) os padrões de qualidade de água estabelecidos para nitrato e fósforo total seguem na Tabela 3.

Tabela 3 – Padrões de qualidade de água para águas doces Classe II.

Parâmetros Inorgânicos	Valor máximo
Fósforo total (ambiente lêntico)	0,030 mg/L P
Fósforo total (ambiente intermediário, com tempo de residência entre 2 e 40 dias, e tributários diretos de ambiente lêntico)	0,050 mg/L P
Fósforo total (ambiente lótico e tributários de ambientes intermediários)	0,1 mg/L P
Nitrato	10,0 mg/L N

Fonte: CONAMA 357/05.

Para Von Sperling (2005), os padrões de qualidade de água e os padrões de lançamento de efluentes estão inter-relacionados, de forma que o atendimento aos padrões de lançamento deve garantir simultaneamente o atendimento aos padrões do corpo receptor. Por exemplo, se o efluente satisfizer os padrões de lançamento, mas não satisfizer os padrões do corpo receptor, o lançamento deverá possuir características mais restritivas do que as expressas pelo padrão de lançamento usual. Caso o efluente não satisfaça os padrões de lançamento, mas satisfaça os padrões do corpo receptor, é possível que haja a autorização de lançamentos com valores acima dos padrões de lançamento.

3.6 MICROALGAS E REMOÇÃO DE NUTRIENTES

A idéia do uso de microalgas em processos de remoção de nutrientes foi proposta pela primeira vez por Oswald e Gotaas (1957). Borowitzka (1999) relata que as espécies mais utilizadas nesta prática, assim como no cultivo de biomassa para fins de bioenergia são as clorofíceas *Chlorella spp.*, *Scenedesmus dimorphus*, *Dunaliella salina*, e algumas cianobactérias, como, por exemplo, *Spirulina spp.*

Kim et al. (1998) reportou 95,3% e 96% de remoção de nitrogênio e fósforo, respectivamente, pela *Chlorella vulgaris* em efluentes de suínos secundariamente tratados, após quatro dias de incubação. Traviesco et al. (2008) tratou efluentes de destilarias utilizando microalgas cultivadas em um reator anaeróbico e obteve 90,2%, 84,1% e 95,5% de remoção de nitrogênio orgânico, amônia e fósforo total, respectivamente. Utilizando iluminação artificial, os autores Aslan e Kapdan (2006) obtiveram uma remoção média de 21,2 mg/L de nitrogênio amoniacal e 7,7 mg/L da concentração inicial de PO₄-P, obtendo 78% de eficiência.

Convém ressaltar que os principais mecanismos de remoção de nutrientes de efluentes utilizados por microalgas incluem a absorção pela célula e extração de amônia por meio de elevado pH (HOFFMAN, 1998; BICH et al., 1999).

3.7 MICROALGAS, POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E ENERGÉTICO

No Brasil, atualmente utiliza-se combustíveis de origem fóssil como principais fontes de energia. Aproximadamente 40% da energia disponível no país é proveniente de petróleo e derivados, como pode ser visto na Figura 8 (EMPRESA..., 2012). Pesquisas apontam para o esgotamento das fontes de energia fósseis ainda neste século. Também é importante ressaltar a problemática ambiental relacionada com o uso de combustíveis fósseis, tanto em termos de sua extração, que pode causar drásticos impactos ambientais, quanto em relação à poluição ambiental decorrente da queima dessas substâncias, como a emissão de gases de efeito estufa, por exemplo. Além disso, atualmente existem disputas comerciais e políticas envolvendo a exploração de petróleo. Ou seja, fatores de caráter econômico, ambiental e político justificam a necessidade de se investir em fontes de energia mais limpas, principalmente em escala global (JARDINE et al., 2009; DEFANTI et al., 2010).

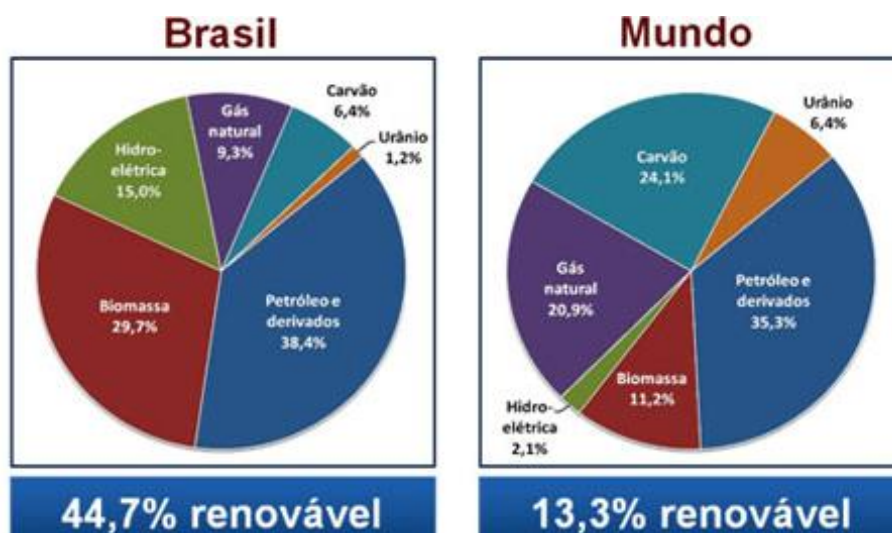


Figura 8 – Matriz energética no Brasil e no mundo em 2006.
 Fonte: MME/BEN (2006).

O biodiesel pode ser uma alternativa e solução para este problema em diversos países. Franco et al. (2013) caracteriza biodiesel como um combustível biodegradável derivado de biomassa renovável. É composto por uma mistura de

ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, produzida a partir da reação de um óleo com um álcool, na presença de um catalisador.

Atualmente, a produção de biodiesel a partir de oleaginosas contribui apenas para 0,3% da demanda global de combustível para transporte (SCHENK et al., 2008). Tal produção não pode ser aumentada ao utilizar terra arável sem que o suprimento de alimentos seja afetado. Microalgas, no entanto, podem ser cultivadas em ambientes salinos e em efluentes sem que haja interferência na agricultura. Biocombustíveis derivados de algas possuem um grande potencial para suprir a demanda de combustível do mundo (SCHENK et al., 2008).

As vantagens do uso de biocombustíveis derivados de microalgas são:

- Microalgas podem ser cultivadas durante todo o ano (não sofrem influência sazonal), portanto, a produtividade de óleo a partir de culturas de microalgas é maior do que a produtividade das melhores culturas de oleaginosas (SCHENK et al., 2008).
- Apesar de crescerem em meios de cultura aquosos, as microalgas requerem menos água do que culturas terrestres, reduzindo a demanda requerida de água potável (DISMUKES et al., 2008).
- Microalgas crescem rapidamente e muitas espécies contêm óleo na faixa de 20 a 50% de peso seco da biomassa - as taxas de crescimento exponencial podem dobrar sua biomassa em períodos curtos - (CHISTI, 2007).
- Em relação à manutenção e melhoria da qualidade do ar, a produção de biomassa também pode afetar e auxiliar na biofixação de CO₂ (1 kg de biomassa algal seca utiliza aproximadamente 1,83 kg de CO₂) (CHISTI, 2007).

3.8 BIODIESEL DE MICROALGAS

Para que a produção de biodiesel seja possível, é necessário, primeiramente, a recuperação e desidratação da biomassa. Após isso, faz-se a extração dos lipídios e a transformação dos mesmos em biodiesel.

Recuperação da biomassa e desidratação

Os métodos mais comuns para a recuperação da biomassa, que consiste na separação sólido-líquido incluem sedimentação, centrifugação, filtração e ultrafiltração. Em alguns casos também utiliza-se uma etapa adicional de floculação ou flotação (CHEN et al., 2011, p. 77). Após isso, é importante que a biomassa recuperada seja processada o quanto antes. Visando prolongar o tempo de conservação do material adquirido, é comum o processo de desidratação (ARCEO, 2012). As técnicas de desidratação mais utilizadas são: secagem por nebulização (*spray-drying*), *tambor de secagem (drum-drying)*, liofilização (*freeze-drying*) e secagem ao sol (*sun-drying*) (BRAGA, 2005; ARCEO, 2012; OWENDE; BRENNAN, 2010).

Extração do óleo das microalgas

Segundo Pérez (2007), existem cinco métodos bastante conhecidos para extração de óleos das sementes de oleaginosas, os quais podem ser considerados na extração de óleos de microalgas:

1. Prensagem: consiste na utilização de uma prensa, que pode extrair até 75% de óleos migroalgal. A prensa comprime as microalgas em um determinado volume, aplicando pressão mecânica.
2. Extração por solventes: produtos químicos como o benzeno, éter etílico e n-hexano (de baixo custo) podem ser utilizados na extração do óleo de microalgas. A desvantagem dessa opção seria a periculosidade de se manusear tais substâncias. A extração utilizando hexano pode ser

realizada isoladamente ou em conjunto com uma prensa. Depois da extração, filtra-se a polpa, e o óleo e o hexano são separados por destilação.

3. Extração com fluido supercrítico: embora esse método possa extrair até 100% de todo o óleo, ele necessita de equipamento especial. Utiliza-se CO₂, que é liquefeito sob pressão e aquecido até atingir seu ponto supercrítico.
4. Extração enzimática: nesse processo utiliza-se enzimas para degradar a parede celular das microalgas, liberando o óleo para o meio aquoso. Este método possui custo mais elevado do que a extração por hexano.
5. Choque osmótico: método que promove a redução repentina da pressão osmótica, causando ruptura na parede das células. O choque osmótico libera componentes, tais como óleos e proteínas.

Transformação do óleo microalgal em biodiesel

Biodiesel pode ser obtido através de diversos processos, como, por exemplo, o hidrocraqueamento, a esterificação, o craqueamento, e a transesterificação, sendo que este último é o mais utilizado (GRESSLER, 2011; CARTONI, 2009). Neste trabalho, o processo de transesterificação será detalhado.

A transesterificação se caracteriza como uma reação química formada por três etapas reversíveis em série. Primeiramente, os triglicerídios são convertidos em diglicerídios. Após isso, os diglicerídios são transformados em monoglicerídios. Por fim, os monoglicerídios são convertidos em ésteres (biodiesel) e glicerol – subproduto (Figura 9) (MATA et al., 2010). Para que essa reação ocorra, adiciona-se etanol ou metanol aos triglicerídios e um catalisador (geralmente hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio). Adiciona-se de 60 a 100% de metanol em excesso para garantir que a reação se complete (KUCEK, 2004). A reação de transesterificação pode ser descrita como uma reação orgânica na qual um éster é transformado em outro pela mudança na porção alcóxi (CORDEIRO, 2003).

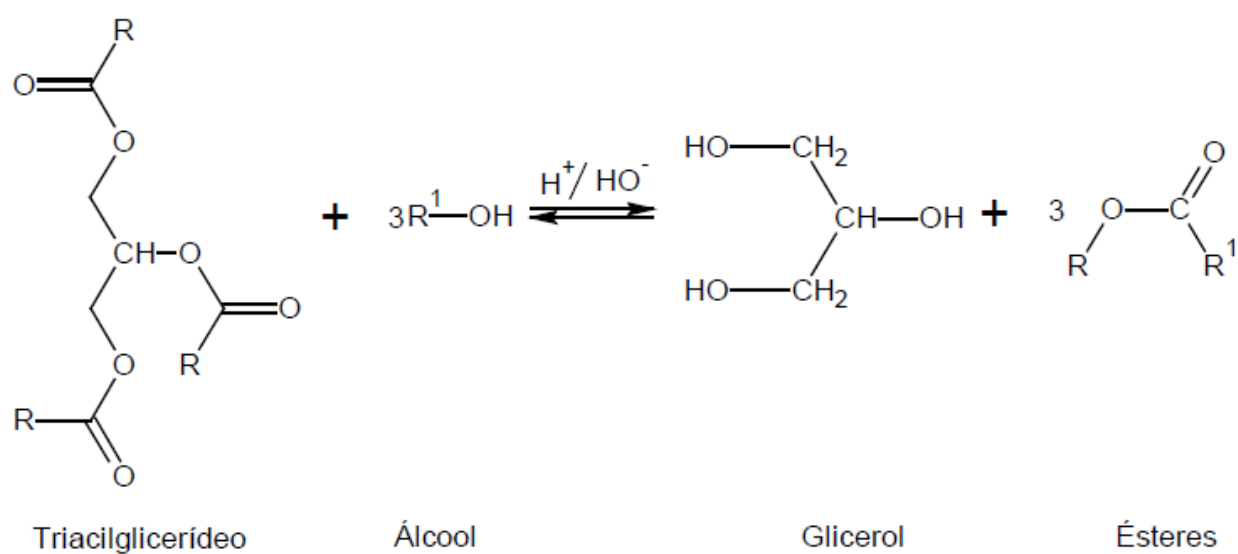


Figura 9 – Equação geral da reação de transesterificação, onde R representa a cadeia carbônica dos ácidos graxos e R¹ a cadeia carbônica do álcool reagente.
 Fonte: Schuchardt et al. (1997).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL E PERÍODO DA REALIZAÇÃO DO PROJETO

O projeto experimental referente a este trabalho foi realizado no período compreendido entre maio a agosto de 2013 no laboratório de Química Ambiental do *Advanced Technology & Manufacturing Center (ATMC)*, pertencente à Universidade de Massachusetts, Dartmouth, e localizado na cidade de Fall River, Massachusetts, Estados Unidos (Figura 10) (Latitude: 41°40'49,73"N; Longitude: 71° 7'43,06"W).



Figura 10 – Advanced Technology & Manufacturing Center (ATMC), Fall River, USA.
Fonte: Google Earth (2014) e University of Massachusetts Dartmouth (2014).

4.2 FASES DE EXECUÇÃO DO PROJETO

Pode-se verificar na Figura 11 as etapas principais do que foi executado durante este trabalho. Observa-se nas Figuras 12 e 13 as etapas que foram realizadas visando alcançar os dois principais objetivos: cultivo da microalga *C. vulgaris* para remoção de nutrientes em efluente sintético; e produção de biodiesel a partir de sua biomassa, respectivamente. Detalhes de cada etapa serão dados nas

próximas seções. Primeiramente, focou-se no cultivo e crescimento ótimo das microalgas e na remoção de nitrato e fosfato. Após isso, houve o tratamento da biomassa algal para extrair seus lipídios e transformá-los em biodiesel.

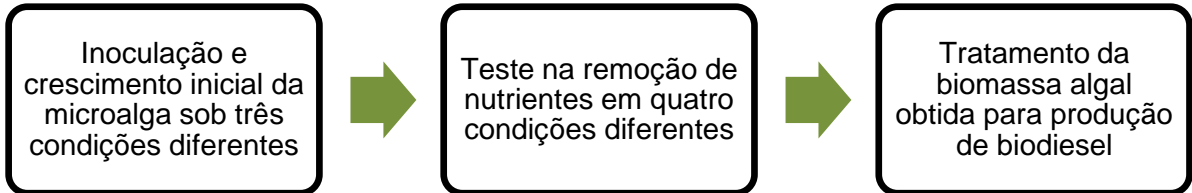


Figura 11 – Etapas principais da execução do projeto.
Fonte: Autoria própria.

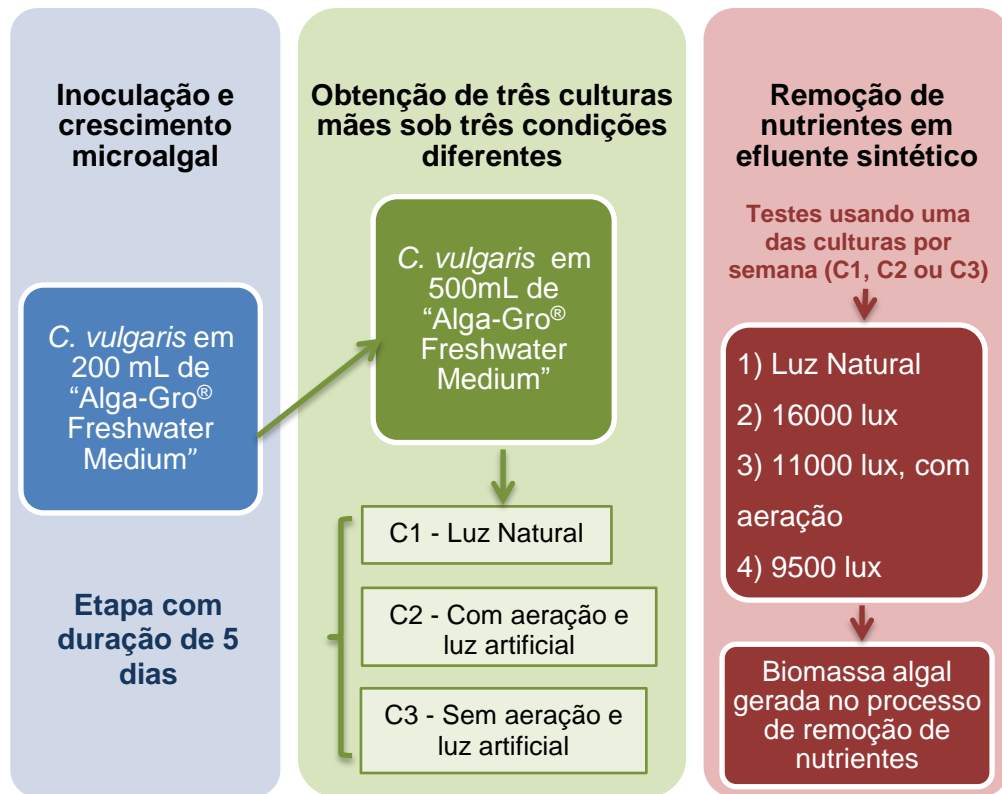


Figura 12 – Etapas realizadas durante a inoculação e crescimento da microalga, e testes na remoção de nutrientes.
Fonte: Autoria própria.

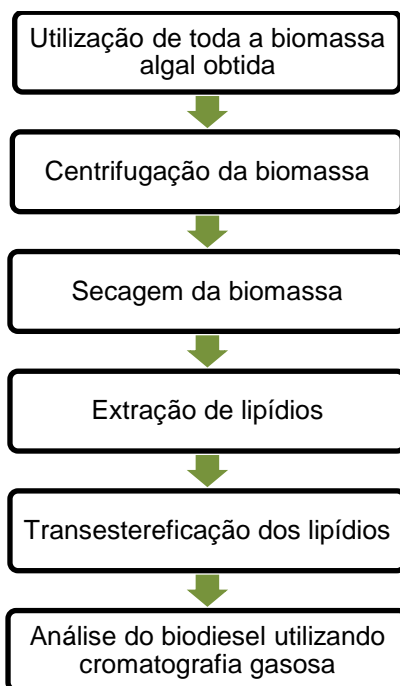


Figura 13 – Tratamento da biomassa algal para produção de biodiesel e sua posterior análise.

Fonte: Autoria própria.

4. 3 DESIGN DO FOTOBIORREATOR

Neste estudo, considerou-se a caixa que provia iluminação e aeração para os frascos e os frascos em si como um conjunto que formava um fotobiorreator. Em relação ao seu design, a caixa possui um termômetro digital *Min/Max Traceable* da *Control Company*, que capta temperaturas de -50 a 70°C , e foi utilizado na medição da temperatura interna do fotobiorreator (Figura 14a); e um higo-termômetro digital *Extech 445713 Indoor/Outdoor* (Figura 14b), que foi utilizado na medição da temperatura ambiente.

Uma bomba de ar *Tetra 77855 Whisper* (Figura 14c) foi utilizada para promover a aeração de algumas amostras. A bomba foi posicionada em cima do fotobiorreator e havia um filtro de ar (Figura 14d) na lateral esquerda, ligado diretamente à bomba (Figura 15b). Assim que adentrava ao fotobiorreator, o tubo de saída de ar era ligado a um mecanismo que subdividia e controlava a intensidade do fluxo em três outros tubos, que poderiam ser posteriormente inseridos nas bateladas

de efluente (Figura 14e e 14f). A agitação/mistura das amostras era feita de forma manual, diariamente.

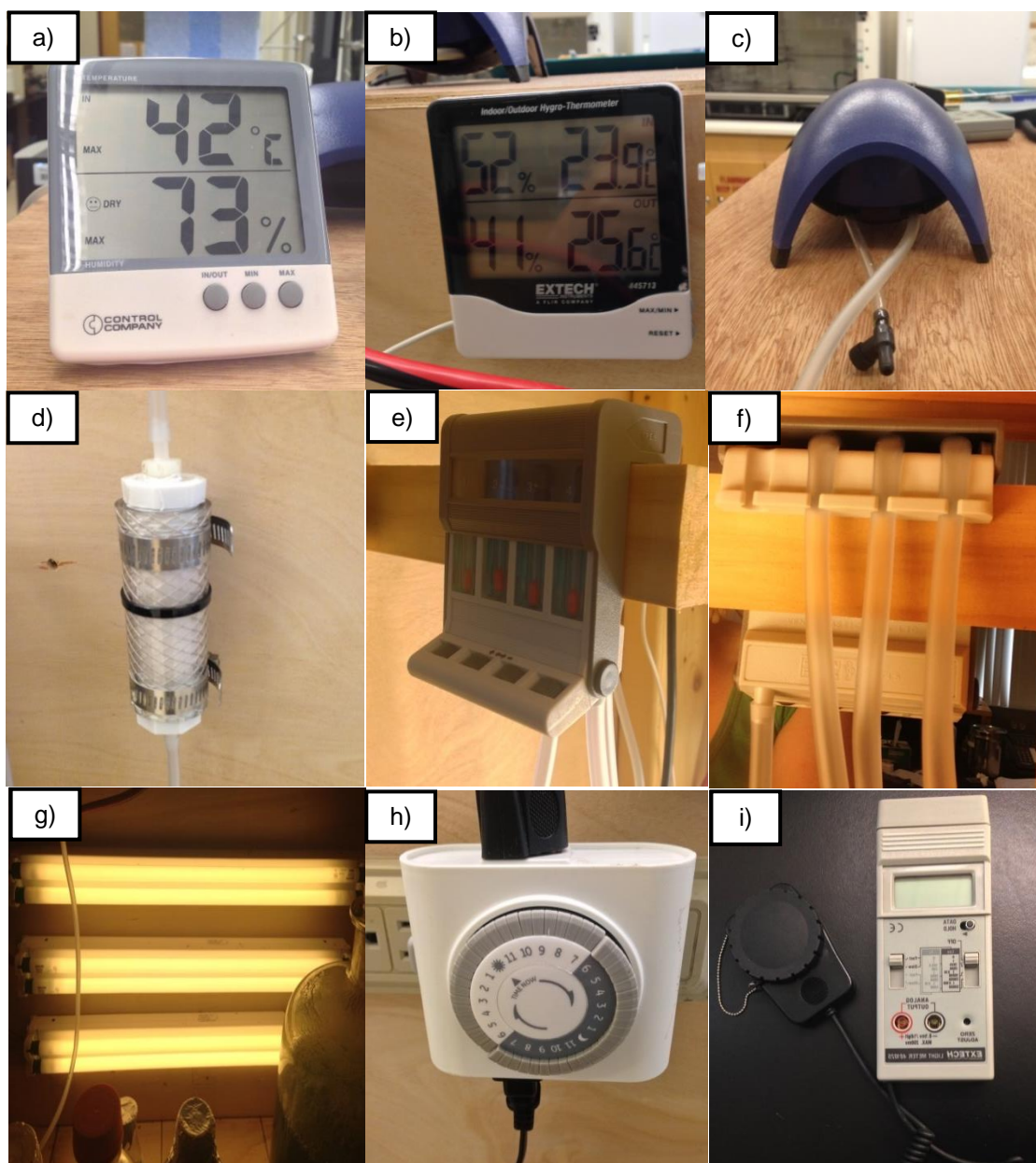


Figura 14 – Design do fotobiorreator: a) Termômetro digital Min/Max Traceable; b) Higrôtermômetro digital Extech 445713; c) Bomba de ar Tetra 77855 Whisper; d) Filtro de ar; e) Mecanismo de controle de intensidade de aeração; f) Saída de tubos de aeração; g) Lâmpadas do fotobiorreator; h) Timer Heavy Duty 15075; e) Medidor de intensidade de luz Extech 401025.

Fonte: Autoria própria.

A iluminação era gerada por três lâmpadas fluorescentes *PHILIPS Silhouette F14T5/830 Alto collection* (Figura 14g), com fotoperíodo 16:8 (16 horas de claro e 8 horas de escuro), controlado pelo *timer Heavy Duty 15075*, da marca *General Electric* (Figura 14h). A intensidade de luz dentro do reator era de até 17000 lux. O interior do fotobiorreator foi dividido em seções (como mostra a Figura 15a) e a intensidade de luz em cada uma das seções foi mensurada utilizando o light meter *Extech 401025* (Figura 14i). A intensidade de luz solar da área externa ao laboratório também foi medida diariamente utilizando o instrumento da Figura 14i. As temperaturas médias do ar externo na cidade de Fall River durante o experimento foram obtidas no site *AccuWeather*.

A caixa que abrigava os frascos de cultura possui aproximadamente 80 cm de largura, 65 cm de altura e 40 cm de profundidade, e foi adaptado para o uso durante o projeto. A Figura 15 mostra as vistas interna, lateral esquerda, atrás e frontal do fotobiorreator. A Figura 15a visa possibilitar a visualização da parte interna da caixa, sendo que frasco grande que aparece na imagem não pertence a este experimento, e sim a outro experimento que estava sendo realizado concomitantemente.

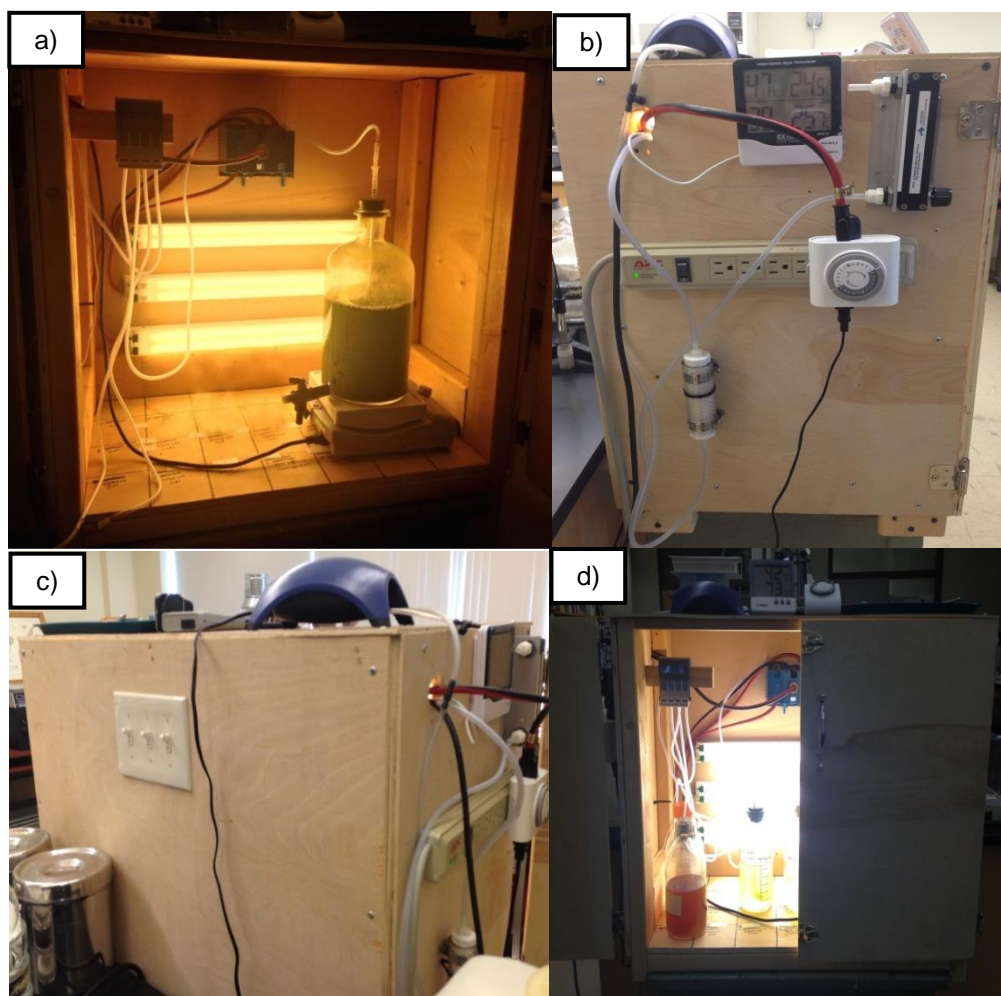
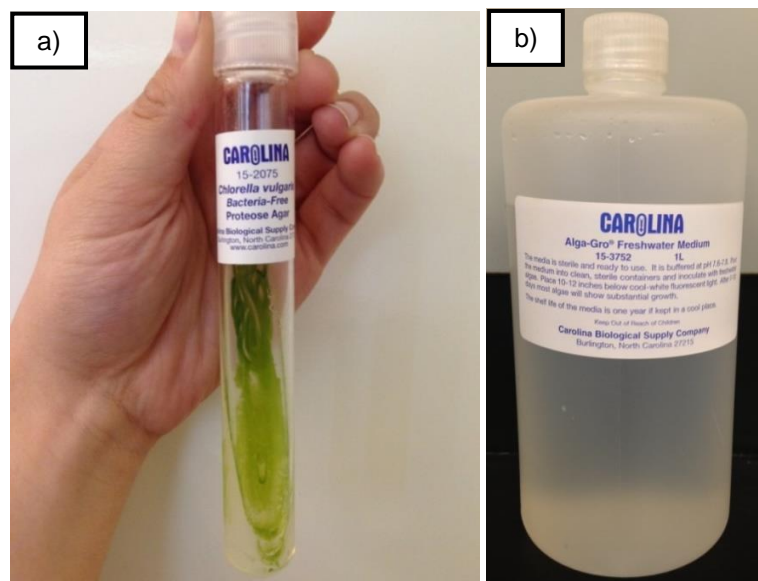


Figura 15 – Configuração do fotobiorreator: a) interna; b) lateral esquerda; c) atrás; e d) frontal.

Fonte: Autoria própria.

4.4 MICRO-ORGANISMO E MEIO DE CULTURA

A microalga verde *C. vulgaris* e o meio de cultivo *Alga-Gro*[®] *Freshwater Medium* utilizados nos experimentos (Figura 16) foram adquiridos com a companhia *Carolina Biological Supply* da Carolina do Norte, Estados Unidos.



**Figura 16 – a) *Chlorella vulgaris* em proteose ágar e b) Alga-Gro® Freshwater Medium pronto para uso.
Fonte: Autoria própria.**

O meio de cultura utilizado para o cultivo inicial da microalga, de acordo com *Carolina Biological Supply* (2012), é destinado ao rápido crescimento de uma grande variedade de algas de morfologia normal e já é vendido pronto para uso, com pH 7,8. A transferência da microalga para o meio de cultura foi feita como é mostrado na Figura 17. Primeiramente, lavou-se o conteúdo do tubo de ensaio que continha *C. vulgaris* com 5 mL de água destilada, transferindo a mistura de microalga e água destilada para um erlenmeyer contendo 200 mL de “Alga-Gro® Freshwater Medium”.

Após este procedimento, o erlenmeyer foi mantido no fotobiorreator por cinco dias, baseando-se no estudo de Oshe et al. (2008). Os autores afirmam que a densidade celular de *C.vulgaris* aumenta até o sétimo dia de cultivo. Após isso, o cultivo alcança uma fase estacionária de crescimento. Optou-se por cinco dias para que a cultura não começasse a atingir a fase de estabilização. É importante ressaltar que, durante o pico de crescimento, algumas espécies microalgais podem se duplicar a cada 3,5 horas. Após os cinco dias, a cultura obteve a densidade celular de 1.235.000 células/mL, e prosseguiu-se com as demais etapas do experimento. O frasco foi mantido com aeração constante, fotoperíodo 16:8 e intensidade de luz de 11000 lux (Figura 18).

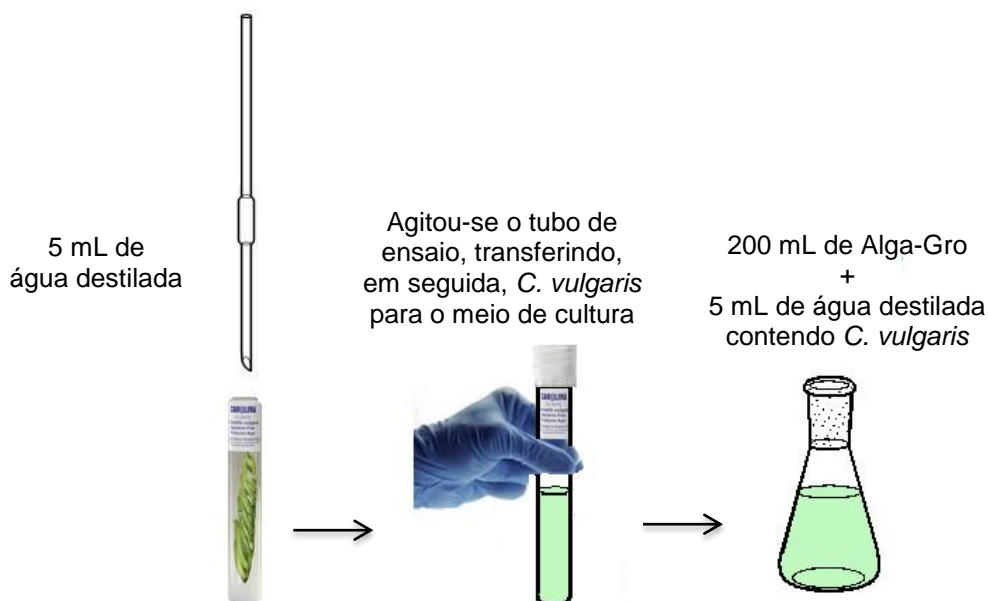


Figura 17 – Transferência da microalga *C. vulgaris* para o meio de cultura.
 Fonte: Autoria própria.

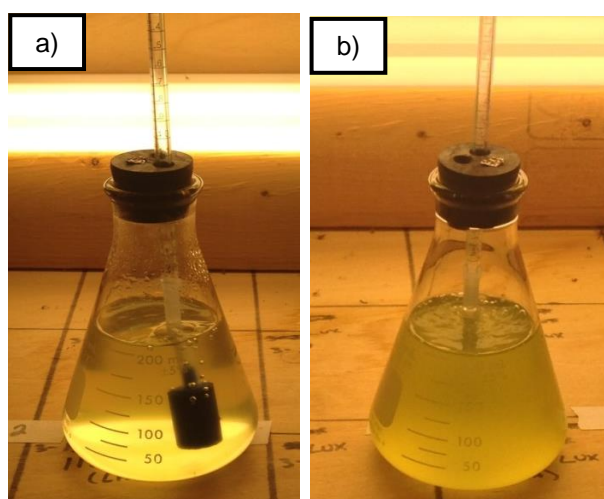


Figura 18 – Cultivo inicial de *C. vulgaris* em fotobiorreator:
 a) primeiro dia e b) quinto dia.
 Fonte: Autoria própria.

A partir desta etapa, prosseguiu-se com o cultivo, transferindo a cultura de *C. vulgaris* (Figura 18b) para três frascos maiores (1litro) contendo 500 mL de “Alga-Gro® Freshwater Medium”, visando otimizar o crescimento da microalga.

Foram utilizados 65mL da cultura da Figura 18b para cada frasco. Após isso, três condições de crescimento diferentes foram adotadas (Figura 19): sob luz natural, sem aeração; luz artificial, com aeração; e luz artificial, sem aeração. Tais

condições de cultivo serão identificadas no texto, a partir de agora, como: C1, C2 e C3, respectivamente.

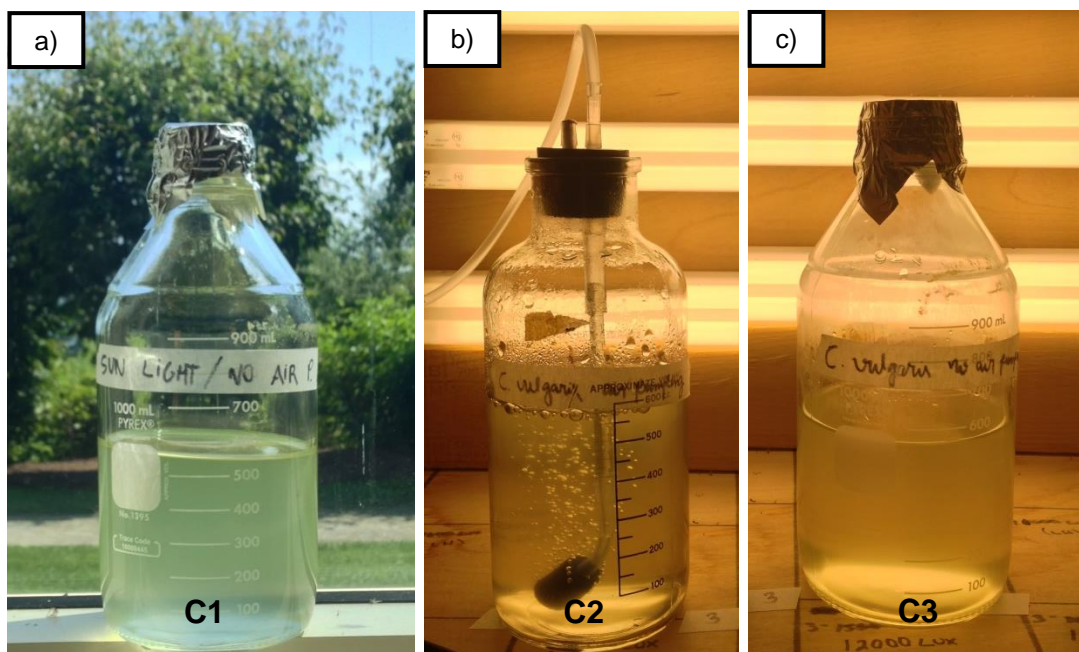


Figura 19 – Cultivo de *C. vulgaris* em: a) luz natural, sem aeração; b) luz artificial, com aeração; e c) luz artificial, sem aeração.
Fonte: Autoria própria.

C1 foi mantida com fotoperíodo natural. Verão era a estação vigente no local de estudo (com dias mais longos e noites mais curtas). C2 e C3 foram mantidas em fotoperíodo 16:8.

Microalgas oriundas das condições C1, C2 e C3 foram testadas na remoção de nitratos e fosfatos em efluentes separadamente. Assim, seria possível avaliar se diferentes condições de crescimento inicial interferem na remoção de nutrientes e, caso interfiram, qual seria a condição de crescimento que gera microalgas com maior capacidade de remoção.

4.5 EFLUENTE SINTÉTICO

Neste estudo considerou-se o meio de cultura *Micro Algae Grow* comercializado pela empresa *Florida Aqua Farms Inc.* (Figura 20a) como efluente sintético. Tal meio é dividido em *Part A* – nutrientes traço/micronutrientes, na forma líquida – e *Part B* (*Mass Pack*, na forma sólida). Este foi considerado como “efluente”, visto que sua composição (Tabela 4) é rica em nitrogênio e fósforo nas formas de nitrato e fosfato, que são os principais nutrientes causadores do fenômeno da eutrofização e continuam presentes em efluentes até mesmo após o tratamento secundário. No preparo do “efluente concentrado” foram utilizados 20 mL da *Part A* e 250 g da *Part B* para um litro de água destilada (Figura 20b).

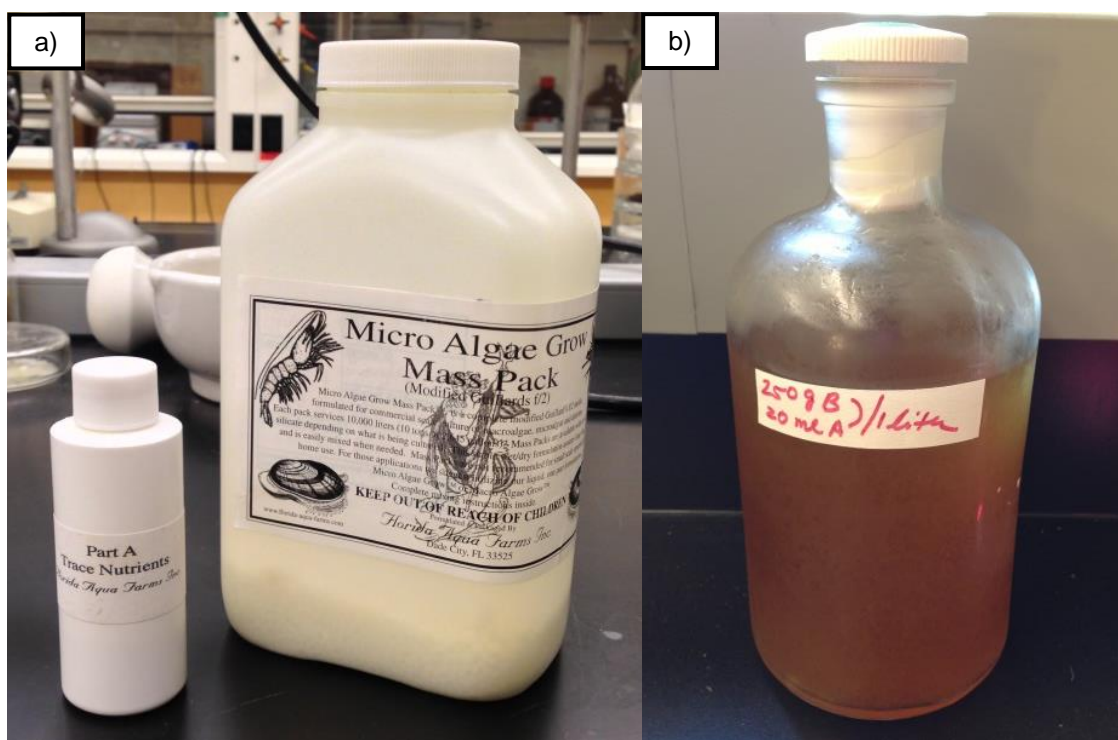


Figura 20 – *Micro Algae Grow*: a) Part A e *Mass Pack* (Part B); e b) meio preparado.
Fonte: Autoria própria.

Tabela 4– Composição do meio de cultura *Micro Algae Grow*.

Nutriente	Concentração (g/L de água destilada)
Part A	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	6,3
MnCl ₂ .4H ₂ O	180
CoCl ₂ .6H ₂ O	10
ZnSO ₄ .7H ₂ O	22
CuSO ₄ .5H ₂ O	9,8
Tiamina	0,02
Biotina	0,001
Vitamina B ₁₂	0,001
Part B	
NaNO ₃	75
NaFeEDTA	4,36
NaPO ₄	5

Fonte: Florida Aqua Farms Inc. (2010) e adaptado pela autora.

A partir do concentrado mostrado na Figura 20b, a cada semana de teste foram preparadas diferentes concentrações de “efluente sintético”, diluindo pequenas quantidades do concentrado em um litro de água destilada. As diluições feitas e suas respectivas concentrações iniciais de nitrato e fosfato (verificadas no espectrofotômetro HACH DR/4000) seguem indicadas na Tabela 5.

Tabela 5– Diluições utilizadas no efluente em teste a cada semana e suas concentrações de nutrientes resultantes.

Semana	Quantidade de “efluente” concentrado utilizada por litro de água destilada	NO₃⁻-N (mg/L)	NO₃⁻ (mg/L)	PO₄³⁻ (mg/L)	P (mg/L)
1	1mL	29	130	32,1	10,5
2	0,5mL	13	60	15	5
3	0,3mL	9	40	10,8	3,5
4	10µL	0,8	4	1,02	0,33
5	20µL	1,5	7,5	2,3	0,74

Fonte: Autoria própria.

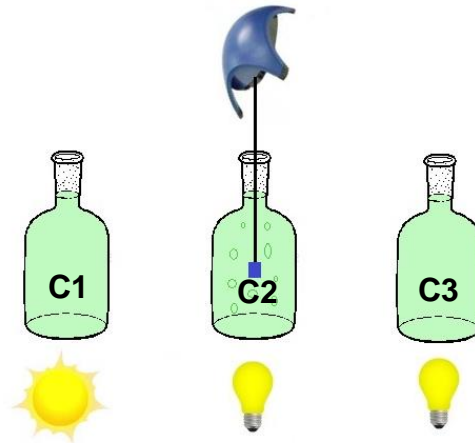
4.6 REMOÇÃO DE NITRATO E FOSFATO

A cada semana, 5 mL de uma das culturas mães da Figura 19 era inoculada em 150 mL de efluente sintético mantido sob quatro diferentes condições e, assim, era testada na remoção de nutrientes (Figura 21). As condições de cultivo eram:

- **Luz natural e sem aeração**
- **16000 lux e sem aeração**
- **11000 lux e com aeração**
- **9150 lux e sem aeração**

Na semana seguinte, uma cultura microalgal mãe diferente era testada na remoção de nitrato e fosfato, e assim sucessivamente. Os dados foram coletados durante cinco semanas, sendo que uma das culturas mãe foi testada mais de uma vez. A ordem de teste foi: C2 (Figura 19b), C3 (Figura 19c), C1 (Figura 19a), C2 (Figura 19b), C2 (Figura 19b), totalizando cinco semanas de experimento. A cultura mãe C2 foi utilizada mais de uma vez devido ao seu melhor desempenho na remoção de nutrientes quando comparada com as culturas C1 e C3. Além disso, ao longo do estudo considerou-se mais interessante utilizar a cultura mãe que estava sendo aerada. Sendo assim, cinco dias antes de se iniciar o teste da quarta semana (que utilizou C2), repicou-se a cultura C2, gerando uma mais nova, com células mais saudáveis e que foi utilizada na inoculação da quarta e da quinta semana. O processo de repicamento da cultura e cultivo de cinco dias prévios à inoculação seguiram a mesma metodologia descrita no item 4.4.

Visando avaliar as concentrações de nitrato e fosfato no efluente sintético, diariamente eram retiradas amostras de 5 mL do efluente em tratamento naquela determinada semana. Também eram mensurados o pH e a densidade celular (contagem de células). Os softwares MS EXCEL 2010 e MATLAB 7.10 foram utilizados no processamento da informação coletada.



A cada semana, microalgas cultivadas em uma das condições acima eram testadas na remoção de nutrientes em quatro bateladas, que eram mantidas em diferentes condições de iluminação e aeração.

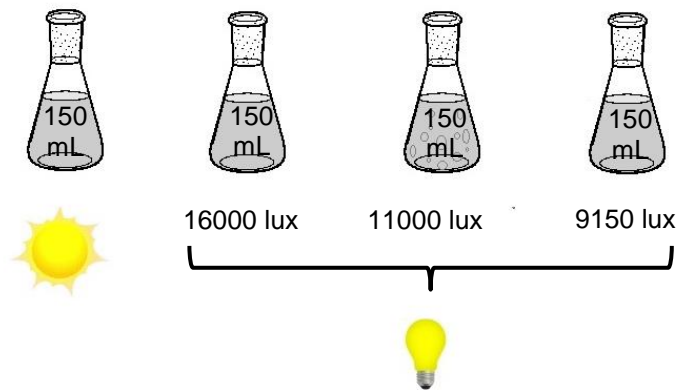


Figura 21 – Configuração do experimento: teste de remoção de nitrato e fosfato por microalgas oriundas de três culturas mães diferentes.

Fonte: Autoria própria.

A Figura 22 permite a visualização de como as culturas que eram iluminadas artificialmente ficavam dispostas dentro da caixa, sendo que os frascos maiores são as culturas mães mantidas com aeração e sem aeração, e os frascos menores são os três frascos contendo efluente sintético que eram mantidos sob luz artificial. Além disso, ressalta-se que o fundo da caixa era dividido em quadrantes, os quais possuíam diferentes intensidades luminosas, que foram medidas utilizando o medidor de intensidade de luz *Extech 401025*. A partir da Figura 23, pode-se observar como as culturas que eram mantidas sob luz natural (uma cultura mãe – frasco maior -, e uma cultura contendo efluente sintético) ficavam dispostas na janela do laboratório.



Figura 22 – Frascos de cultura mantidos sob luz artificial.
Fonte: Autoria própria.



Figura 23 – Frascos de cultura mantidos sob luz natural.
Fonte: Autoria própria.

4.6.1. Contagem de células e análise da morfologia celular

A contagem de células microalgal foi feita de forma manual utilizando o hemocitômetro *Reichert Bright Line 1492* da marca *Hausser Scientific* (Figura 24), que possui profundidade de 0,1mm. De acordo com a empresa *Hausser Scientific*, a área de contagem de células indicada na Figura 25 é de 1mm^2 e a contagem de células é dada pela Equação (1).

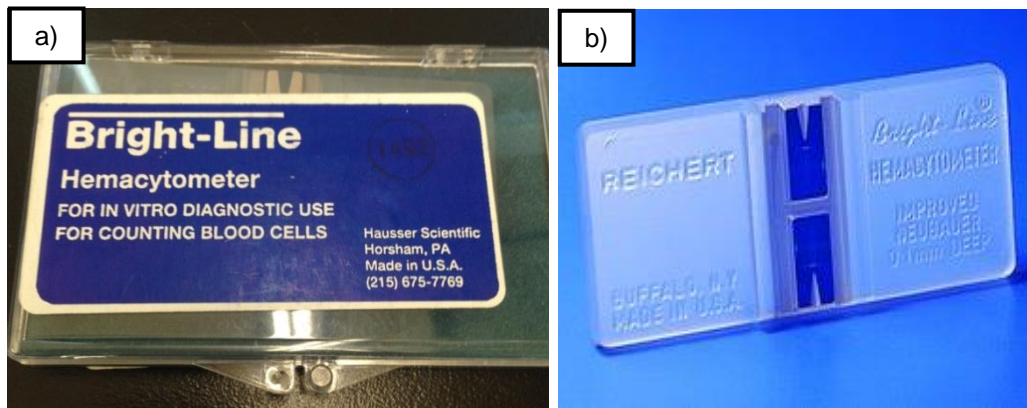


Figura 24 – Hemocitômetro *Reichert Bright Line 1492*: a) embalagem; b) placa para contagem de células.

Fonte: Autoria própria e Sigma-Aldrich (2014)

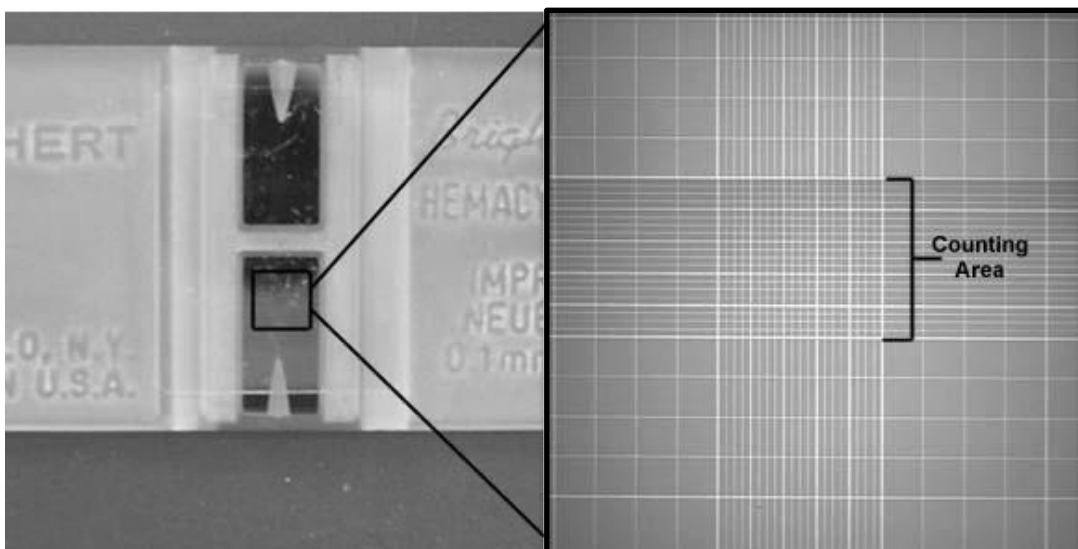


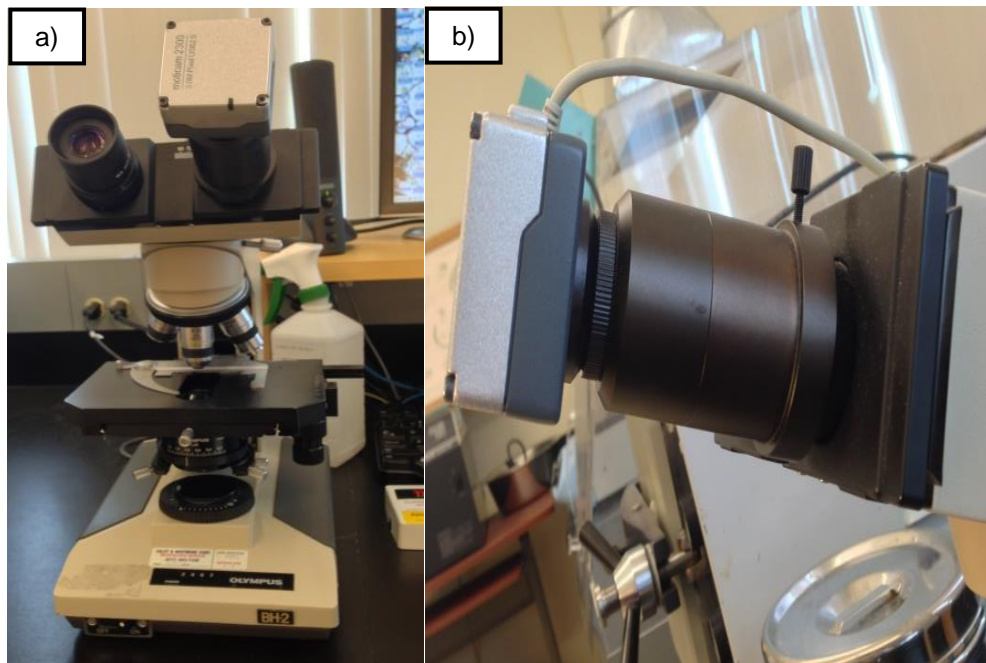
Figura 25 – Área de contagem de células no Hemocitômetro.

Fonte: Colorado State University (2014) e adaptado pela autora.

n° células/mililitros = n° de células contadas por mm^2 x diluição (se houver) x
x10000

Equação (1)

A placa de contagem de células foi colocada no microscópio *Olympus BH2* (Figura 26a), que possuía uma câmera (*Moticam 2300 3.0 Mpixel USB 2.0*) acoplada à sua lente direita (Figura 26b) e estava ligado ao computador. Sua imagem era acessada pelo software *Motic Image Plus 2.0*. A análise da morfologia celular era feita utilizando o mesmo microscópio e software, porém com lâmina e lamínula tradicionais. A alíquota de 5mL que era retirada dos frascos de cultura diariamente era centrifugada em uma centrífuga da marca *Cole-Parmer* e modelo EW-17250-10 (Figura 27), o líquido era separado para a realização das análises de remoção de nutrientes e a biomassa era analisada ao microscópio.



**Figura 26 – Microscópio Olympus BH2 com câmera acoplada: a) vista frontal; b) vista lateral da lente direita.
Fonte: Aatoria própria.**



Figura 27 – Centrifuga Cole-Parmer EW-17250-10 utilizada para concentração das amostras.
Fonte: Cole-Parmer (2014).

4.6.2. Concentrações de nitrato e fosfato

As concentrações de nitrogênio na forma de nitrato, e fosfato foram monitorados através de UV-VIS utilizando o espectrofotômetro HACH DR/4000 (Figura 28). Para mensurar as concentrações de nitrato, utilizou-se o método 8171 *Nitrate mid range Cadmium Reduction*, programa 2520 e o método 8192 *Nitrate low range Cadmium Reduction*, programa 2515. Para obter concentrações de fosfato, utilizou-se o método 8048 *Phosphorus, Reactive (Orthophosphate) PhosVer 3 (Ascorbic Acid)*, programa 3025. Todos estes métodos são originais do próprio espectrofotômetro HACH DR/4000.



Figura 28 – Espectrofotômetro HACH DR/4000.
Fonte: HACH (2014).

4.6.3. pH

O pH do meio de cultivo foi mensurado diariamente utilizando o pHmetro da marca *Denver Instrument UltraBasic Benchtop* (Figura 29) diretamente nos frascos de cultura.



**Figura 29 – pHmetro Denver Instrument UltraBasic Benchtop.
Fonte: Fisher Scientific (2014).**

4.7 PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Ao final de cada semana de teste, o conteúdo dos frascos de cultivo contendo microalgas era misturado e concentrado em tubos Falcon de 50 mL utilizando a centrífuga *Centrifug*TM da marca *Fisher Scientific* (Figura 30) por 10 min a 3000 rpm. Após isso, removia-se o sobrenadante e armazenava-se os tubos contendo microalgas (biomassa) na forma concentrada dentro da geladeira.

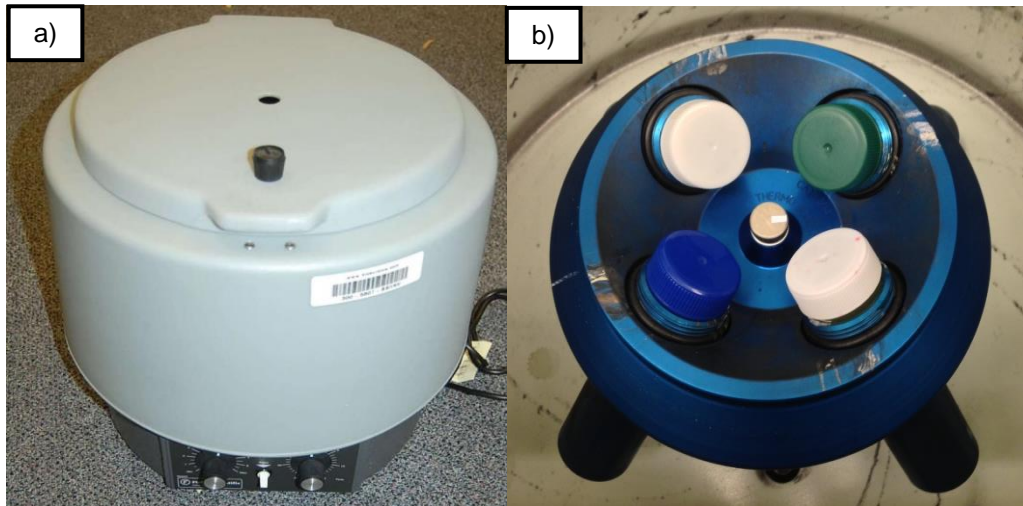


Figura 30 – Centrífuga Centrific™ da marca Fischer Scientific: a) frontal e b) interior.
Fonte: Biosurplus (2014) e autoria própria.

Ao final da quinta semana, obteve-se sete tubos de 50 mL com microalgas na forma concentrada, como pode-se observar na Figura 31a. Tais tubos foram centrifugados novamente por 10 min em potência máxima, objetivando retirar a maior quantidade de líquido possível. Obteve-se, por fim, o concentrado de microalgas mostrado na Figura 31b.

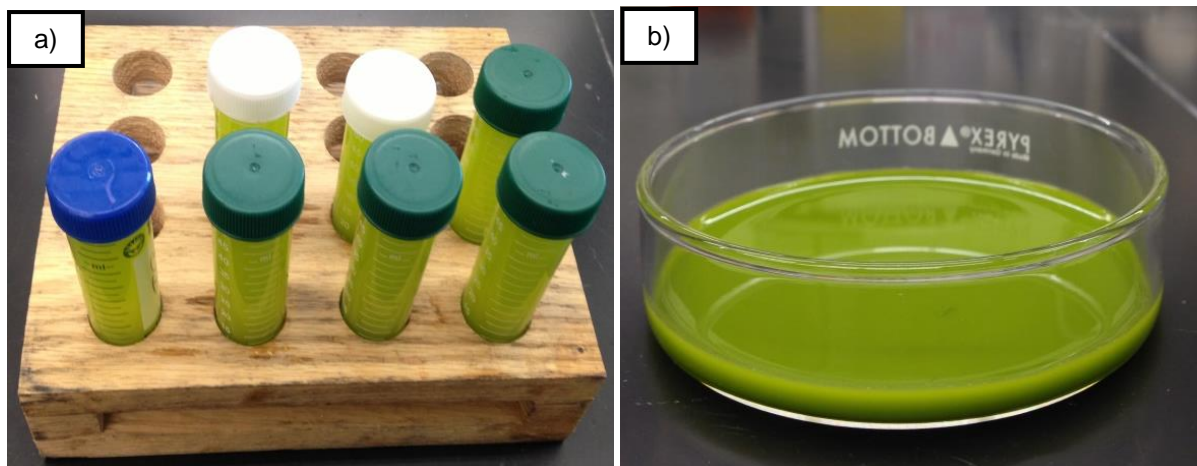


Figura 31 – *C. vulgaris* na forma concentrada: a) tubos de ensaio contendo as microalgas de cada ensaio; b) amostra obtida depois da centrifugação final.
Fonte: Autoria própria.

Pesou-se o concentrado da Figura 31b utilizando a balança analítica da marca *Mettler Toledo* (Figura 32a) para verificar a massa da biomassa líquida. Realizou-se a secagem da amostra utilizando uma estufa horizontal da marca *Shel Lab* (Figura 32b) durante 20 horas na temperatura de 70-80°C.

Após isso, verificou-se o peso da biomassa seca utilizando a balança analítica e iniciou-se os procedimentos de extração de lipídios. A biomassa seca foi retirada da placa de Petri utilizando uma espátula (Figura 33b), macerada como mostra a Figura 34a para que houvesse a disrupção das células e depois adicionou-se 21 mL do solvente químico Hexano 95% da marca *Sigma-Aldrich* (Figura 34b). Com a ruptura das células e adição do solvente, foi possível realizar a extração de lipídios. Tal processo foi realizado em um *shaker Innova 2100* (Figura 34c) por 12 horas a 155 rpm.

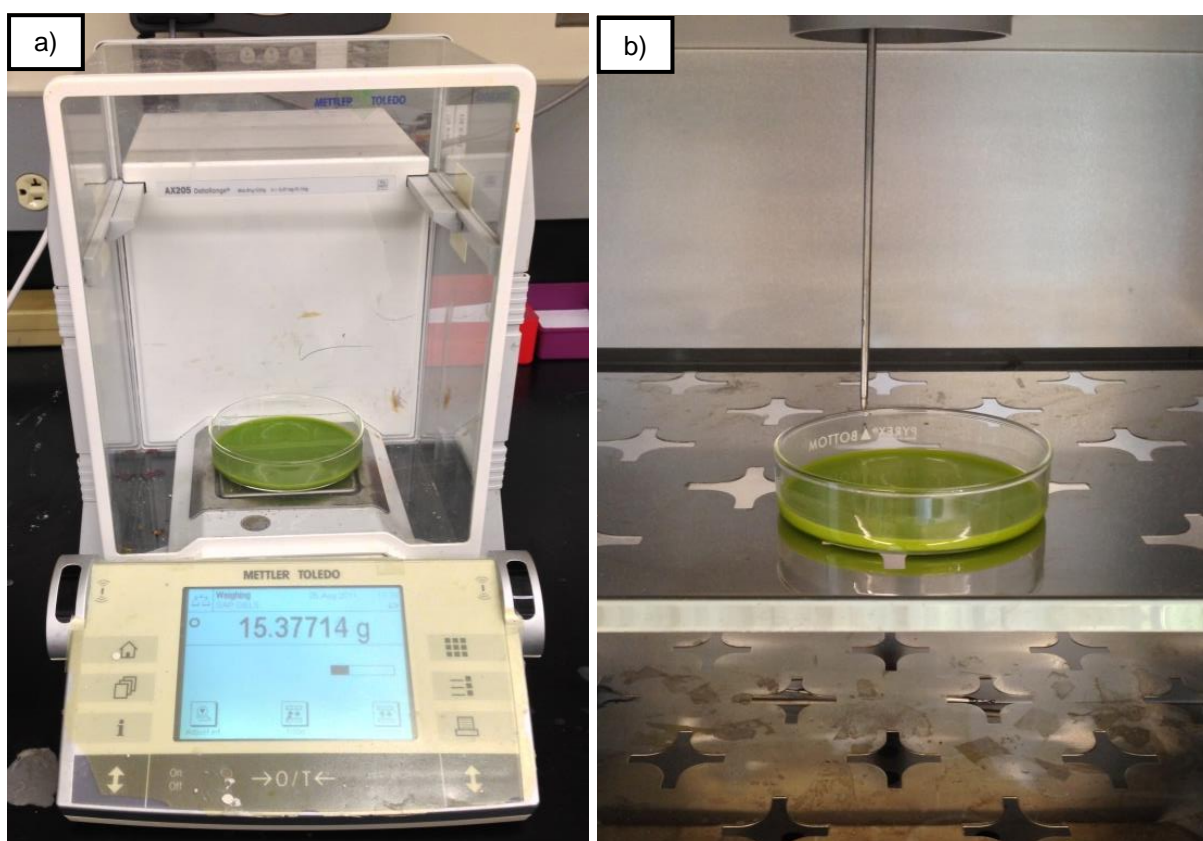


Figura 32 – *C. vulgaris* na forma concentrada: a) pesagem da amostra em balança analítica; b) processo de secagem da amostra em estufa.
Fonte: Autoria própria.

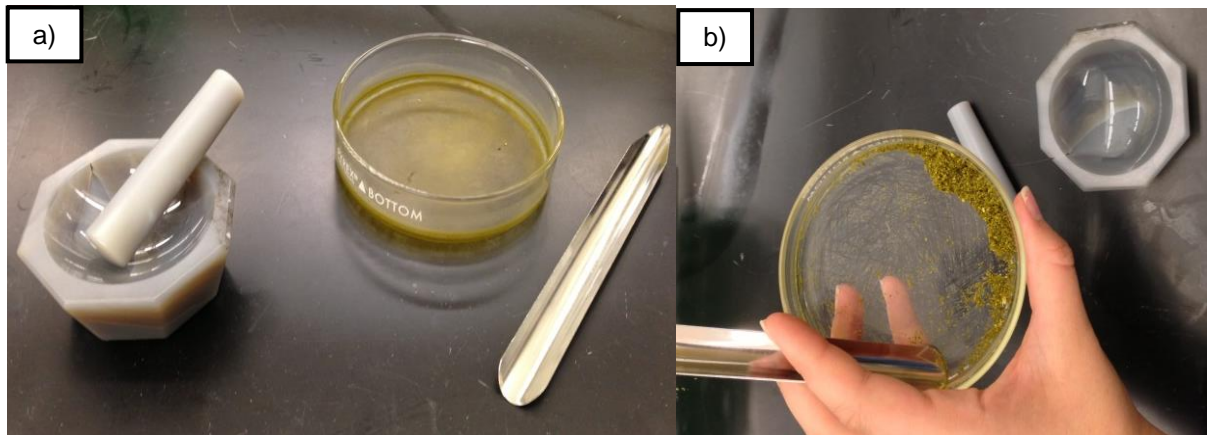


Figura 33 – a) Material utilizado na disruptão das células; e b) detalhe da biomassa seca presente na placa de Petri.
Fonte: Autoria própria.

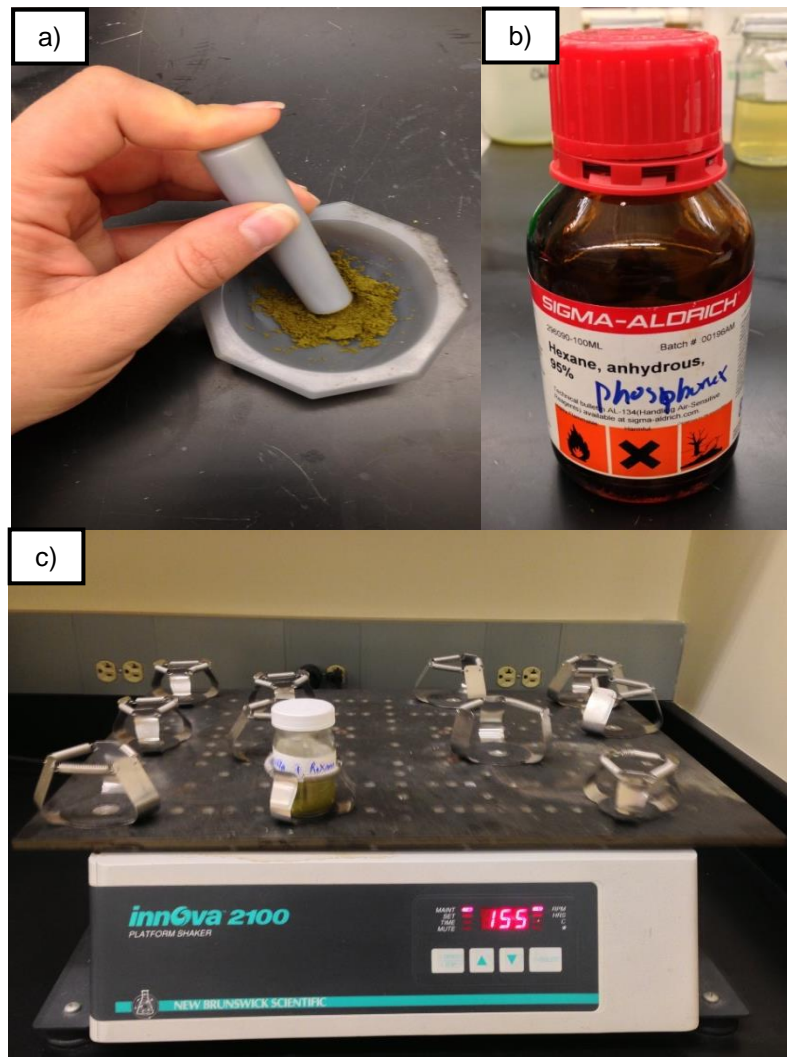


Figura 34 – a) Processo de maceração das células; b) Hexano 95% utilizado na extração dos lipídios; e c) Extração de lipídios utilizando um shaker a 155 rpm.
Fonte: Autoria própria.

Passadas as 12 horas, a amostra foi filtrada utilizando um filtro manual a vácuo (Figura 35a) e transferiu-se o filtrado para um pequeno becker, que foi deixado aberto dentro da capela (Figura 35b) por 24 horas para que o hexano evaporasse.

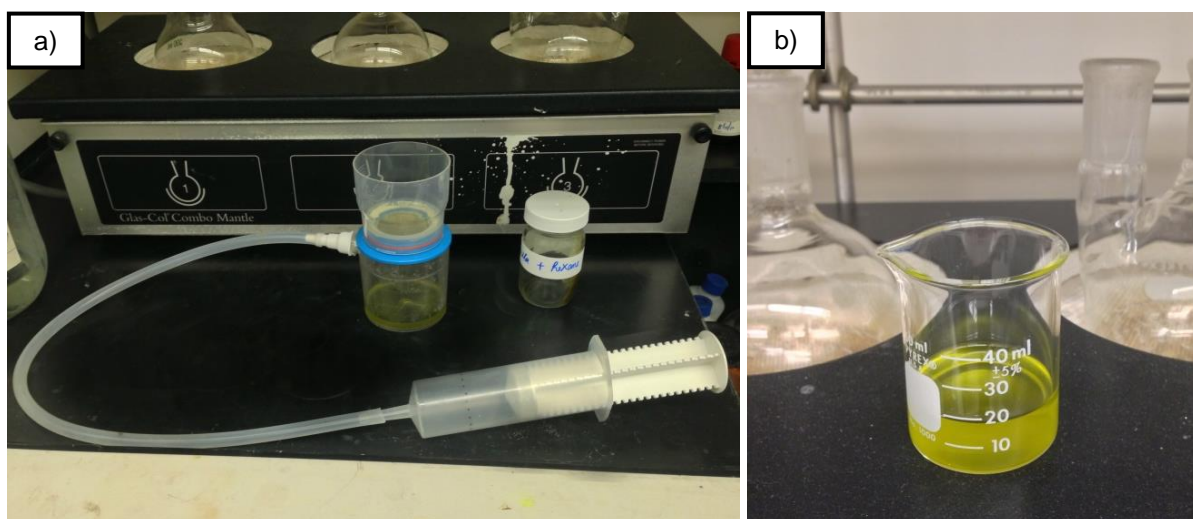


Figura 35 – a) Filtração da amostra à vácuo; e b) Evaporação do Hexano 95% dentro da capela por 24 horas.

Fonte: Autoria própria.

Com a evaporação do solvente, foi possível verificar a massa de lipídios extraída utilizando a balança analítica e calcular o Conteúdo Lipídico (%) utilizando a Equação (2), como descrito por Wrolstad et al. (2001, pg. 425).

$$\text{Conteúdo Lipídico (\%)} = \frac{\text{massa de lipídios extraída (g)}}{\text{peso da biomassa seca (g)}} \times 100$$

Equação (2)

Onde:

massa de lipídios extraída (g) = peso do becker com lipídios (g) – peso do becker vazio (g)

peso da biomassa seca (g) = peso da placa de Petri com a biomassa seca (g) – peso da placa de Petri vazia (g)

O processo de transesterificação dos lipídios em biodiesel foi feita utilizando 10 mL de metanol da marca *Fischer Scientific* (Figura 36a) e 0,124 g de hidróxido de sódio da marca *Carolina Biological Supply* (Figura 36b) como catalizador. A amostra foi então mantida dentro do *shaker Thermo Scientific MAXQ 4450* (Figura 36c) por 12 horas na temperatura de aproximadamente 35 °C e a 80 rpm.

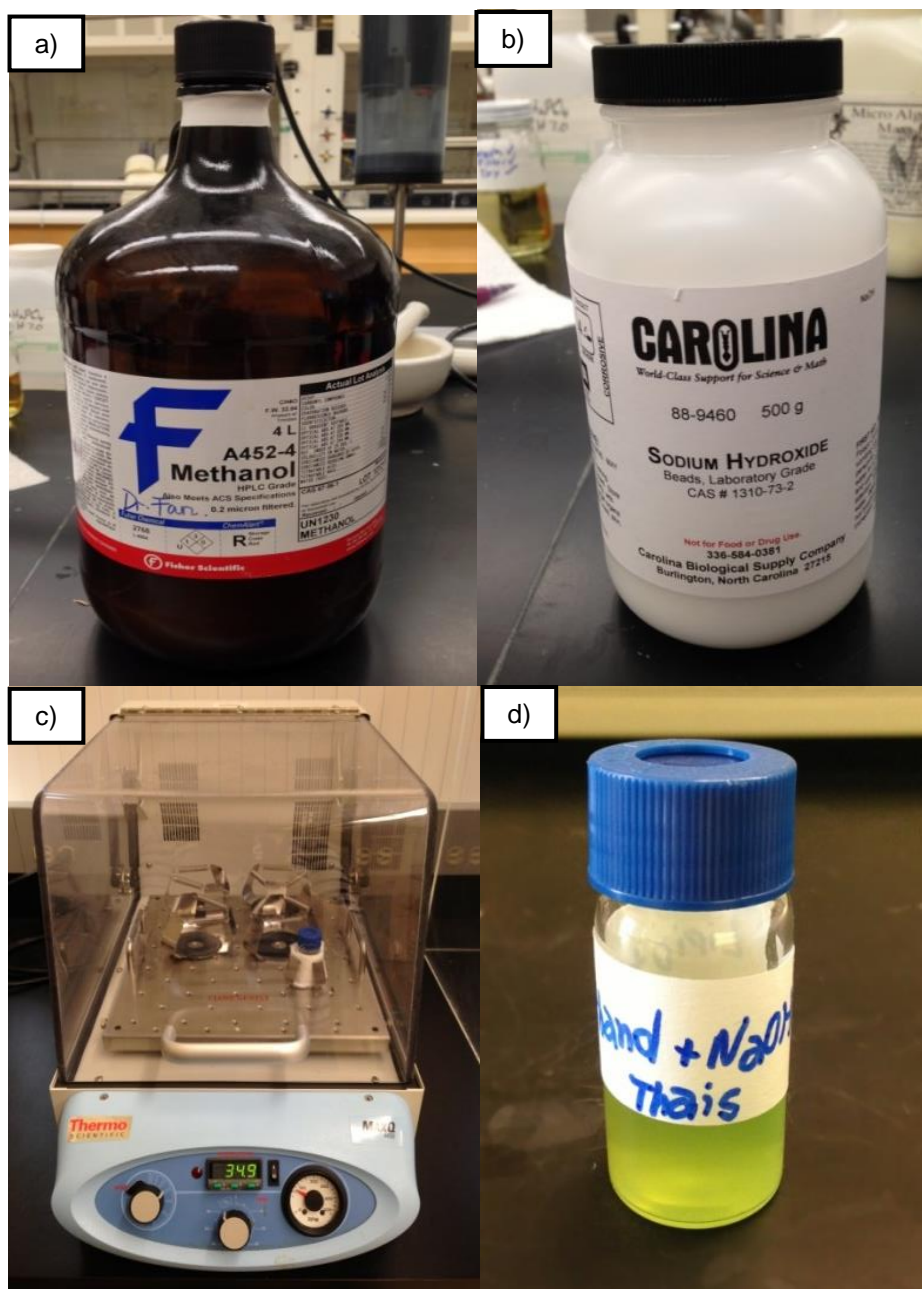


Figura 36 – Transesterificação dos lipídios: a) metanol utilizado como fonte de álcool; b) hidróxido de sódio utilizado como catalizador; c) amostra dentro shaker; e d) amostra obtida no final do processo.
Fonte: Autoria própria.

Após isso, o biodiesel obtido (Figura 36d) foi analisado em cromatografia gasosa utilizando o cromatógrafo da marca *Buck Scientific* Modelo 910 (Figura 37). Buscando comparar o cromatograma do biodiesel obtido neste estudo e os combustíveis tradicionais, também foi feito o cromatograma do diesel tradicional, adquirido em um posto de gasolina. Ambas as amostras foram analisadas no cromatógrafo injetando-se 1 μL , utilizando 240 °C como temperatura inicial e final, sem rampa e com tempo de retenção de 40 min.

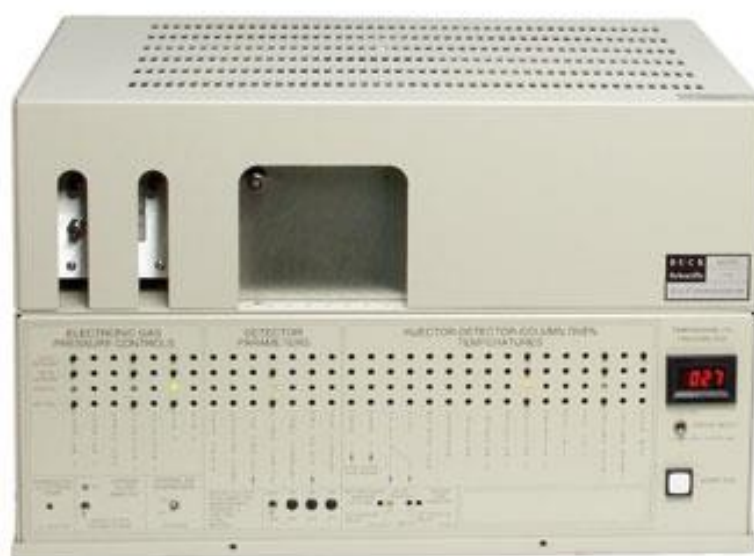


Figura 37 – Cromatógrafo gasoso Buck Scientific Modelo 910.
Fonte: Buck Scientific (2014).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MORFOLOGIA CELULAR

Em relação a morfologia das células de *C. vulgaris*, as análises ao microscópio não revelaram diferenças discrepantes entre as culturas crescidas em distintas condições. Pode-se perceber pequenas modificações, como, por exemplo, a forma de vida das células cultivadas sob 11000 lux (com aeração), que se encontram dispersas unicelularmente (Figura 38c), enquanto as outras culturas (luz natural, 16000 lux e 9500 lux, todas sem aeração) formaram algumas colônias (Figura 38a, 38b e 38d, respectivamente). Também é possível perceber que a condição de 11000 lux (com aeração) gerou células com formato mais definido.

Essas pequenas diferenças morfológicas podem ser explicadas pela aeração no frasco de cultivo sob 11000 lux. O fluxo de ar pode ter interferido no processo de formação de colônias, pois este adentrava o erlenmeyer em regime turbulento, entrando em contato com as células, impedindo-as de se agruparem em colônias. Além disso, a aeração promoveu a homogeneização dos nutrientes e auxiliou no processo de fotossíntese, fato que pode ter influenciado na formação de células mais definidas e aparentemente mais saudáveis. Outro fator importante foi que, com a aeração, as células não decantavam no erlenmeyer e não sofriam sombreamento por parte das células que estavam na superfície, fator que, caso ocorrido, teria interferido no processo de fotossíntese.

Não foi observada diferença morfológica quando comparou-se as amostras cultivadas semanalmente em luz natural, 16000 lux, 11000 lux (com aeração) e 9500 lux em relação às suas células mãe (se eram C1, C2 ou C3). O tamanho das células variou de 4 a 7,9 μm , valores que condizem com os dados encontrados na literatura.

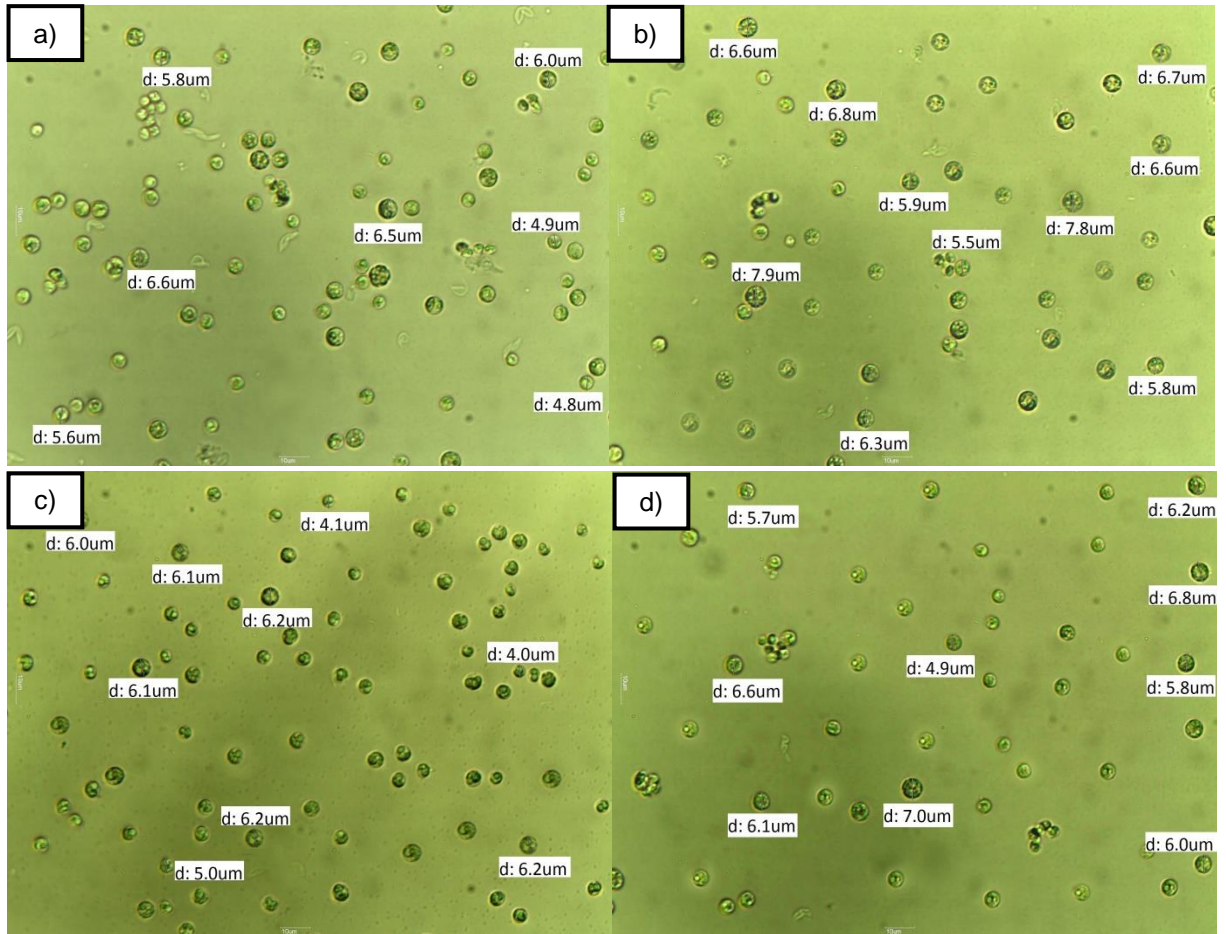


Figura 38 – a) *C. vulgaris* cultivada sob luz natural, aumento de 400x; b) *C. vulgaris* cultivada sob 16000 lux, aumento de 400x; c) *C. vulgaris* cultivada sob 11000 lux, com aeração, aumento de 400x; d) *C. vulgaris* cultivada sob 9500 lux, aumento de 400x.
Fonte: Autoria própria.

5.2 TEMPERATURA E INTENSIDADE LUMINOSA

A Tabela 6 mostra as temperaturas médias diárias do ar externo na cidade de Fall River durante as cinco semanas de experimento. Pode-se perceber que embora fosse verão no Hemisfério Norte durante a realização do experimento, as temperaturas externas não eram tão quentes e extremas quanto o verão no Brasil, por exemplo. As amplitudes térmicas da primeira à quinta semana de coleta de dados foram de 7,2 °C, 9,9 °C, 5,8 °C, 5,8 °C e 4,8 °C, respectivamente. A primeira semana apresentou as temperaturas mais quentes, chegando a um máximo de 28,6 °C.

Tabela 6 – Temperaturas médias diárias do ar externo durante as cinco semanas de experimento.

Semana	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
	T (°C)	T (°C)	T (°C)	T (°C)	T (°C)	T (°C)	T (°C)
1 (C2)	21,4	28,6	28,2	26,8	27,8	27,7	24,4
2 (C3)	27,7	24,4	24,8	25,4	20,6	17,8	23,7
3 (C1)	23,7	23,5	22,8	24,0	25,4	19,6	19,9
4 (C2)	25,4	19,6	19,9	20,3	22,1	22,8	22,2
5 (C2)	22,2	20,4	20,2	19,4	20,9	21,9	24,2

Fonte: Adaptado pela autora a partir de Accuweather (2013).

A partir da Tabela 7, verifica-se as temperaturas médias diárias dentro do fotobiorreator durante as cinco semanas de experimento. Pode-se perceber que as amplitudes térmicas dentro do fotobiorreator são menores do que a do ar externo. Da primeira à quinta semana, tem-se as seguintes amplitudes térmicas: 1,2 °C, 1 °C, 0,9 °C, 0,6 °C e 2 °C. As amplitudes térmicas durante o período de execução do experimento foram menores dentro do fotobiorreator do que no ar externo devido ao local no qual o fotobiorreator estava localizado. Este estava dentro do laboratório de Química Ambiental, que possuía ar condicionado ligado 24 horas em temperatura de 20 °C, portanto as culturas dispostas dentro do fotobiorreator não sofreram influência das condições do ambiente externo.

Tabela 7 – Temperaturas médias diárias dentro do fotobiorreator durante as cinco semanas de experimento.

Semana	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
	T (°C)	T (°C)	T (°C)	T (°C)	T (°C)	T (°C)	T (°C)
1 (C2)	24,3	25,1	24,4	24,2	24,1	23,9	24,5
2 (C3)	23,9	24,5	24,5	23,6	23,6	23,5	23,7
3 (C1)	23,7	24,2	24,1	24,6	24,3	24,5	24,5
4 (C2)	24,3	24,5	24,5	24,5	23,9	25,1	25,2
5 (C2)	25,2	23,4	24,9	24,8	24,7	25,4	24,5

Fonte: Autoria própria.

Os dados da Tabela 8 indicam as intensidades de radiação solar máxima diárias durante as cinco semanas do experimento. Tais dados foram mensurados às 13h:00 de cada dia, visto que esse era o horário com maior incidência de radiação solar. O equipamento mostrado na Figura 14i era levado para o lado de fora do laboratório e posicionado do lado de fora da janela de vidro na qual as amostras

cultivadas sob “luz natural” eram colocadas. É importante ressaltar que a intensidade de luz que chegava até as microalgas que estavam sendo cultivadas sob luz natural era um pouco menor do que a mensurada pelo instrumento, devido a processos de reflexão e difração da luz quando esta incidia no vidro da janela.

Tabela 8 – Intensidade máxima de radiação solar incidente na amostra cultivada sob “luz natural”.

Semana	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
	Int. (lux)	Int. (lux)	Int. (lux)	Int. (lux)	int. (lux)	int. (lux)	int. (lux)
1 (C2)	25000	65000	56000	55500	43000	43500	21500
2 (C3)	43500	21500	22000	26000	3200	9900	25500
3 (C1)	25500	34000	60000	63000	66000	25000	19500
4 (C2)	66000	25000	19500	48000	18000	17000	56000
5 (C2)	56000	3000	3000	57000	62000	46000	48000

Fonte: Autoria própria.

Comparando os dados de temperatura do ar externo e intensidade de radiação, percebe-se que os dias com elevadas temperaturas coincidem com os de elevada intensidade de luz, como é o caso do segundo dia da primeira semana (28,6 °C e 65000 lux), e do terceiro dia da primeira semana (28,2 °C e 56000). Este dia possuiu uma intensidade de luz menor, embora a temperatura tenha sido bem similar à do dia anterior, porque havia mais nuvens no céu. O menor valor de temperatura média externa obtido também coincide com um dos menores valores de intensidade de luz mensurado, ambos no sexto dia de cultivo da segunda semana de experimento (17,8 °C e 9900 lux), que estava bastante nublado.

De acordo com Lavens e Sorgeloos (1996), as condições ideais de crescimento para as microalgas em relação à temperatura estariam na faixa de 18 à 24 °C, podendo haver crescimento até 30 °C. Em relação à luminosidade, a faixa ótima seria de 2500 à 5000 lux. Sendo assim, observa-se que as temperaturas do ar externo e dentro do fotobiorreator nem sempre estavam de acordo com a faixa ideal. As temperaturas do ar externo (Tabela 6) durante a primeira e segunda semanas foram, em geral, maiores do que máxima da faixa ótima (com temperaturas chegando a 28,6 °C, 28,2 °C e 27,7 °C, por exemplo). Convém ressaltar que, no sexto dia da segunda semana, houve temperatura menor do que a mínima sugerida pela faixa ótima. A terceira, quarta e quinta semanas apresentaram temperaturas do

ar externo mais favoráveis, possuindo apenas um dia com temperatura superior à máxima da faixa ideal.

Já os valores de temperatura dentro do fotobiorreator (Tabela 7) não excederam de forma significativa a temperatura da faixa ideal, visto que a maior temperatura registrada dentro do fotobiorreator (25,4 °C) foi apenas 1,4 °C acima da máxima da faixa ótima.

Em relação aos valores de intensidade de luz, nas amostras mantidas dentro do fotobiorreator estes eram de 16000 lux, 11000 lux e 9500 lux. Ou seja, durante todas as semanas do experimento esses dados eram mantidos constantes e eram superiores aos valores ideais. Inclusive, as medições feitas para dividir o fundo do fotobiorreator em quadrantes e indicar suas respectivas intensidades de luz (Figura 39) indicaram que até mesmo nas laterais e na frente, que eram regiões de menor intensidade (aproximadamente 7000 lux), os valores de radiação já eram superiores aos da faixa ótima.



Figura 39 – Fundo do fotobiorreator dividido em quadrantes com os valores de intensidade de luz.

Fonte: Autoria própria.

A intensidade de luz poderia provavelmente ser menor e, portanto, mais favorável ao crescimento microalgal, se fossem utilizadas apenas duas lâmpadas ao invés de três e/ou se o fotobiorreator fosse maior, assim existiriam locais mais distantes das lâmpadas disponíveis para dispor as amostras.

Os valores de intensidade de luz externa (Tabela 8), que interferiram diretamente no crescimento microalgal da cultura mantida sob “luz natural”, também foram, em geral, superiores ao recomendado como faixa ótima. Durante a primeira, terceira e quarta semana, todos os valores de intensidade de luz excederam os dados pela faixa ótima. Na segunda semana, apenas o quinto dia teve intensidade dentro dos limites ideais, sendo este valor 3200 lux. Já na quinta semana, o segundo e terceiro dia tiveram intensidade de 3000 lux.

Sendo assim, em dias com temperatura e intensidade de luz superiores ao ideal, as condições ambientais também deixam de ser ideais e o metabolismo das microalgas precisa encontrar formas de se adequar. No caso de intensidades luminosas muito elevadas, estas favorecem o crescimento de biomassa até certo ponto, pois, após certo tempo, pode haver auto-sombreamento pelas células já existentes no meio de cultura, diminuindo a disponibilidade de luz por célula e diminuindo a produtividade da biomassa – fenômeno chamado também de fotoinibição. Além disso, o excesso de luz e a presença de células fazendo sombreamento poderia favorecer outras células amenizando a intensidade de luz que chega até as mesmas.

As microalgas podem sobreviver em uma ampla faixa térmica, mas só irá haver síntese orgânica na faixa ótima de crescimento. De acordo com Laing (1991), em elevadas temperaturas, como, por exemplo, acima de 27 °C, diversas microalgas diminuem sua taxa fotossintética, perdendo seu valor nutricional e podendo ocorrer elevada mortalidade. Ratkowsky et al. (1983) afirmam que próximo à temperatura ótima há uma aceleração na taxa de crescimento microalgal, no entanto, em temperaturas muito elevadas, pode haver desnaturação ou desativação de proteínas por parte das células, causando o efeito inverso.

No caso de *C. vulgaris*, a literatura afirma que essa espécie pode apresentar crescimento de sua biomassa até a temperatura de 30 °C, embora este valor não seja considerado o ideal. Portanto, com as temperaturas externas registradas durante o estudo, provavelmente não houve elevada morte celular das células mantidas sob luz natural, e sim, no máximo, uma diminuição da atividade

fotossintética como forma de adequação às condições ambientes por parte das microalgas.

5.3 REMOÇÃO DE NITRATO

As porcentagens de remoção de nitrato ao longo do experimento seguem apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Porcentagem de remoção de Nitrato presente no efluente sintético.

Semana	NO ₃ ⁻ inicial (mg/L)	Luz Natural	16000 lux	11000 lux (aeração)	9500 lux
1 (C2)	130	38,46%	30,78%	46,15%	23,08%
2 (C3)	60	8,33%	33,33%	50%	33,33%
3 (C1)	40	0%	25%	25%	12,5%
4 (C2)	4	87,5%	87,5%	87,5%	87,5%
5 (C2)	7,5	86,67%	86,67%	96,67%	86,67%

Fonte: Autoria própria.

Ao analisar os dados, nota-se que a maior remoção de nitrato foi de 96,67% pela cultura deixada a 11000 lux com aeração, na quinta semana. Convém lembrar que a quinta semana obteve alguns dos valores de temperatura mais elevados do experimento dentro do fotobiorreator (Tabela 7), alcançando, inclusive, o mais elevado de todos, no seu sexto dia (25,4 °C). A combinação de temperaturas levemente maiores do que a faixa ideal, a intensidade de radiação de 11000 lux, que dentre as utilizadas neste estudo foi a que mais se aproximava dos valores utilizados com sucesso na literatura (13000 lux no estudo de Kotzabasis et al., 1999), e a aeração foram certamente fatores que, em conjunto, contribuíram para a eficiência na remoção de nitrato na quinta semana.

Embora a maior remoção em porcentagem tenha ocorrido na quinta semana, convém observar que na primeira semana houve remoção ainda mais significativa em termos de quantidade, visto que as porcentagens de remoção foram de 23,08% a 46,15%, mas a concentração inicial de nitrato era muito maior do que na quinta

semana (130 mg/L na primeira semana versus 7,5 mg/L na quinta semana). Sendo assim, a cultura mantida sob 11000 lux na quinta semana removeu 7,2 mg/L, enquanto a cultura mantida sob 11000 lux na primeira semana, por exemplo, removeu aproximadamente 60 mg/L.

De acordo com Shaw et al. (2004), quantidades de nitrogênio que excedam 0,3 mg/L em corpos de água já são suficientes para acarretar em proliferação de algas. Ou seja, as quantidades iniciais presentes no efluente tratado na primeira, segunda e terceira semana eram muito elevadas, o que pode ter interferido no processo de assimilação. Apesar disso, a cultura inoculada com células mãe C3 e mantida sob 11000 lux com aeração chegou a 50% de remoção quando o efluente utilizado tinha a concentração de 60 mg/L.

Observa-se na Tabela 9 que na quarta semana do experimento todas as amostras (luz natural sem aeração, 16000 lux sem aeração, 11000 lux com aeração e 9500 lux sem aeração) obtiveram a mesma porcentagem de remoção de nitrato (87,5%).

A terceira semana de teste (concentração inicial de 40mg/L, como foi citado na Tabela 5) obteve as menores porcentagens de remoção de nitrato, sendo que a cultura que foi mantida sob luz natural não obteve nenhuma remoção. Atribui-se essa falta de remoção às elevadas intensidades de luz solar ao longo daquela semana (Tabela 8), chegando a até 66000 lux, o que foi muito além da intensidade de luz ótima requerida pelas microalgas. Na mesma semana, as amostras cultivadas com 16000 lux sem aeração, 11000 lux com aeração e 9500 lux sem aeração obtiveram 25, 25 e 12,5%, respectivamente, como pode ser observado na Tabela 9.

Sendo assim, pode-se afirmar que na terceira semana as condições em que as algas foram cultivadas não foram adequadas para seu crescimento, pois o inóculo utilizado para os experimentos desta semana continha células “estressadas” e que não foram eficientes na remoção do nitrato presente no meio.

Convém observar que, as semanas que obtiveram as maiores porcentagens de remoção foram a primeira, quarta e quinta, sendo que a maior remoção em termos de quantidade foi obtida na primeira semana. As culturas de todas essas semanas foram inoculadas com o mesmo tipo de cultura mãe (C2), que continha sempre células novas no momento da inoculação. Ou seja, a cultura mãe C2 foi a que gerou células mais eficientes na remoção de nitrato, para todas as quatro

condições de cultivo (luz natural sem aeração, 16000 lux sem aeração, 11000 lux com aeração e 9500 lux sem aeração), como pode ser observado na Tabela 9.

A segunda e a terceira semana foram cultivadas com células mãe C3 e C1, respectivamente, que tinham sido preparadas desde a primeira semana do experimento. Ou seja, as células estavam menos saudáveis do que as células oriundas da cultura mãe C2 quando foram utilizadas no teste de remoção, fato que também pode explicar as menores remoções obtidas nestas semanas.

A partir das Figuras 40, 41, 42 e 43, pode-se observar a remoção de nitrato ao longo das cinco semanas de experimento, identificando os dados diários em forma de curvas de concentração de nitrato em mg/L para as quatro condições de teste.

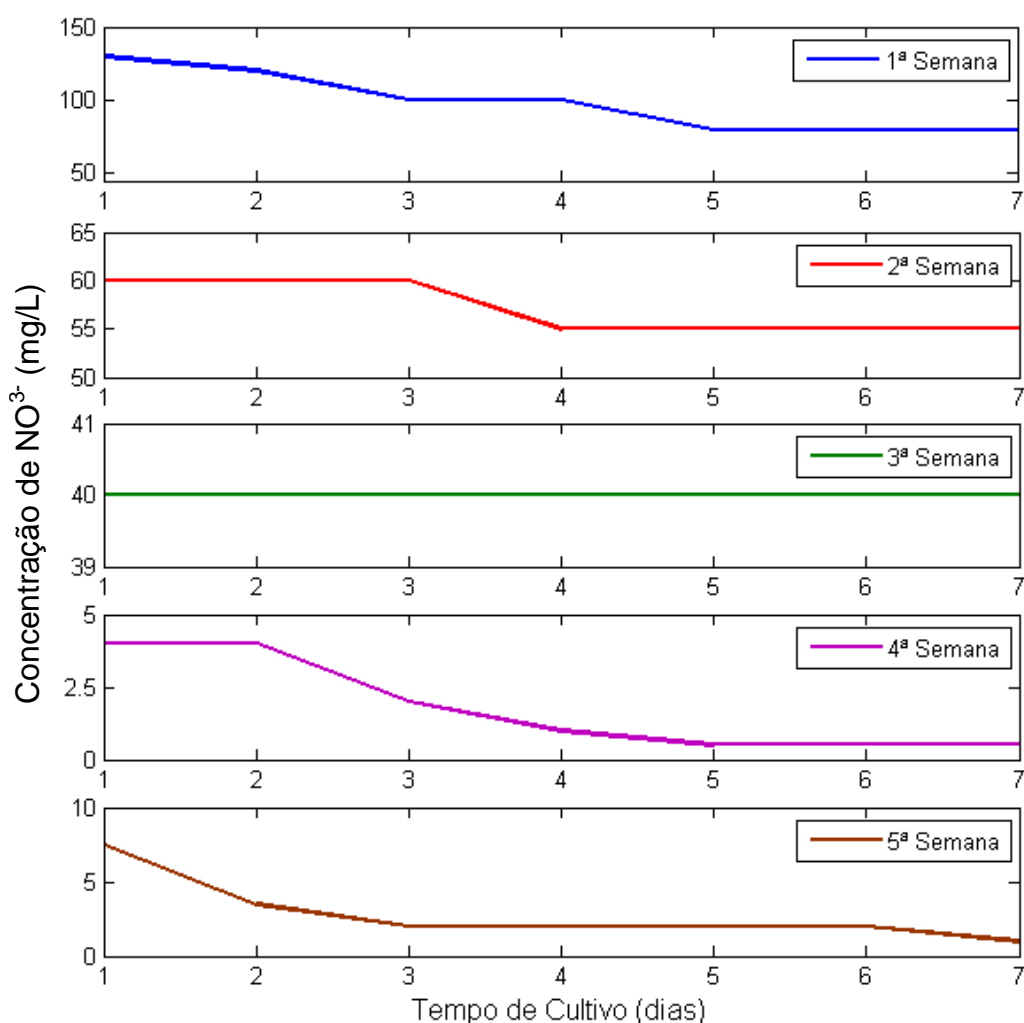


Figura 40 – Remoção de nitrato durante as cinco semanas de experimento, em amostra cultivada sob luz natural.

Fonte: Autoria própria.

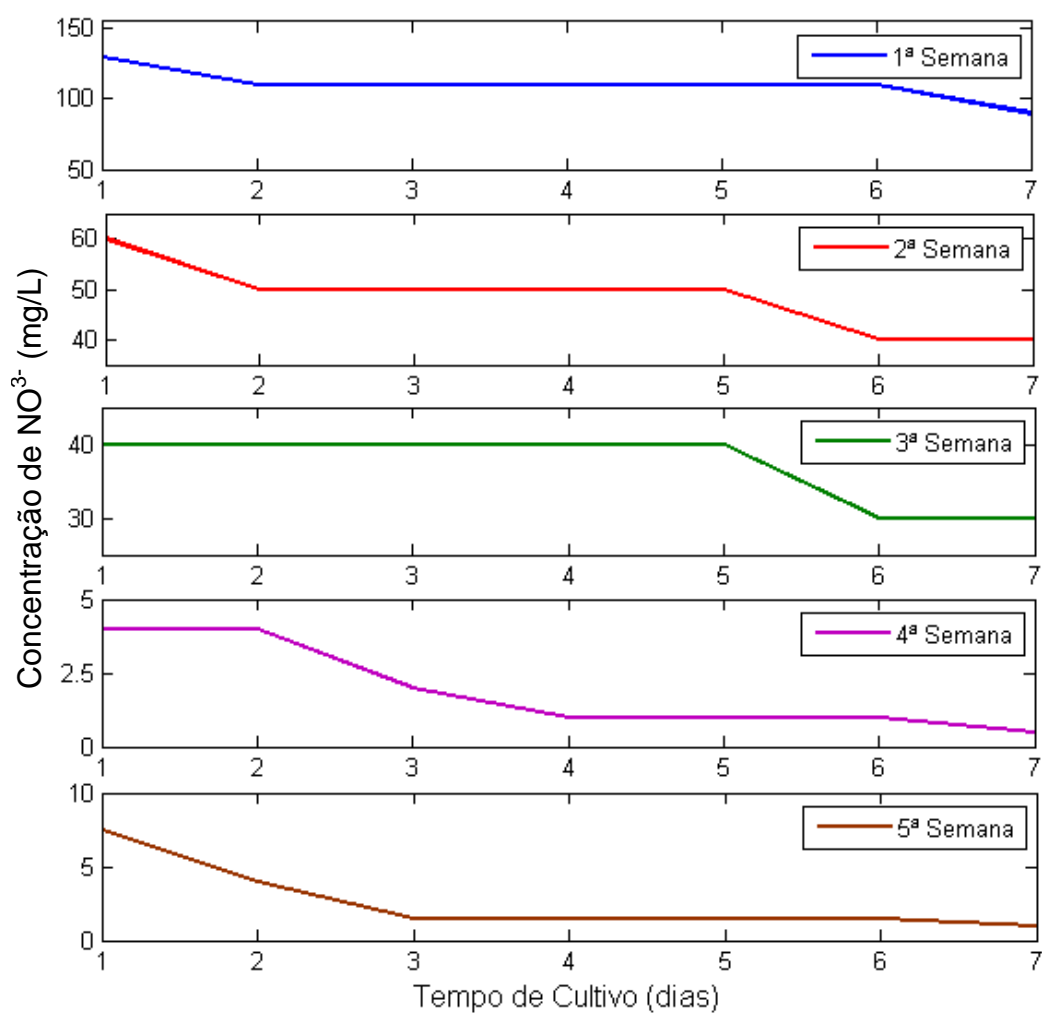


Figura 41 – Remoção de nitrato durante as cinco semanas de experimento, em amostra cultivada sob 16000 lux.
Fonte: A autoria própria.

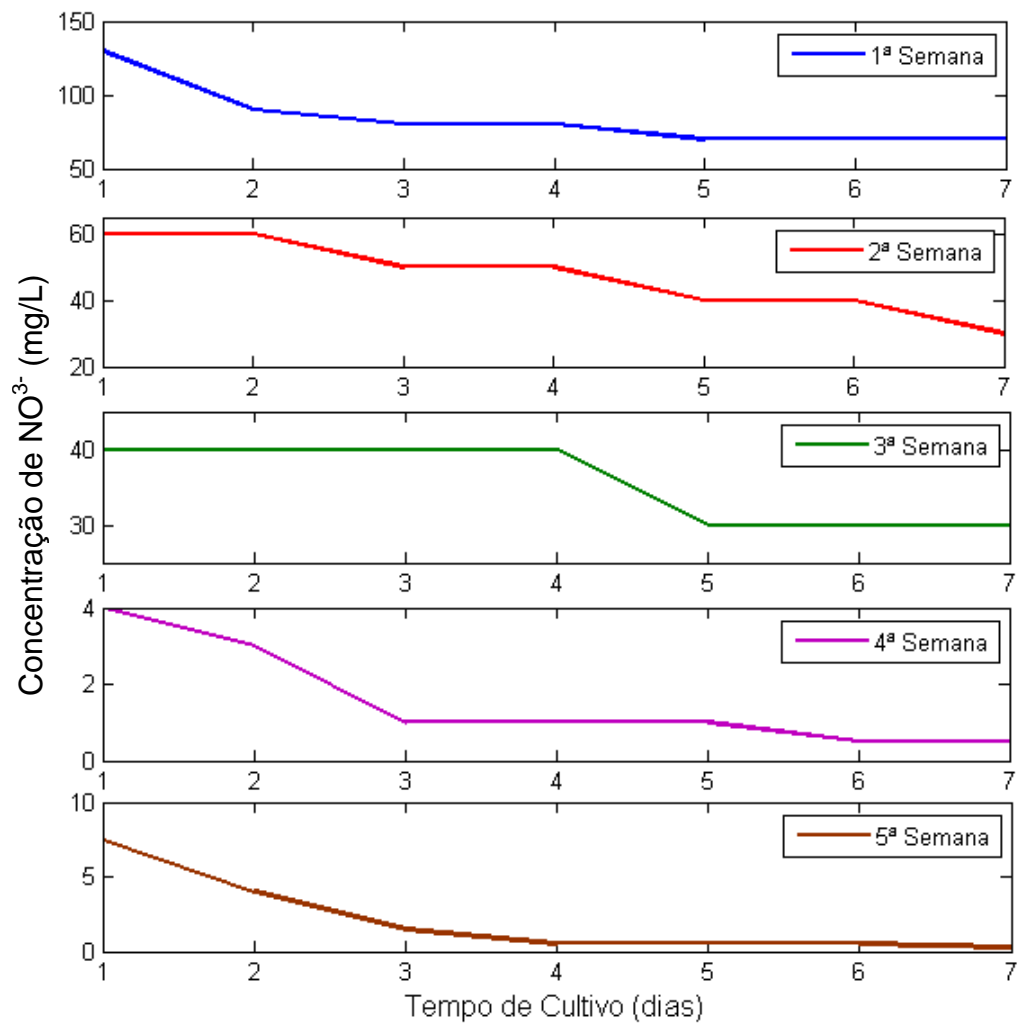
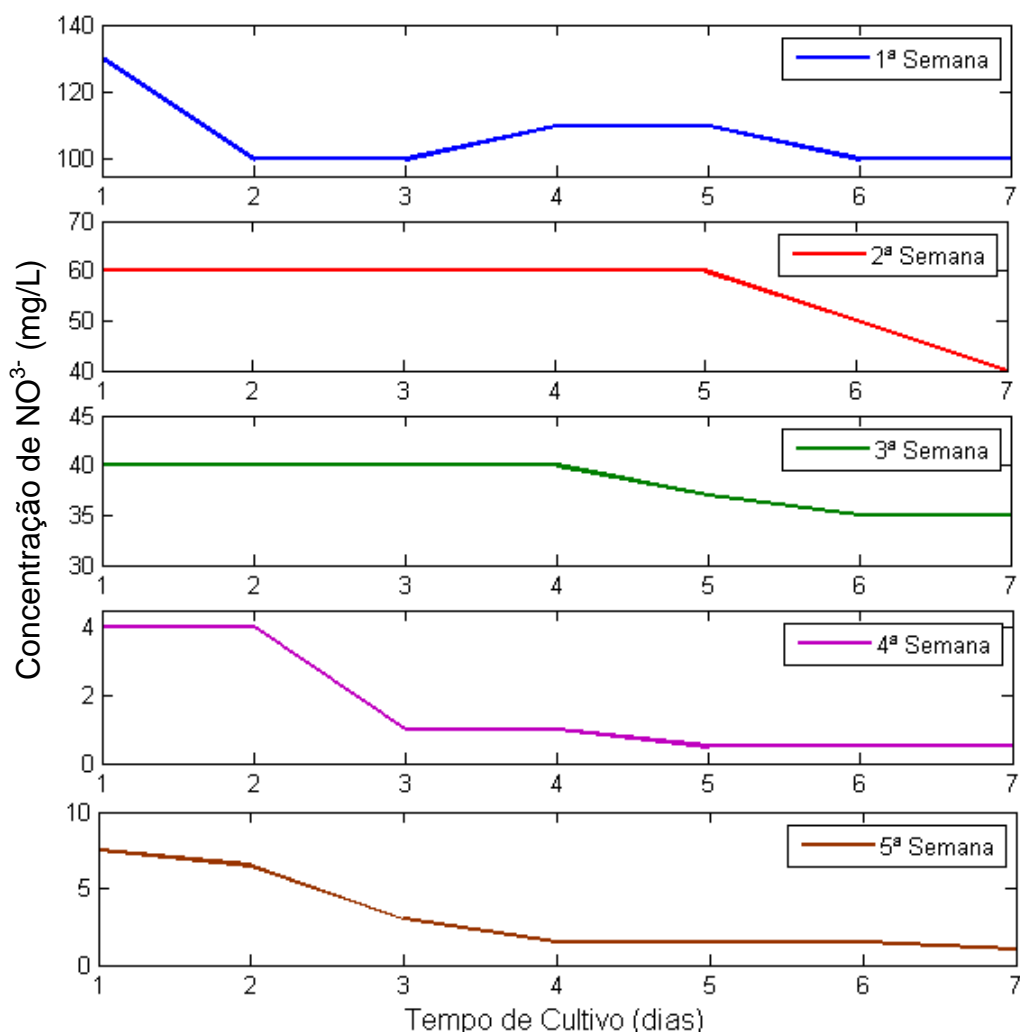


Figura 42 – Remoção de nitrato durante as cinco semanas de experimento, em amostra cultivada sob 11000 lux, com aeração.

Fonte: Autoria própria.



**Figura 43 – Remoção de nitrato durante as cinco semanas de experimento, em amostra cultivada sob 9500 lux.
Fonte: Autoria própria.**

Analisando os dados pode-se dizer que a quinta semana de experimento, na qual a concentração inicial de nitrato era de 7,5 mg/L (Tabela 9), possui um decaimento de nitrato aparentemente mais gradual e sem reduções bruscas de um dia para o outro, se comparada com os testes realizados nas outras semanas, para todas as quatro condições de cultivo (Figuras 40, 41, 42 e 43). Também pode-se observar que nas quatro culturas da quinta semana (luz natural sem aeração, 16000 lux sem aeração, 11000 lux com aeração e 9500 lux sem aeração), a concentração de nitrato ficou praticamente estável após o terceiro dia de cultivo (Figuras 40, 41, 42 e 43), ou seja, a redução substancial de nitrato ocorreu nos primeiros três dias de experimento daquela semana. Esta redução substancial nos três primeiros dias da

quinta semana, no caso da amostra deixada sob luz natural (Figura 40), pode ser explicada pela intensidade de luz menor e dentro da faixa ótima no segundo e terceiro dia (3000 lux), além das temperaturas também dentro da faixa ótima (22,2, 20,4 e 20,2 °C).

Na quarta semana de experimento, a queda da concentração de nitrato foi mais relevante do segundo para o terceiro dia de cultivo, também para todas as amostras (Figuras 40, 41, 42 e 43). No caso das amostras cultivadas dentro do fotobiorreator, observa-se que no segundo e terceiro dia da quarta semana o valor de temperatura obtido foi o mais elevado daquela semana (24,5 °C nos dois dias). A intensidade da radiação solar nestes dias foi menor do que a do primeiro dia de cultivo, embora estes não tenham sido os menores daquela semana (25000 e 19500 lux, no primeiro e segundo dia, respectivamente, enquanto no primeiro dia foi de 66000 lux). Já as temperaturas externas no segundo e terceiro dia da quarta semana foram as mais baixas daquela semana, 19,6 e 19,9 °C, respectivamente.

Durante a terceira semana, pode-se perceber que as culturas mantidas sob 16000 lux sem aeração (Figura 41), 11000 lux com aeração (Figura 42) e 9500 lux sem aeração (Figura 43) obtiveram remoção de nitrato somente após o quarto dia de cultivo, provavelmente porque as culturas mantidas nesta semana foram cultivadas com células mãe (C1) já debilitadas.

5.4 REMOÇÃO DE FOSFATO

Observa-se na Tabela 10 as porcentagens de remoção de fosfato ao longo do experimento.

Tabela 10 – Porcentagem de remoção de Fosfato presente no efluente sintético.

Semana	PO ₄ ³⁻ inicial (mg/L)	Luz Natural	16000 lux	11000 lux (aeração)	9500 lux
1 (C2)	32,1	29,60%	28,35%	68,22%	33,64%
2 (C3)	15	1,33%	23,33%	30%	9,33%
3 (C1)	10,8	6,48%	12,04%	5,55%	2,78%
4 (C2)	1,02	72,55%	92,15%	95,10%	49,02%
5 (C2)	2,3	82,61%	78,26%	81,30%	56,52%

Fonte: Aatoria própria.

Ao analisar os dados, pode-se concluir que a maior remoção de fosfato foi de 95,10% pela cultura deixada a 11000 lux com aeração, na quarta semana (Tabela 10). Comparando esses valores com os da Tabela 7, ressalta-se que a quarta semana de experimento obteve o segundo e terceiro valor mais elevado de temperatura dentro do fotobiorreator, no sexto e sétimo dia de cultivo (25,1 e 25,2 °C, respectivamente), e durante os outros dias as temperaturas ficaram bem próximas da máxima de 24 °C dada pela faixa ideal. A combinação destes valores de temperatura, a intensidade de radiação de 11000 lux, que dentre as utilizadas neste estudo foi a que mais se aproximava dos valores utilizados com sucesso na literatura, e a aeração foram provavelmente fatores que, em conjunto, contribuíram para a eficiência na remoção de fosfato na quarta semana.

Embora a maior remoção em porcentagem tenha ocorrido na quarta semana, convém observar que na primeira semana houve remoção ainda mais significativa em termos de quantidade, visto que as porcentagens de remoção foram de 28,35% a 68,22%, mas a concentração inicial de fosfato era muito maior do que na quarta semana (32,1 mg/L na primeira semana versus 1,02 mg/L na quarta semana). Sendo assim, a cultura mantida sob 11000 lux na quarta semana removeu 0,97 mg/L, enquanto a cultura mantida sob 11000 lux na primeira semana, por exemplo, removeu aproximadamente 22 mg/L.

Shaw et al. (2004) afirma que concentrações de fósforo total de 100 µg/L já caracterizam um corpo de água como estando bastante debilitado e com alta carga de nutrientes, o que faria com que culturas algais ploriferassem no efluente. No presente estudo, da primeira à terceira semana, essas concentrações foram muito excedentes, e apenas as microalgas cultivadas sob as condições mais próximas das

ideais conseguiram assimilar tamanha carga de fosfato (como foi o caso da cultura mantida sob 11000 lux com aeração na primeira semana, que removeu 68,22%).

Nesse sentido, provavelmente os cultivos realizados durante a segunda e terceira semana obtiveram as menores porcentagens de remoção de fosfato (Tabela 10) devido as elevadas concentrações iniciais de fosfato e também devido as condições de cultivo das culturas mãe utilizadas.

Assim como no caso do nitrato, as semanas que obtiveram as maiores porcentagens de remoção foram a primeira, quarta e quinta, sendo que a maior remoção em termos de quantidade foi obtida na primeira semana. As culturas utilizadas nessas semanas foram inoculadas com o mesmo tipo de cultura mãe (C2). Ou seja, a cultura mãe C2 foi a que gerou células mais eficientes na remoção fosfato, para todas as quatro condições de cultivo (luz natural sem aeração, 16000 lux sem aeração, 11000 lux com aeração e 9500 lux sem aeração), como pode ser observado na Tabela 10.

A partir das Figuras 44, 45, 46 e 47, é possível observar a remoção de fosfato ao longo das cinco semanas de experimento, identificando os dados diários em forma de curvas de concentração de fosfato em mg/L para as quatro condições de teste.

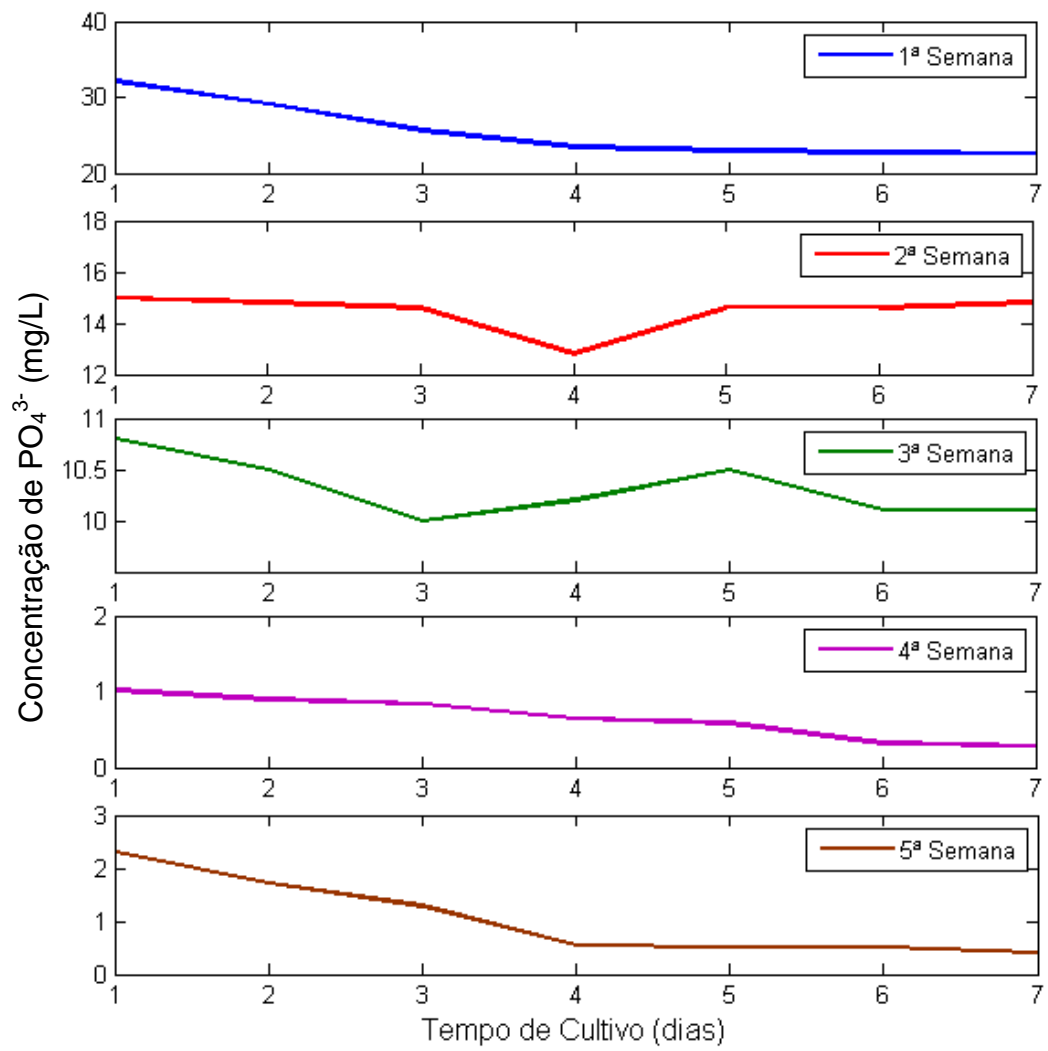
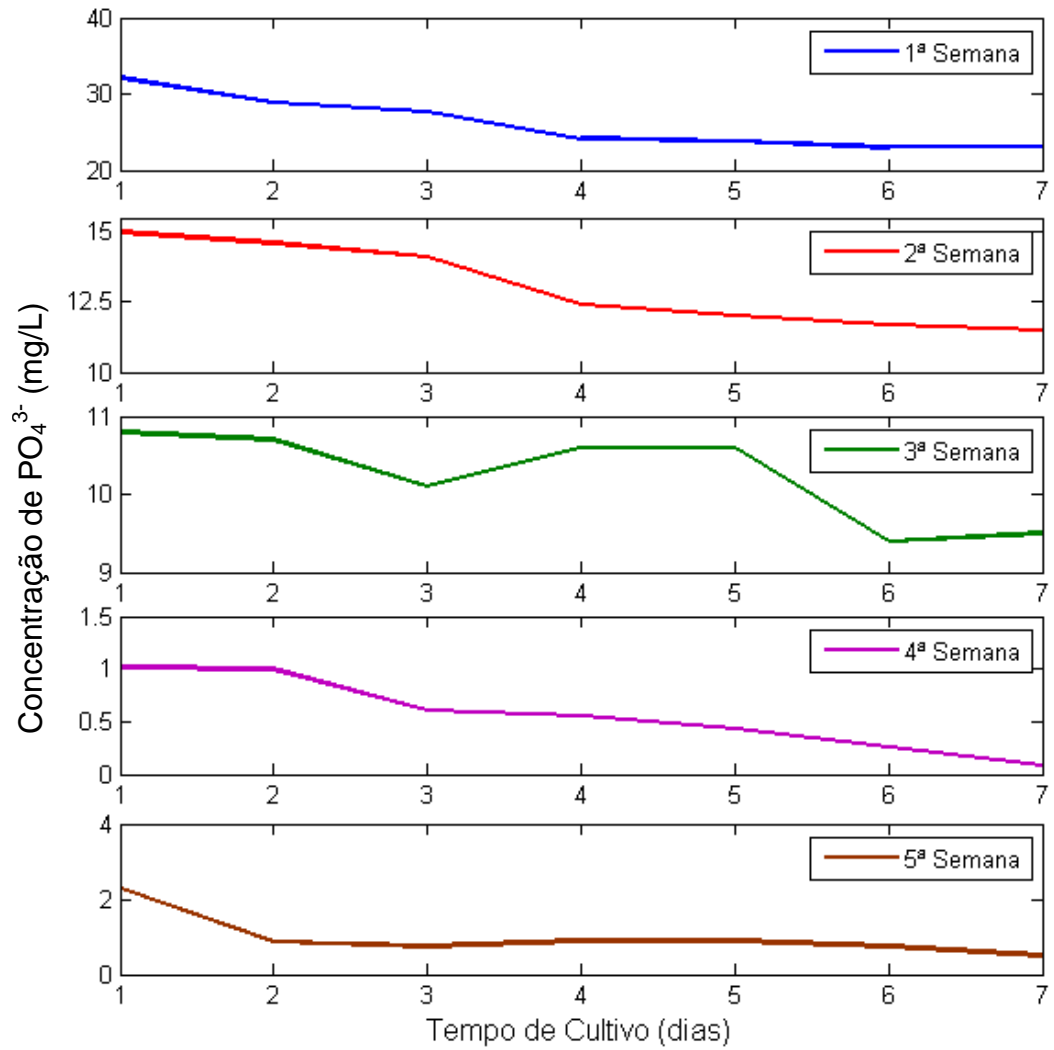


Figura 44 – Remoção de fosfato durante as cinco semanas de experimento, amostra cultivada sob luz natural.
Fonte: Autoria própria.



**Figura 45 – Remoção de fosfato durante as cinco semanas de experimento, amostra cultivada sob 16000 lux.
Fonte: Autoria própria.**

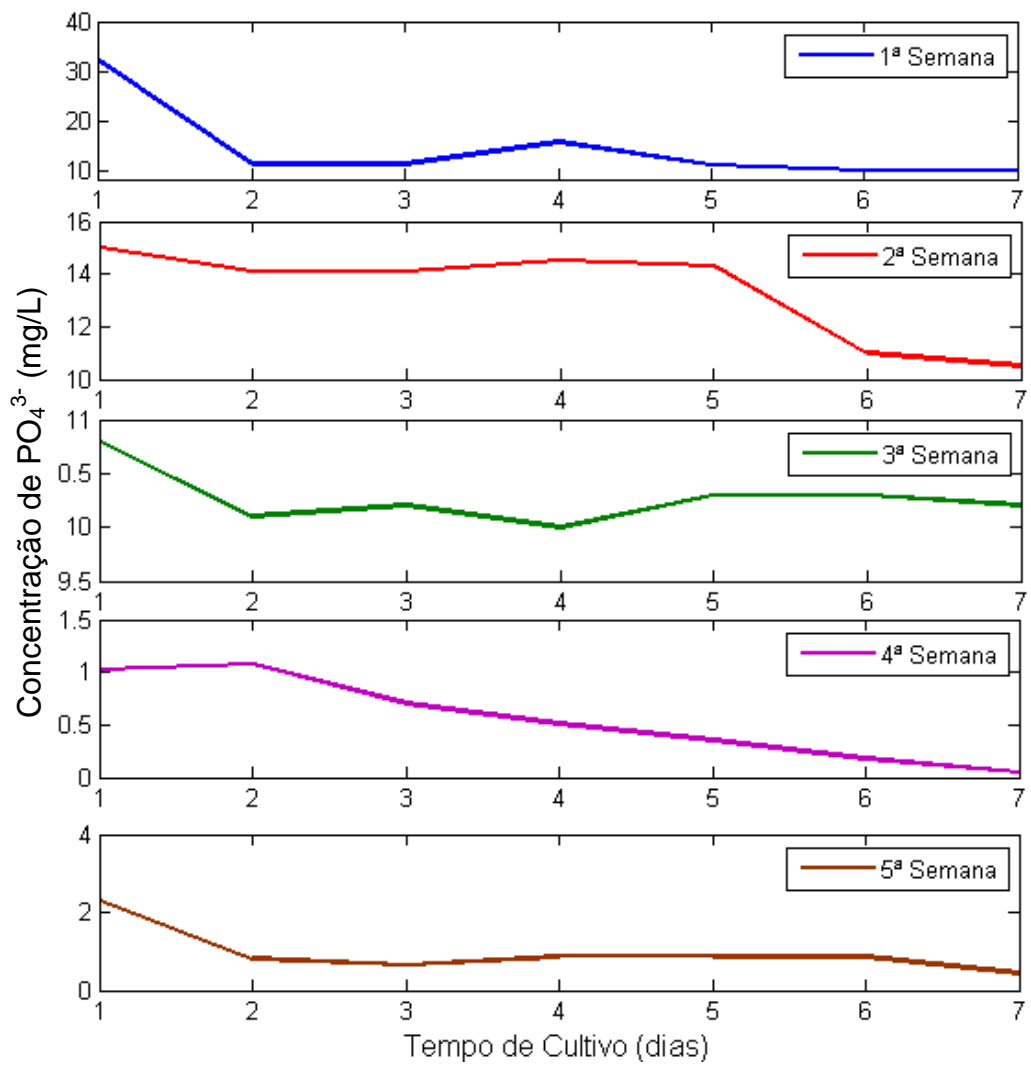
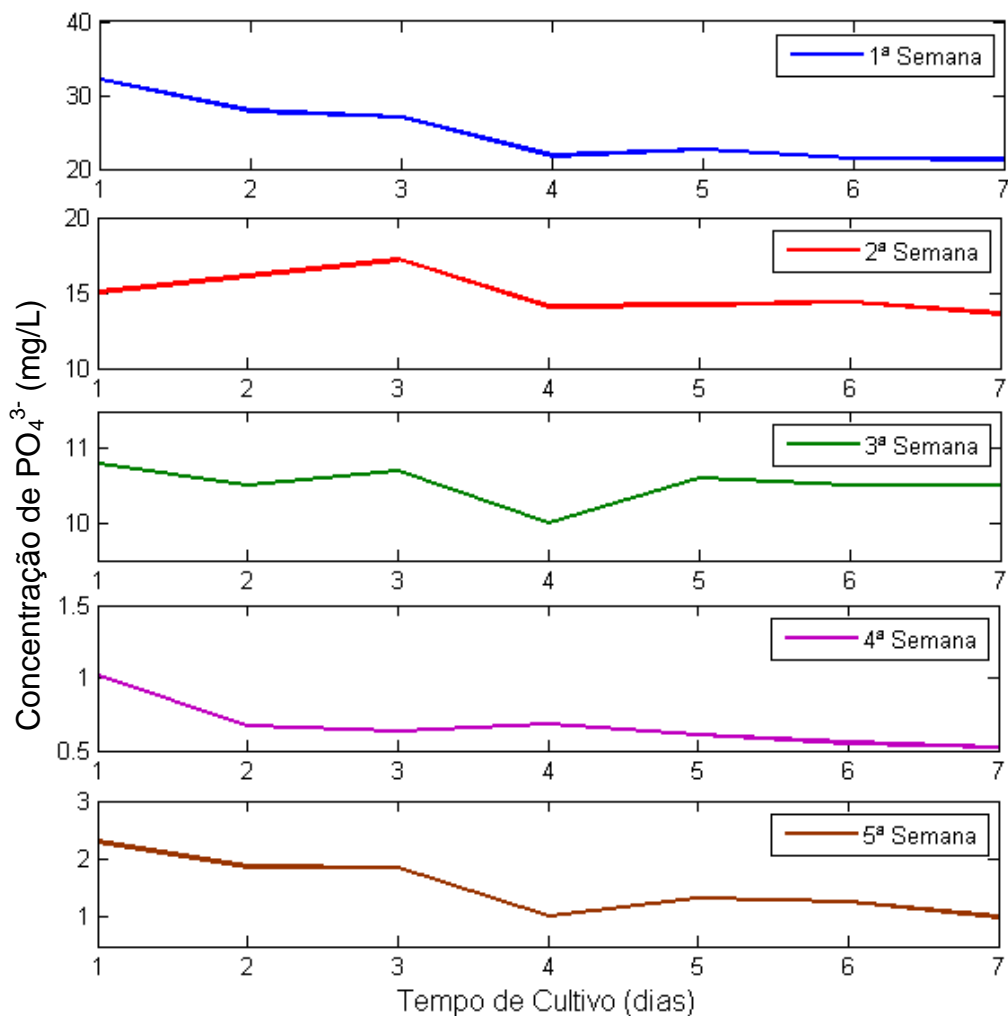


Figura 46 – Remoção de fosfato durante as cinco semanas de experimento, amostra cultivada sob 11000 lux, com aeração.
Fonte: Autoria própria.



**Figura 47 – Remoção de fosfato durante as cinco semanas de experimento, amostra cultivada sob 9500 lux.
Fonte: A autoria própria.**

Analisando a Figura 44, pode-se dizer que a amostra cultivada sob luz natural durante primeira semana de teste obteve remoção aparentemente gradual. A partir das Figuras 44-47, é possível perceber que os testes realizados na segunda e na terceira semana foram bastante inconclusivos em termos de padrão de remoção de fosfato, não apresentando nenhum padrão definido. Em alguns casos houve até mesmo a diminuição da concentração de fosfato seguida do seu aumento, gerando picos, como por exemplo no quinto dia da terceira semana da cultura mantida sob luz natural (Figura 44).

A Figura 46 permite a visualização do padrão de remoção de fosfato no teste realizado sob 11000 lux com aeração. Na quarta semana de teste, que foi a que apresentou maior porcentagem de remoção, observa-se um padrão de remoção

gradual após o segundo dia de cultivo. Isso pode ser explicado pela Figura 4, que mostra a curva de crescimento da microalga *C. vulgaris*, na qual pode-se observar uma intensificação na inclinação da curva de crescimento após o segundo dia.

5.5 CRESCIMENTO MICROALGAL E pH

5.5.1 Densidade Celular

Na Tabela 11 observa-se os valores de densidade celular inicial e final para as quatro condições de crescimento nas cinco semanas de experimento. Lembrando que as densidades celulares iniciais são aproximadamente as mesmas para todas as quatro condições de cada semana, visto que foi utilizada a mesma alíquota retirada da cultura mãe, que passou pelos mesmos procedimentos de homogeneização antes de ser inoculada em cada um dos quatro frascos.

Tabela 11 – Densidade celular inicial e final durante as cinco semanas de experimento.

Semana	Luz Natural		16000 lux		11000 lux (aeração)		9500 lux	
	DCi*	DCf*	DCi*	DCf*	DCi*	DCf*	DCi*	DCf*
1 (C2)	2,2	45	2,2	60	2,2	31	2,2	41
2 (C3)	6,1	24	6,1	41	6,1	65	6,1	37
3 (C1)	5,7	33	5,7	39	5,7	78	5,7	39
4 (C2)	5,9	31	5,9	34	5,9	60	5,9	36
5 (C2)	15	44	15	62,3	15	88	15	47

* Onde: DCi = Densidade Celular Inicial ($\times 10^5$ Células/mL) e DCf = Densidade Celular Final ($\times 10^5$ Células/mL)

Fonte: Autoria própria.

Analisando os dados da Tabela 11, conclui-se que os maiores aumentos de densidade celular (em número de células por mililitro) ocorreram durante a primeira semana de teste, sendo estes de vinte vezes, vinte e sete vezes, quatorze vezes e dezenove vezes, respectivamente para as condições “luz natural”, 16000 lux, 11000

lux com aeração e 9500 lux. Ou seja, densidades celulares iniciais menores levam a um aumento maior da biomassa algal no final do processo, visto que com menores quantidades iniciais as células não sofrem auto-sombreamento. Além disso, os maiores aumentos de densidade celular ocorreram na mesma semana que obteve as maiores remoções em termos de quantidade de nitrato e fosfato.

A semana com menores aumentos de densidades celulares foi a quinta semana, sendo estes aumentos de três vezes, quatro vezes, seis vezes e três vezes, para os condições de crescimento “luz natural”, 16000 lux, 11000 lux com aeração e 9500 lux, respectivamente. A maior densidade celular obtida foi de aproximadamente 9×10^6 células/mL, pela cultura mantida com 11000 lux (com aeração), no sétimo dia da quinta semana de teste. Tal cultura foi inoculada com $1,5 \times 10^6$ células/mL, como pode ser visto na Tabela 11.

A partir das Figuras 48, 49, 50 e 51, pode-se visualizar as curvas de densidade celular (em número de células por mililitro) do primeiro ao sétimo dia de cultivo de cada semana de cultivo para as quatro condições de crescimento diferentes.

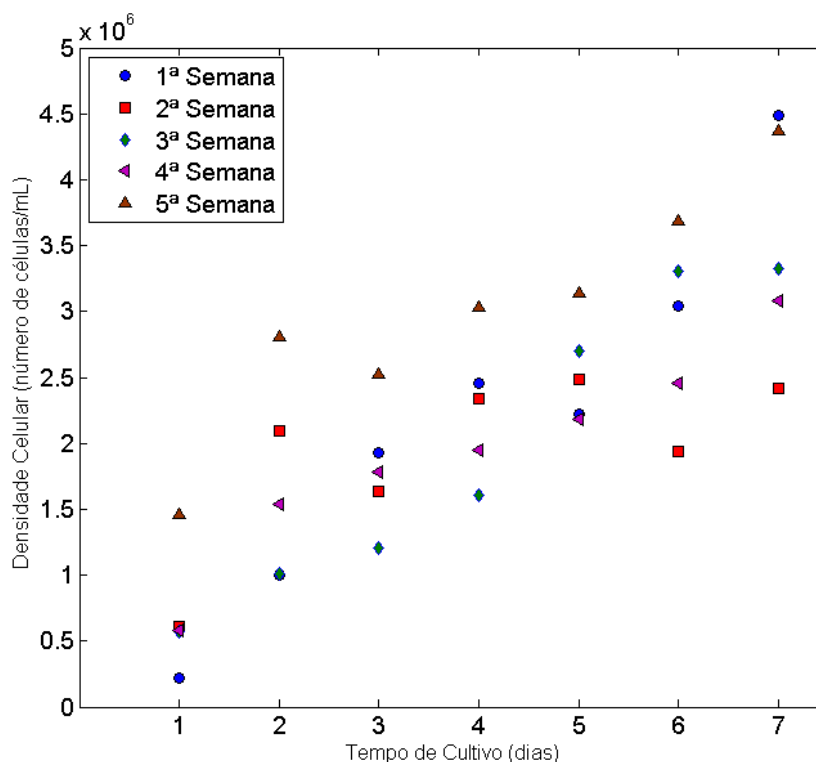


Figura 48 – Densidade celular durante as cinco semanas de experimento, amostra cultivada sob luz natural.
Fonte: Autoria própria.

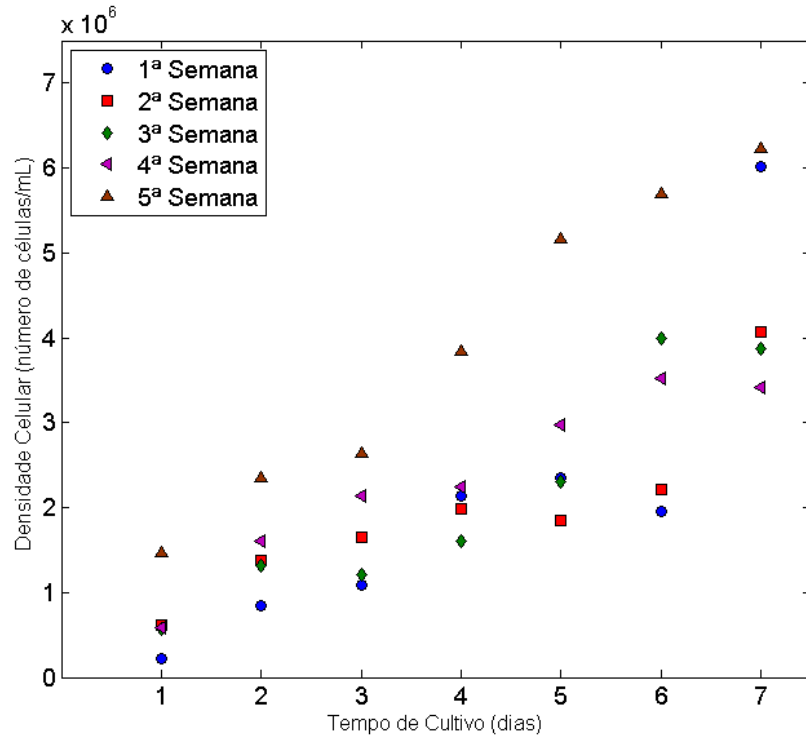


Figura 49 – Densidade celular durante as cinco semanas de experimento, amostra cultivada sob 16000 lux.
Fonte: Autoria própria.

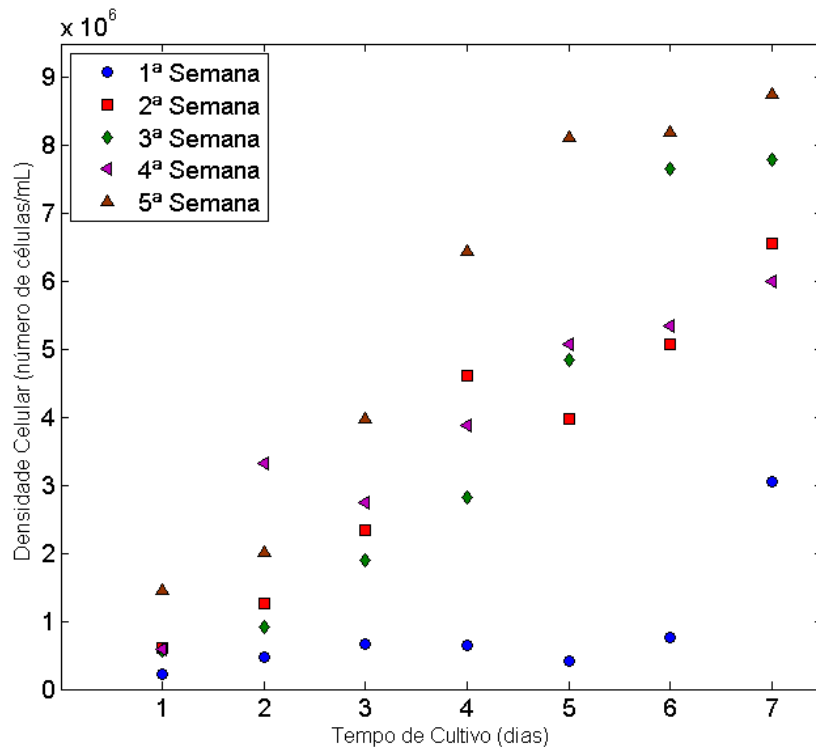


Figura 50 – Densidade celular durante as cinco semanas de experimento, amostra cultivada sob 11000 lux, com aeração.
Fonte: Autoria própria.

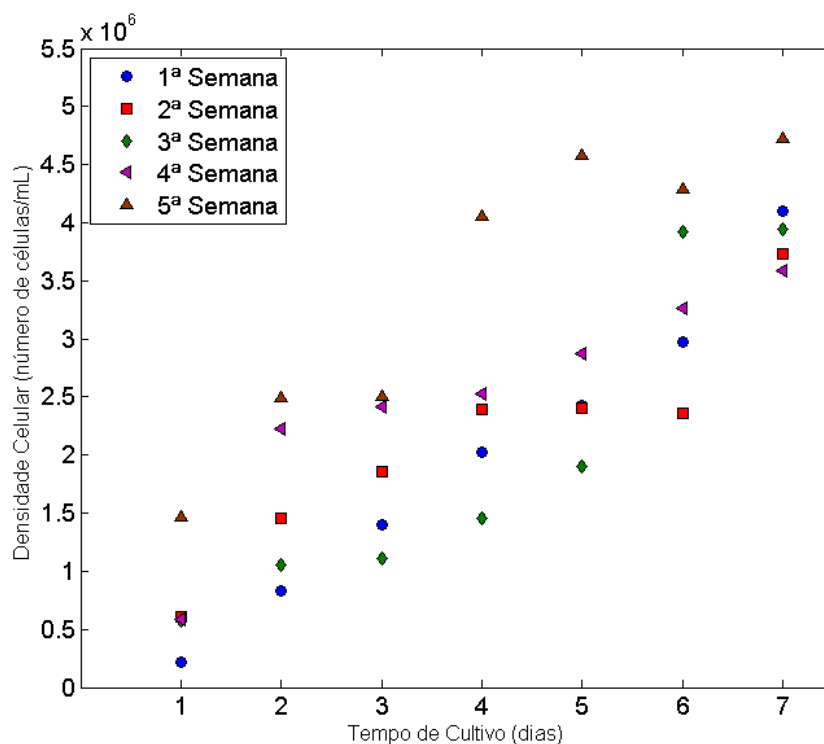
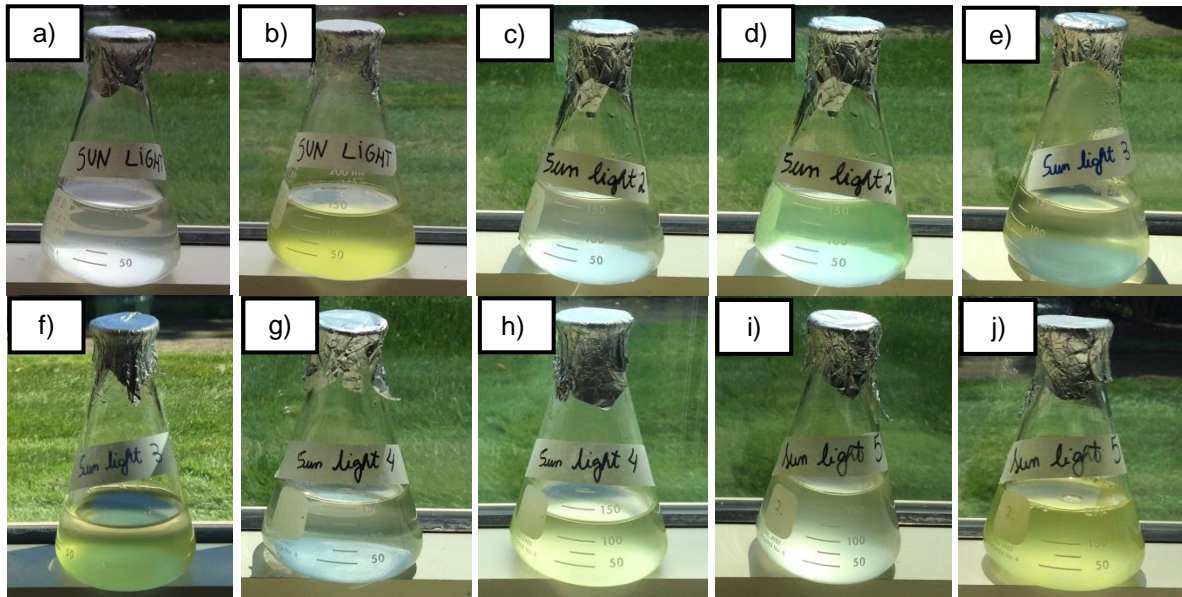


Figura 51 – Densidade celular durante as cinco semanas de experimento, amostra cultivada sob 9500 lux.

Fonte: Aatoria própria.

Analisando as Figuras 48-51, nota-se que durante durante maioria das semanas e condições de crescimento a densidade celular aumentou linearmente. A amostra que mais fugiu desse padrão foi a cultivada sob 11000 lux, com aeração, na primeira semana de teste, como pode ser visto na Figura 50.

A Figura 52 permite a visualização do que foi retratado na Tabela 11, de que as culturas mantidas sob luz natural na primeira e quinta semana obtiveram densidades celulares bem próximas ao final do período de teste das mesmas. As culturas mantidas sob luz natural na segunda, terceira e quarta semana apresentam menor diferença entra a coloração da cultura do primeiro dia e coloração do último dia de cultivo, indicando menor crescimento da biomassa microalgal.



**Figura 52 – *C. vulgaris* cultivada sob luz natural no primeiro e último dia, respectivamente: a) e b) primeira semana; c) e d) segunda semana; e) e f) terceira semana; g) e h) quarta semana; i) e j) quinta semana.
Fonte: Autoria própria.**

A Figura 53 apresenta o primeiro e último dia de cultivo em cada uma das semanas para as amostras mantidas sob 16000 lux sem aeração, 11000 lux com aeração e 9500 lux sem aeração. Lembrando que a amostra de 9500 lux ficava disposta mais à frente, a de 11000 lux ao meio, e a de 16000 lux atrás, bem próxima às lâmpadas.

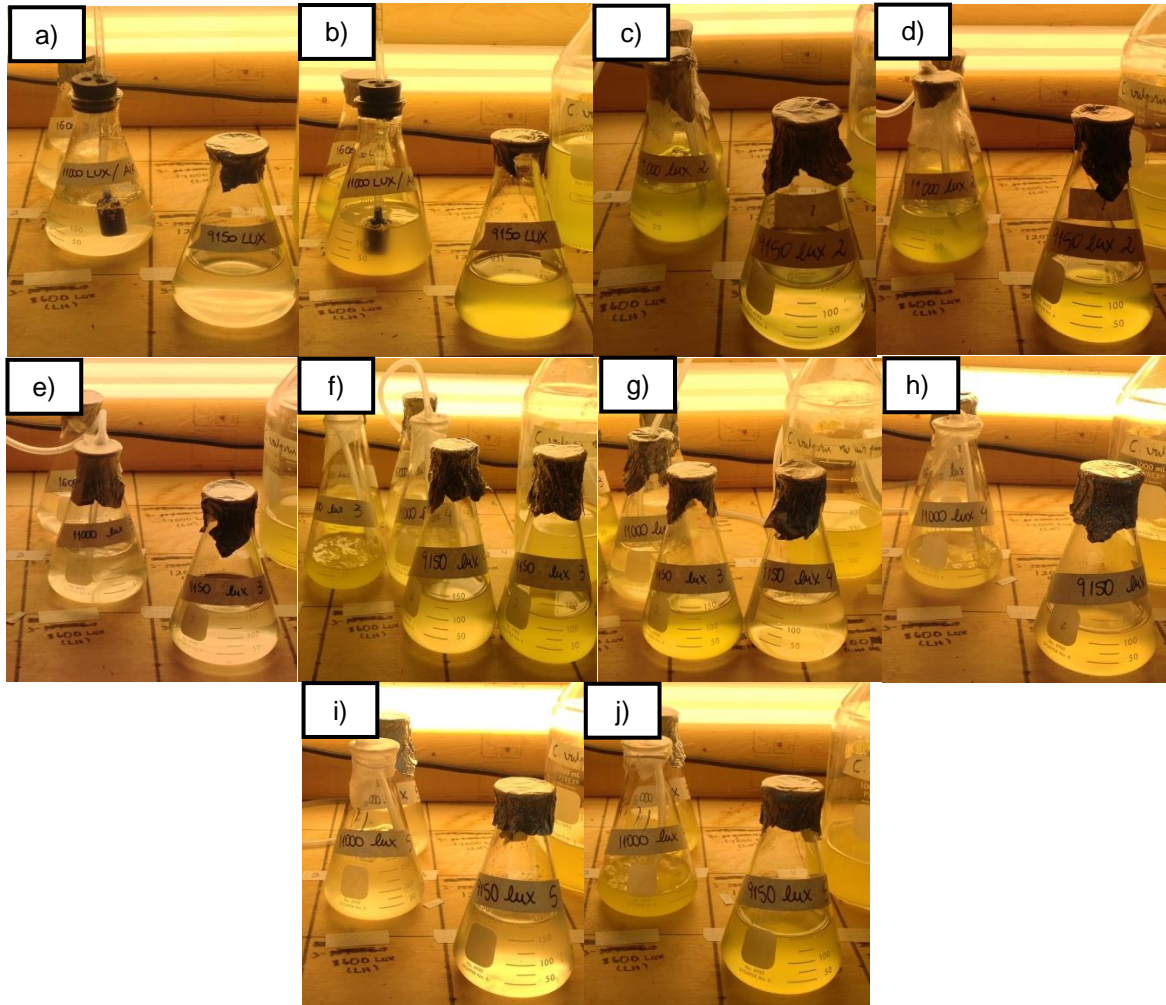


Figura 53 – *C. vulgaris* cultivada sob 16000 lux, 11000 lux com aeração e 9500 lux no primeiro e último dia, respectivamente: a) e b) primeira semana; c) e d) segunda semana; e) e f) terceira semana; g) e h) quarta semana; i) e j) quinta semana.
 Fonte: Autoria própria.

5.5.2 pH

Os valores de pH e densidade celular diariamente, para as cinco semanas de experimento e para as quatro condições de crescimento são apresentados nas Tabelas 12, 13, 14 e 15.

Tabela 12 – Densidade celular e pH durante os sete dias das cinco semanas de estudo sob Luz Natural.

1ª semana		2ª semana		3ª semana		4ª semana		5ª semana	
DC	pH	DC	pH	DC	pH	DC	pH	DC	pH
2,2	6,23	6,1	8,2	5,7	7,54	5,9	9,73	14,6	7,85
10	9,61	20,9	9,46	10,2	9,1	15,4	9,3	28,1	8,93
19,3	9,48	16,4	9,92	12,1	9,66	17,9	9,03	25,3	9,98
24,6	9,42	23,4	9,98	16,1	9,98	19,5	9,82	30,4	9,52
22,2	9,34	24,9	10,08	27,1	9,95	21,9	9,96	31,4	10,23
30,4	9,54	19,4	10,23	33,1	8,58	24,6	10,22	36,9	10,47
44,9	9,82	24,2	9,98	33,3	7,02	30,8	9,48	43,7	11,25

Onde: DC = Densidade Celular ($\times 10^5$ Celúlas/mL)

Fonte: Autoria própria.

Tabela 13 – Densidade celular e pH durante os sete dias das cinco semanas de estudo sob 16000 lux.

1ª semana		2ª semana		3ª semana		4ª semana		5ª semana	
DC	pH	DC	pH	DC	pH	DC	pH	DC	pH
2,2	6,23	6,1	8,2	5,7	7,69	5,9	9,74	14,6	7,76
8,5	9,66	13,7	9,23	13,1	9,45	16,1	10,25	23,6	9,37
10,9	9,89	16,5	10,11	12,2	10,19	21,5	10,20	26,4	10,50
21,5	9,83	19,9	10,02	16	10,32	22,5	10,27	38,5	10,52
23,5	9,73	18,6	10,14	23,1	10,32	29,8	10,23	51,7	10,75
19,5	9,83	22,2	10,25	40	10,33	35,2	10,54	57	11,81
60,2	9,90	40,8	10,18	38,8	10,40	34,2	10,35	62,3	12,24

Onde: DC = Densidade Celular ($\times 10^5$ Células/mL)

Fonte: Autoria própria.

Tabela 14 – Densidade celular e pH durante os sete dias das cinco semanas de estudo sob 11000 lux com aeração.

1ª semana		2ª semana		3ª semana		4ª semana		5ª semana	
DC	pH	DC	pH	DC	pH	DC	pH	DC	pH
2,2	6,23	6,1	8,2	5,7	7,64	5,9	6,74	14,6	6,97
4,8	7,44	12,6	8,88	9,2	7,99	33,3	7,60	20,1	7,94
6,7	7,81	23,4	9,98	19,0	9,86	27,5	7,33	39,9	7,92
6,5	7,85	46,1	7,68	28,3	9,93	38,8	7,51	64,5	7,84
4,1	7,99	39,9	8,49	48,5	8,35	50,9	7,56	81,3	7,80
7,7	7,60	50,7	9,15	76,6	8,80	53,4	7,61	82,0	7,77
30,6	9,60	65,6	9,54	77,9	9,75	60,0	7,67	87,6	8,65

Onde: DC = Densidade Celular ($\times 10^5$ Células/mL)

Fonte: Autoria própria.

Tabela 15 – Densidade celular e pH durante os sete dias das cinco semanas de estudo sob 9500 lux.

1ª semana		2ª semana		3ª semana		4ª semana		5ª semana	
DC	pH	DC	pH	DC	pH	DC	pH	DC	pH
2,2	6,23	6,1	8,2	5,7	7,69	5,9	9,55	14,6	7,93
8,3	9,41	14,6	9,05	10,5	9,15	22,3	10,22	24,9	9,41
14,0	9,91	18,6	10,17	11,1	10,12	24,1	10,17	25,0	10,54
20,3	9,84	23,9	10,03	14,6	10,26	25,3	10,34	40,6	10,58
24,3	9,75	24,0	10,21	19,0	10,36	28,7	10,31	45,8	11,2
29,7	9,95	23,6	10,26	39,3	10,25	32,6	10,39	42,9	11,33
41	10,32	37,4	10,32	39,5	10,35	35,9	10,85	47,2	11,85

Onde: DC = Densidade Celular ($\times 10^5$ Células/mL)

Fonte: Autoria própria.

Analisando os dados das Tabelas 12-15 verticalmente, do primeiro ao sétimo dia de cultivo para cada semana e para as quatro condições de crescimento, pode-se afirmar que o crescimento da biomassa, no geral, levou ao aumento gradual do pH nas amostras. De acordo com Lopes (2007) e Cuaresma et al. (2006), o aumento de pH ocorre porque durante o processo fotossintético, as microalgas transportam íon hidróxido para o exterior da célula visando realizar o consumo de formas inorgânicas de carbono. Grima et al. (1999) afirma que a enzima anidrase carbônica age como catalizador nesse processo, se associando à captação de íons hidróxido para dentro das membranas tilacóides.

O maior valor de pH obtido foi de 12,24 ao final da quinta semana, pela cultura mantida sob 16000 lux, sendo que o valor inicial era de 7,76 (Tabela 13), caracterizando um aumento de 57,73% e estando relacionado com a densidade celular de $62,3 \times 10^5$ células/mL.

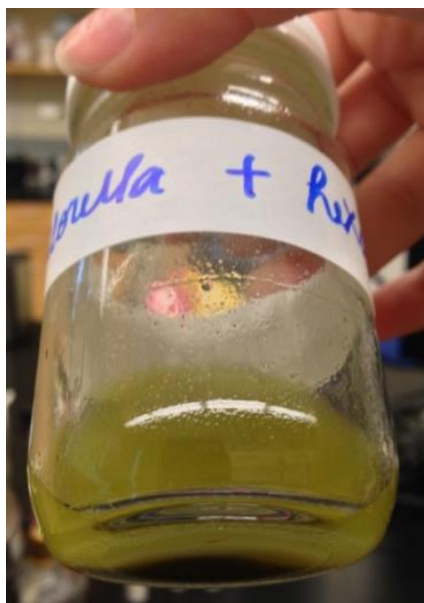
Segundo Lavens e Sorgeloos (1996), a faixa ótima de pH varia de 8,2 à 8,7. Embora as culturas mantidas sob 11000 lux com aeração não tenham sido as que mais aumentaram sua biomassa, nem as que registraram maior aumento de pH, pode-se dizer que elas foram as que possuíram valores de pH mais próximos da faixa ótima.

As culturas que obtiveram maior aumento de pH foram aquelas mantidas sob 16000 lux e 9500 lux, o que faz sentido, visto que tais culturas também foram uma das que mais aumentaram sua biomassa. Como na primeira semana, por exemplo, que a cultura mantida sob 16000 lux aumentou sua biomassa em 2700% (maior

aumento registrado) e seu pH foi elevado em 3,67, e, também na primeira semana, a amostra cultivada sob 9500 lux aumentou sua biomassa em 1900% e registrou o segundo maior aumento de pH (4,09).

5.6 PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Ao ser pesado em balança analítica, o concentrado de microalgas na forma líquida, ilustrado na Figura 31b, obteve a biomassa líquida de 15,377 g. Após a secagem da amostra, o peso da biomassa seca foi de 1,038 g. Adicionou-se o hexano para que os lipídios fossem extraídos, e o resultado da extração continha uma mistura de lipídios e hexano, como mostra a Figura 54.



**Figura 54 – Lipídios extraídos em hexano.
Fonte: Autoria própria.**

O resultado obtido após a filtração da amostra e evaporação do hexano segue na Figura 55. Pode-se observar que o conteúdo obtido tem aparência oleosa e ficou concentrado no fundo do becker. A massa de lipídios extraída foi de 0,105 g.

Calculou-se, então, a porcentagem de lipídios totais, ou conteúdo lipídico da biomassa, utilizando a Equação (2).

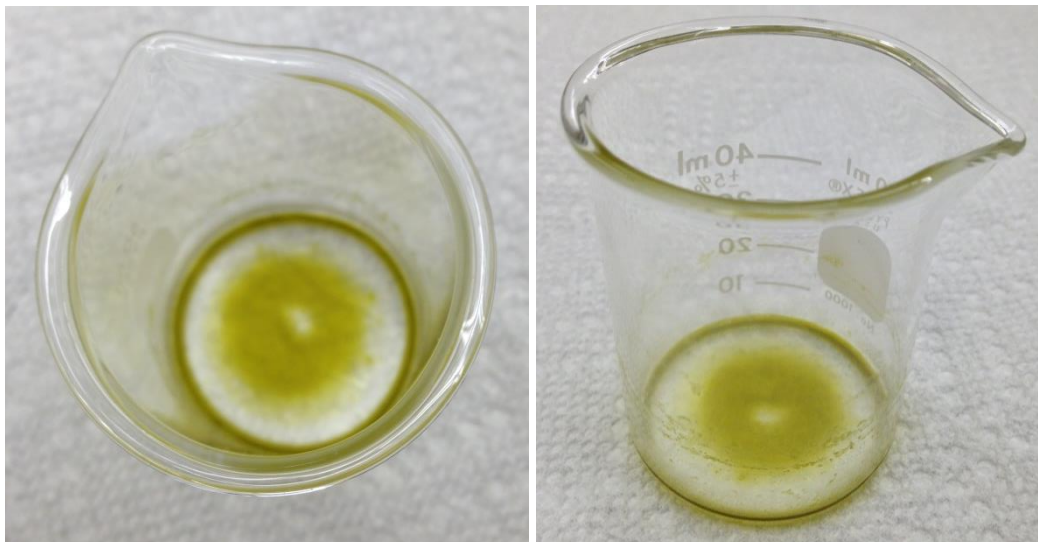


Figura 55 – Lipídios extraídos de *Chlorella vulgaris*.
Fonte: Autoria própria.

$$\text{Conteúdo Lipídico(\%)} = \frac{0,105}{1,038} \cdot 100 = 10,12\% \quad \text{Equação (2)}$$

O resultado do conteúdo lipídico indica que 10,12% da biomassa seca obtida era constituída por lipídios, o que condiz com o citado por Khan et al. (2009) e Mata et al. (2010), que dizem que a porcentagem de lipídios de *Chlorella vulgaris*, em peso seco, é de 5 à 58%. Este valor é, no entanto, um pouco abaixo do que foi sugerido por Illman et al. (2000), que diz que *Chlorella vulgaris* possui de 18 à 40% de seu peso seco composto por lipídios. Esse valor inferior ao citado por Illman et al. (2000) pode ter sido resultado da extração incompleta de lipídios, devido à pequena quantidade de biomassa utilizada e conseqüentemente pequena quantidade de solvente, tornando a extração em escala piloto um processo mais difícil de ser efetivado.

Após a transesterificação dos lipídios em biodiesel, avaliou-se o biodiesel obtido através do processo de cromatografia gasosa. Os cromatogramas do

biodiesel obtido e do diesel tradicional podem ser visualizados nas Figuras 56 e 57, respectivamente. No eixo horizontal tem-se o tempo de retenção e abaixo das curvas tem-se a área dos picos em destaque.

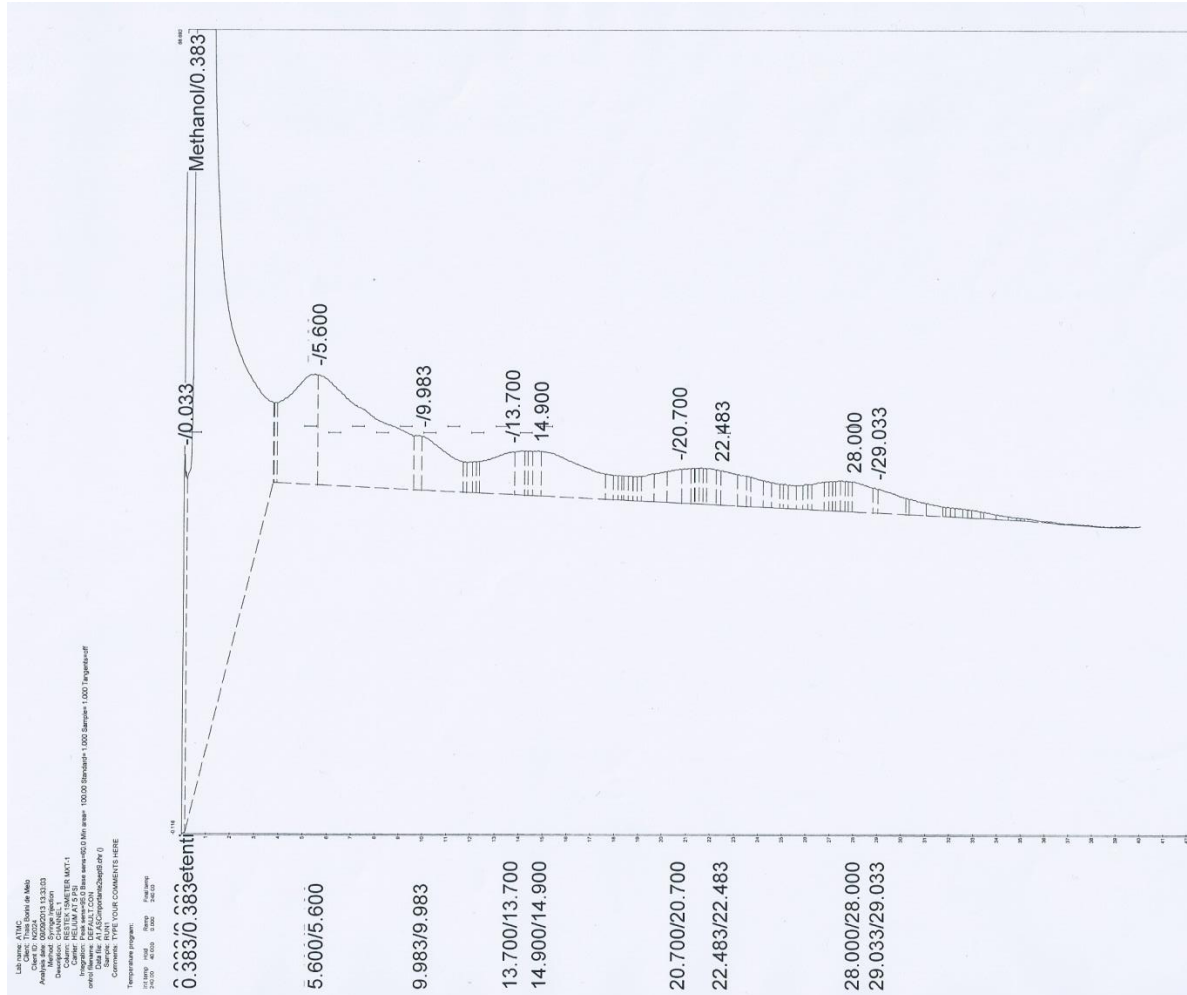


Figura 56 – Cromatograma do biodiesel obtido a partir dos lipídios de *C. vulgaris*.
 Fonte: Autoria própria.

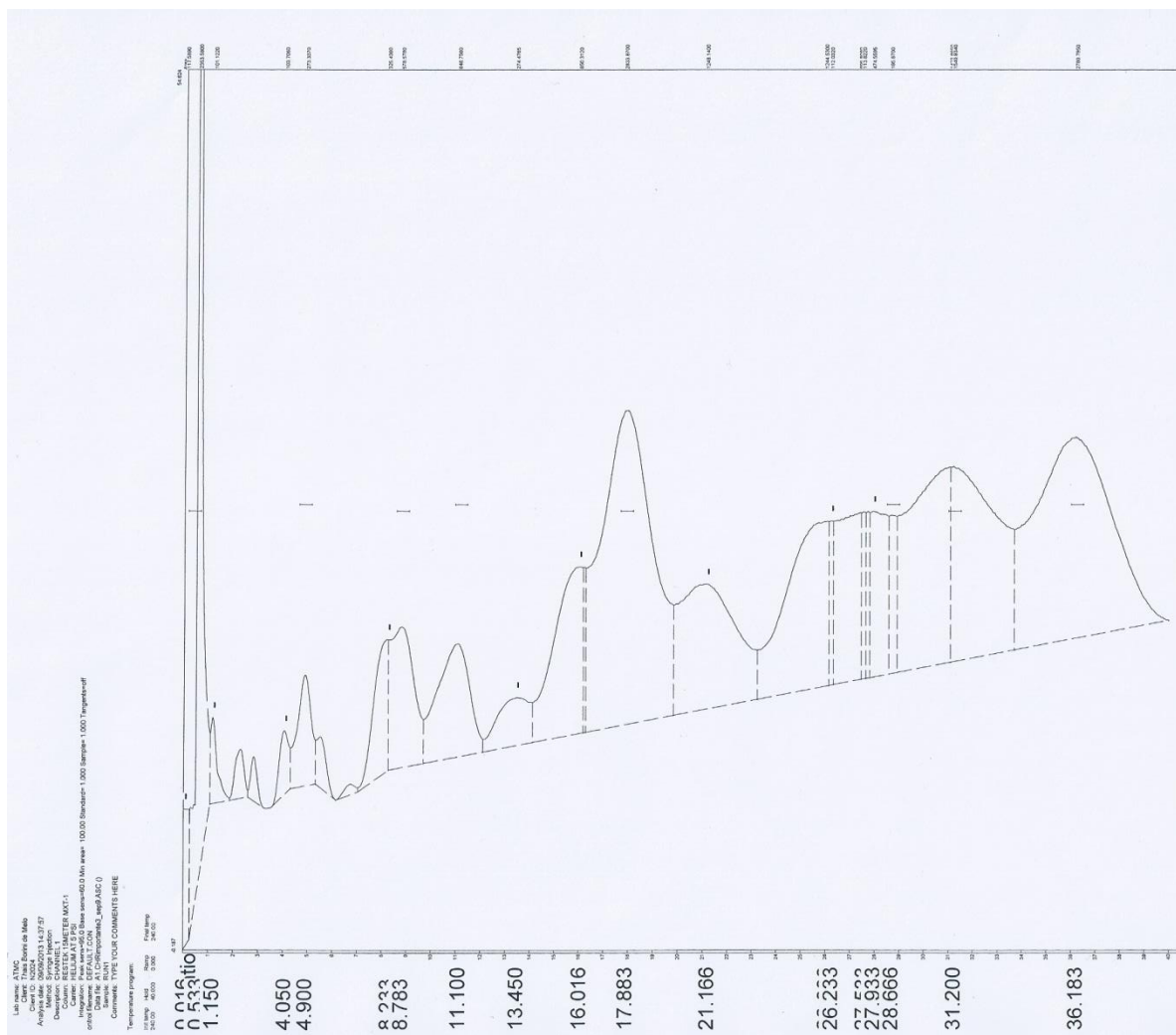


Figura 57 – Cromatograma de diesel tradicional.
Fonte: Autoria própria.

Não foi um dos objetivos deste trabalho classificar as substâncias detectadas nos picos ao longo do cromatograma do biodiesel obtido. No entanto, comparando-se visualmente os dois cromatogramas, pode-se afirmar que existem picos nas duas Figuras que foram detectados em tempos de retenção parecidos. Inclusive, o pico do metanol (Figura 42), que foi facilmente identificado no cromatograma do biodiesel, visto que este tipo de substância possui comportamento bem definido em cromatogramas, pode ser comparado com o pico do etanol detectado no cromatograma do diesel tradicional (Figura 43 – primeiro pico, fino e longo, detectado ainda no primeiro minuto de análise).

Além do metanol e etanol, existem os picos próximos de cinco, nove, e vinte e um/vinte e dois minutos de retenção, que estão presentes em ambos os

cromatogramas, embora os resultados do de biodiesel sejam mais fracos e com picos menos definidos. Essa falta de definição nos picos se deu, provavelmente, devido à “fraca composição” do biodiesel, que foi gerado a partir de apenas 0,105 g de lipídios, e da conseqüente baixa eficiência na extração dos mesmos. Porém, pode-se afirmar que os componentes do biodiesel obtido e os de diesel tradicional se assemelham, o que comprova a possibilidade de sua geração a partir de biomassa microalgal.

6 CONCLUSÕES

Ao longo dos testes de remoção de nutrientes, não observou-se diferenças morfológicas discrepantes entre as culturas crescidas em distintas condições. No entanto, as células das culturas cultivadas sob 11000 lux (com aeração) foram as únicas que não formaram colônias. Além disso, esta mesma condição gerou células com formato mais definido e aparência mais sadia. Estes resultados ocorreram provavelmente devido a aeração das culturas mantidas sob 11000 lux.

O maior aumento na biomassa de *Chlorella vulgaris* obtido neste estudo foi de 2700%, na primeira semana de teste, pela cultura mantida sob 16000 lux, que, conseqüentemente, também obteve um aumento de pH de 3,67, segundo maior aumento registrado no experimento. O maior aumento de pH foi de 4,09, na primeira semana, pela cultura mantida sob 9500 lux, a qual também registrou um dos maiores aumento de biomassa (1900%).

A cultura que demonstrou maior eficiência na remoção de nitrato foi a mantida sob 11000 lux com aeração, na quinta semana do experimento, que removeu 96,67% da concentração inicial. A maior eficiência na remoção de fosfato foi de 95,10%, também pela cultura mantida sob 11000 lux com aeração, porém, na quarta semana. As maiores remoções de nutrientes em termos de quantidade foram obtidas na primeira semana pela cultura mantida sob 11000 lux com aeração, tanto pra nitrato, quanto para fosfato.

Convém ressaltar que o maior aumento de biomassa, e as maiores remoções de nitrato e fosfato em porcentagem e em quantidade foram obtidas por culturas inoculadas com a cultura mãe C2, que era aerada e possuía células novas em cada semana de inoculação. Ou seja, a cultura mãe C2 gerava células mais eficientes na remoção de nutrientes e com taxas de crescimento maiores. Isso enfatiza a importância da aeração nos resultados obtidos neste estudo, visto que esta era a única cultura mãe aerada, e que as culturas mantidas sob 11000 lux com aeração que tinham sido geradas a partir de C2 obtiveram as melhores porcentagens de remoção de nutrientes. Além disso, observa-se a importância da utilização de células mães novas no momento da inoculação.

Por fim, concluiu-se também que foi possível produzir biodiesel a partir da biomassa seca obtida após crescimento em efluente sintético, a qual era constituída

em 10,12% por lipídios. O biodiesel produzido possui composição similar a do diesel tradicional, embora seja mais fraco, pois foi gerado a partir de apenas 0,105 g de lipídios, fato que interferiu na eficiência da extração dos mesmos.

As sugestões para trabalhos futuros são: realização de testes em maior escala, que permitam a obtenção de uma maior quantidade de biomassa; intensidade luminosa nos fotobiorreatores mais amena, visto que neste estudo esta foi bastante intensa; e também um estudo mais detalhado do biodiesel gerado, principalmente em relação ao seu potencial energético.

REFERÊNCIAS

ABALDE, J.; CID, A.; FIDALGO, P.; TORRES, E.; HERRERO, C. **Microalgas: cultivo y aplicaciones**. 1995. 210f. Monografia, Universidade da Coruña, Espanha, 1995.

ARCEO, Á. A. **Produção de biodiesel mediante o processo de Hidroesterificação da biomassa das microalgas *Scenedesmus dimorphus* e *Nannochloropsis oculata***. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14339: Água – Determinação de pH – Método eletrométrico**. Rio de Janeiro, 1999.

ASLAN, S.; KAPDAN, I. K. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. **Ecological Engineering**, v. 8, p. 64–70. 2006.

BARBOSA, B.; ALBRECHT, M.; WIJFFELS, R.; Hydrodynamic stress and lethal events in sparged microalgae cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 83, p. 112-120, 2003.

BECKER, E. W. Microalgae for human and animal consumption. In:

BOROWITZKA, M. A. & BOROWITZKA, L. J. (Eds) **Microalgal Biotechnology**. Cambridge University Press, p. 222-255, Cambridge, 1988.

BECKER, E. W. Large scale cultivation. In: Microalgae – Biotechnology and Microbiology. **Cambridge University press**, p.63-171, Cambridge, 2004.

BICH, N.N.; YAZIZ, M.I.; BAKTI, N.A.K. Combination of *Chlorella vulgaris* and *Eichhornia crassipes* for wastewater nitrogen removal. **Water Research**, v. 33, p. 2357–2362, 1999.

BIOSURPLUS. **Fisher Scientific Centrifug**TM. Disponível em: <
<https://www.quartzy.com/reagent-detail/1458116/1/Centrifug-Model-225A--230V-BioSurplus>>. Acesso em: 10 fev. 2014.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Introdução à química de alimentos**. 2º edição. Livraria Varela, 223p, São Paulo, 1995.

BORGHETTI, I. A. **Avaliação do crescimento da microalga *Chlorella minutissima* em meio de cultura com diferentes concentrações de manipueira.** 2009. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

BOROWITZKA, M.A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology.** n.70, p.313-321, 1999.

BRAGA, G. K. **Determinação das especificações do processo *spray drying* na obtenção de micropartículas biodegradáveis para a liberação sustentada de princípios ativos com aplicação odontológica.** 2005. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. **Empresa de Pesquisa Energética Balanço Energético Nacional 2006: Ano base 2005.** Relatório final. Ministério de Minas e Energia. Empresa de Pesquisa Energética. Rio de Janeiro: EPE, 2006.

CARIOCA, J.O.B.; ARORA, H.L. **Biomassa: Fundamentos e Aplicações Tecnológicas.** Fortaleza: Edição UFC., 1984.

CARLOZZI, P. Dilution of solar radiation through “culture lamination” in photobioreactor rows facing south north: a way to improve the efficiency of light utilization. **Biotechnology**, v. 81, p. 305-315, 2003.

CARLSSON, A., BEILEN VAN, J., MÖLLER, R., CLAYTON, D. AND BOWLES, D. **Micro and macroalgae - utility for industrial applications Bioproducts.** Heslington: University of York, 2007.

CAROLINA BIOLOGICAL SUPPLY. **Culturing Algae.** 2. ed. Carolina Biological Supply Company: North Carolina, 2012.

CARTONI, C. R. **Avaliação de catalisadores alcalinos na produção de biodiesel metílico derivado de óleo de soja: análise técnica, econômica e ambiental.** 2009. 83 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade Federal de São Paulo. Lorena, 2009.

CHEN, C. et al. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. **Bioresource Technology.** [s.l.], v. 102, n. 1, p. 71–81, 2011.

CHINNASAMY, S.; RAMAKRISHNAN, B.; BHATNAGAR, A. E.; DAS, K. Biomass production potential of a wastewater alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under elevated levels of carbon dioxide and temperature. **International Journal of Molecular Sciences**, v.10, p. 518-532, 2009.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 294-306, 2007.

CHISTI, Y. **Response to Reijnders: Do biofuels from microalgae beat biofuels from terrestrial plants?** Trends in Biotechnology, Palmerston North, New Zealand, vol. 26, n. 7. 2008.

CHISTI, Y. **Biodiesel from microalgae beats bioethanol.** Trends in biotechnology, Palmerston North, New Zealand, 2008.

COLE-PARMER. **Fixed-speed Centrifuge EW-17250-10.** Disponível em: <http://www.coleparmer.com/Product/Fixed_speed_Centrifuge_with_60_minute_Timer_115V/EW-17250-10>. Acesso em: 3 fev. 2014.

COLLA, L.; RUIZ, W. A.; COSTA, J. A. V. Metabolismo de carbono e nitrogênio em microalgas, **Vetor**, v. 12, p.61–78, 2002.

COLORADO STATE UNIVERSITY. **Counting Cells with a Hemacytometer.** 2002. Disponível em: <<http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/semeneval/hemacytometer.html>>. Acesso em: 5 fev. 2014.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA N°357, de 17 de março de 2005. **Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e da outras providencias.** Publicado no Diário Oficial da União. 18 março de 2005.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA N°430, de 13 de maio de 2011. **Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução n° 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA.** Publicado no Diário Oficial da União. 14 maio de 2011.

CONVERTI, A.; CASAZZA, A. A.; ORTIZ, E. Y.; PEREGO, P.; BORGHI, M. D. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of

Nannochloropsis oculata and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 48, p. 1146-1151, 2009.

COMPANHIA DE SANEAMENTO DE MINAS GERAIS – COPASA. **Processos de Tratamento**. Disponível em:
<<http://www.copasa.com.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=34>>. Acesso em 15 fev. 2014.

CORDEIRO, C. S. **Síntese e caracterização de biodiesel etílico para utilização em motores do ciclo-diesel**. 2003. 99f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós – Graduação em Engenharia Mecânica e de Materiais, Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná, Curitiba, 2003.

CUARESMA, M.; GARBAYO, I.; VEGA, J.M.; VÍLCHEZ, C. Growth and photosynthetic utilization of inorganic carbon of the microalga *Chlamydomonas acidophila* isolated from Tinto river. **Enzyme and Microbial Technology**, n.40, p.158-162, 2006.

CULTURE collection of algae. Praga: Charles University of Prague, 2013.

DARLEY, W. M. Algal Biology: a physical approach. In: WILKINSON, J. F. **Basic Microbiology**. v. 9, p. 30-52. Blackwell Scientific Publications, 1982.

DEFANTI, L. S.; SIQUEIRA, N. S.; LINHARES, P. C. Produção de Bicom bustíveis a partir de algas fotossintetizantes. **Bolsista de Valor - Revista de Divulgação do Projeto Universidade Petrobras e IF Fluminense**. [s.l.], v.1, p. 11-21, 2010.
Disponível em:
<<http://essentiaeditora.iff.edu.br/index.php/BolsistaDeValor/issue/view/91/showToc>>.
Acesso em: 20 jan. 2014.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 36, n.6, p. 1959-1967, nov-dez. 2006.

DISMUKES, G. C.; CARRIERI, D.; BENNETE, N.; ANANYEV, G. M.; POSEWITZ, M. C.; Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v.19,n.3, p. 235-240, 2008.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA (BRASIL). **Balanco Energético Nacional 2012**: Ano Base 2011 – Relatório Final. Rio de Janeiro: EPE, 2012a. 282 p.

GLADUE, R. M. Heterotrophic microalgae production: potential for application to aquaculture feeds. In: FULKS, W.; MAIN, K. **Rotifer and Microalgae Culture Systems**. Honolulu, p. 275-286, 1991.

FISHER SCIENTIFIC. **Denver Instrument UltraBasic Benchtop pH Meters**.

Disponível em:

<http://www.fishersci.com/ecommerce/servlet/fsproductdetail_10652_756159__-1_0>.

Acesso em: 7 fev. 2014.

FLORIDA AQUA FARMS INC. **Micro Algae Grow Mass Pack**. Dade City, 2000.

FRANCO, A. L. C. et al. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**. [s.l.], v. 36, n. 3, p. 437–448, fev. 2013.

GOOGLE EARTH versão 5.2.1.1588.

GONZALES, L.E.; CANIZARES, R.O.; BAENA, S. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. **Bioresource Technology**, v. 60, n.3., jun. 1997.

GRESSLER, P. D. **Avaliação da eficiência de *Desmodesmus subspicatus* (R. Chodat) E. Hegewald & A. Schmidt (CHLOROPHYCEAE) cultivada em fotobiorreator tubular com efluente da ETE-UNISC, visando biorremediação e obtenção de energia**. 2011. 120f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) – Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, 2011.

GRIMA, E. M.; FERNANDEZ, F. G. A.; CAMACHO, F. G.; CHISTI, Y. Photobioreactors: light regime, mass transfer and scale up. **Journal of Biotechnology**, v.70, p. 231-247, 1999.

GUIMARÃES, J., AMARAL, R., SANTOS, M.F., SANTOS, L.M.A. **Colheita, identificação e conservação de microalgas**. Coimbra: ACOI, Algoteca do Departamento de Botânica Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 2009.

HACH. **DR/4000 U Spectrophotometer**. Disponível em: < <http://www.hach.com/dr-4000-u-spectrophotometer-115-vac/product?id=7640447364>>. Acesso em: 10 fev. 2014.

HARRIS, G.P. **Phytoplankton Ecology**. Nova Iorque: Chapman & Hall, 1988.

HOEK, C.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. **Algae: an introduction to phycology**. Cambridge: Cambridge University, 623 p., 1995.

HOFFMAN, J.P. Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae. **J. Phycol.**, v. 34, p. 757–763, 1998.

HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X.; CHEN, G. Biodiesel Production by Microalgal. Biotechnology. **Applied Energy**, v. 87, n. 1, p. 38-46, 2010.

ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in Chlorella strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme and Microbial Technology**. Bristol, v. 27, n. 8, p. 631–635, nov. 2000.

JARDINE, J. G.; DISPATO, I.; PERES, M. R. Considerações sobre biodiesel como biocombustível alternativo ao diesel. **Documentos / Embrapa Informática Agropecuária**. Campinas, v. 93, n. 1, p. 25, 2009.

KARGI, F.; UYGUR, A. Effect of carbon source on biological nutrient removal in a sequencing batch reactor. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 89, n.3., p. 89-93, set. 2003.

KHAN, S. A.; RASHMI, A.; HUSSAIN, M. Z.; PRASAD, S.; BANERJEE, U.C. Prospects of biodiesel production from microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, p. 2361-2372, 2009.

KIM, S. B.; KIM, C. K.; KWON, C. K.; YOON, B. D.; OH, H. M. Selection of microalgae for advanced treatment of swine wastewater and optimization of treatment condition. **Korean Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 76-82, 1998.

KIRST, G. Ion composition of unicellular marine and freshwater algae, with special reference to *Platymonas subcordiformis* cultivated in media with different osmotic strengths. **Oecologia**, v. 28, p. 177-189, 1977.

KLOK, A. **Optimization of lipid production in microalgae**. Wageningen: Wageningen University, 2010.

KOTZABASIS, K., HATZIATHANASIOU A., BENGGOA-RUIGOMEZ M. U., KENTOURI M., DIVANACH P. Methanol as alternative carbon source for quicker efficient production of the microalgae *Chlorella minutissima*: Role of

the concentration and frequency of administration. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p.357-362, 1999.

KUCEK, K. T. **Otimização da transesterificação etílica do óleo de soja em meio alcalino**. 2004. 123f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

KULL, A. **Physiology and Biochemistry of Algae**. p. 211-229. Nova Iorque: Lewin. Academic Press, 1962.

LAING, I. **Cultivation of marine unicellular algae**. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Directorate of fisheries research. 31f. n. 67. Lowestoft: Laboratory leaflet, 1991.

LAVENS, P.; SORGELOOS, P. Manual on the production and use of live food for aquaculture. **FAO Fisheries Technical Paper**. Roma, n. 361, 295 p.,1996.

LEE, K.; LEE, C.G. Effect of light/dark cycles on wastewater treatments by microalgae. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.6. n.6., p. 194-199, nov. 2001.

LIMA, M; LIGO, M. A. V.; CARVALHO, E. C. C.; PESSOA, M. C. P. Y. **Emissão de gases de efeito estufa provenientes da queima de resíduos agrícolas no Brasil**. EMBRAPA Meio Ambiente, Jaguariúna ,1999.

LIU, B. H.; ZHANG, D. H.; LEE, Y. K. Effects of nutrients levels on cell growth and secondary carotenoids formation in the freshwater green alga *Chlorococcum sp.* **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.10., p. 201-207, 2000.

LOPES, E. J. **Seqüestro de dióxido de carbono em fotobiorreatores**. 2007. Tese (Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química-Mestrado e Doutorado) – Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

MACHADO, B. J. F. **Reuso de efluentes em torres de resfriamento – estudo de caso: Aeroporto Internacional do Rio de Janeiro**. 2005. 106 p. Dissertacao (Mestrado) – Programa de Pos-Graduacao em Tecnologia de Processos Quimicos e Bioquimicos, 2005. Rio de Janeiro.

MARKOV, S. A.; WEAVER, P. F.; SEIBERT, M. Spiral tubular bioreactor for hydrogen production by photosynthetic microorganisms: Design and operation. **Applied. Biochemistry and Biotechnology**, v. 63-65., p. 577-584, 1997.

MARTINEZ, M.E.; CASTILLO, J.M.; YOUSFI, E.F. Photoautotrophic consumption of phosphorus by *Scenedesmus obliquus* in a continuous culture. Influence of light intensity. **Process Biochemistry**, v. 34, p.811-818, 1999.

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

MATLAB, versão 7.10.0 (R2010a).

MCCORMICK, A. J.; BOMBELLI, P.; SCOTT, A.M.; PHILIPS, A. J.; SMITH, A. G.; FISHER, A. C.; Photosynthetic biofilms in pure culture harness solar energy in a mediatorless bio-photovoltaic cell (BPV) system. **Energy & Environmental Science**, v. 4,p. 4699-4709, 2011.

MICROSOFT® Office Excel 2010.

MOLINA, G. E.; MEDINA, R. A.; GIMÉNEZ, G. A. Recovery of algal PUFAs. In: Cohen, Z. **Chemicals from microalgae**, Londres: Taylor & Francis, 1999.

MORRIS, I. Nitrogen assimilation and protein synthesis. In: W. D. P. Stewart (Ed.), **Algal Physiology and Biochemistry**. California: University of California Press, 583-610, 1974.

MUÑOZ, R.T. **Algal-bacterial photobioreactors for the degradation of toxic organic pollutants**. 2005. Dissertação (Doutorado) – Lund University, Suécia, 2005.

NURDOGAN, Y.; OSWALD, W.J. Enhanced nutrient removal in high rate ponds. **Water Science Technology**, n. 31. p. 31-43, 1995.

OBAJA, D.; MACÉ, S.; MATA-ALVAREZ, J. Biological nutrient removal by a sequencing batch reactor (SBR) using an internal organic carbon source in digested piggery wastewater. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 96, n. 9., p. 7-14, jun. 2005.

OLGUÍN, E. J.; GALICIA, S.; MERCADO, G.; PEREZ, T. Annual productivity of *Spirulina* (Arthrospira) and nutrient removal in a pig wastewater recycle process under tropical conditions. **Journal of Applied Phycology**, v. 15, p. 249-257, 2003.

OSHE, S.; DERNER, R. B.; OZÓRIO, R. A.; BRAGA, M. V. C.; CUNHA, P.; LAMARCA, C. P.; SANTOS, M. E. MENDES, L. B. B. Revisão: sequestro de carbono realizado por microalgas e florestas e a capacidade de produção de lipídios pelas microalgas. **Insula**, Florianópolis, n. 36, p. 39–73, 2007.

OSHE, S.; DERNER, R. B.; OZÓRIO, R. A.; BRAGA, M. V. C.; CUNHA, P.; LAMARCA, C. P.; SANTOS, M. E. Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário. **Biotemas**, v. 21, n.2, jun. 2008.

OSWALD, W.J.; GOTAAS, H.B. Photosynthesis in sewage treatment. **Transactions of the American Society of Civil Engineers**, v. 122, p. 73-105. 1957.

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

PEREIRA, C. M. P.; HOBBUS, C. B.; MACIEL, J. V.; FERREIRA, L. R.; DEL PINO, F. B.; MESKO, M. F; JACOB-LOPES, E.; NETO, P. C. Biodiesel renovável derivado de microalgas: avanços e perspectivas tecnológicas. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 2013-2018, 2012.

PÉREZ, HOMERO E. B. **Biodiesel de Microalgas**, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, 1-19, 2007.

PINDICH, R.; RUBENFELD, D. **Econometric models and economic forecasts**. 2.ed. p.475-492. Nova Iorque: Mc Graw-Hill, 1981.

RAI, L. C.; KUMAR, H. D.; MOHN, F. H.; SOEDER, C. J. Services of algae to the environment. **Journal of Microbiology and Biotechnoly**,v.10., p. 119-136, 2000.

POWELL, N.; SHILTON, A. N.; PRATT, S.; CHISTI, Y.; **Factors Infuencing Luxury Uptake of Phosphorus by Microalgae in Waste Stabilization Ponds**. **Environ. Sci. Technol.**, v. 42, p. 5958-5962, 2008.

RACAULT, Y.; BOUTIN, C. Waste stabilization ponds in France: state of the art and recent trends. **Water Science Technology**. n. 12. p. 1-9, 2005.

RATKOWSKY, A. D.; LOWRY, R. K.; MCMEEKIN, T. A.; STOKES, A. N.; CHANDLER, R. E. Model for bacteria culture growth rate throughout the entire biokinetic range. **Journal of Bacteriology**, n. 154, p. 1222-1226, 1983.

RICHMOND, A. Basic culturing techniques & downstream processing of cell-mass and products. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**, 1. ed., Oxford, Ed. Blackwell Science Ltd., 2004, p. 40-55.

RICHMOND, A.; QIANG, H. **Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology**. 2. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2013.

RUSSO, D. A. M. T. **Estudo do crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* numa água residual tratada, sob diferentes condições de fotoperíodo e temperatura**. 2011. 111f. Dissertação (Mestrado em Energia e Bioenergia) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2011.

SALIMURY, F. F.; ROSS, C. W. **Plant physiology**. 3.ed. Belmont: Wadsworth Pub. Co, 1985.

SANCHO, M. E.; JIMENEZ CASTILHO, J. M.; YOUSFI, F. Influence of phosphorus concentration on the growth kinetics and stoichiometry of the microalgae *Scenedesmus obliquus*. **Process Biochemistry**, v. 32, p. 657-664, 1997.

SCHENK, P. M.; THOMAS-HALL, S. R.; STEPHENS, E.; MARX, U. C.; MUSSGNUG, J. H.; POSTEN, C.; KRUSE, O.; HANKAMER, B. Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. **Bioenergy Research**., v.1., p.20-43, 2008.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Brazil, v.9, n.1, p.199-210, mai. 1997.

SHAW, B.; MENCHENICH, C.; KLESSIG, LOWELL. **Understanding lake data**. (G3582). RP-03. 2004. Disponível em: <<http://www3.uwsp.edu/cnr-ap/weal/Documents/G3582.pdf>>. Acesso em: 1 fev. 2014.

SIGMA-ALDRICH. **Bright-Line™ Hemacytometer**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/z359629?lang=en®ion=US>>. Acesso em: 10 jan. 2014.

SOARES, Diniara. **Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo**. 2010. 107 f. Tese (Curso de Pós-Graduação em Ciências: Bioquímica – Mestrado e Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. v. 1. Trad. R.M. Matos e D.S. Raslan. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.

SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. [s.l.], v. 101, n. 2, p. 87–96, fev. 2006.

SUH, I. S.; LEE, C.G. Photobioreactor Engineering: Design and Performance. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 8, p. 313-321, 2003.

TAVARES, S.; ROCHA, O. **Produção de plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos**. 106p. Rima, São Carlos, 2003.

TOMASELLI, L., The microalgal cell. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**, 1. ed., Oxford, Ed. Blackwell Science Ltd., 2004, p. 2- 19.

THOMPSON, P.A.; GUO, M.; HARRISON P.J. Effects of temperature on the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton. **Journal of Phycology**, v. 28, p. 481–88, 1992.

TRAVIESCO, L.; BENITEZ, F.; SANCHEZ, E.; BORJA, R.; LEON, M.; RAPOSO, F.; RINCON, B. Assesment of a microalgae pond for post-treatment of the effluent from an anaerobic fixed bed reactor treating distillery wastewater. **Environmental Technology**, v. 29, p. 985-992, 2008.

UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS DARTMOUTH. **UMass Dartmouth Advanced Technology & Manufacturing Center (ATMC) Welcomes Boston 3T Biotechnologies**. 2014. Disponível em: <http://www1.umassd.edu/communications/articles/showarticles.cfm?a_key=3260>. Acesso em: 25 jan. 2014.

VONSHAK, A., **Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor & Francis, 2003.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 3. ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFMG, 2005. 240 p. (Princípios do tratamento biológico de águas residuárias, v. 1).

WROLSTAD, R. E., ACREE, T.E.; AN, H.; DECKER, E. A.; PENNER, M. H. **Current Protocols o in Food Analytical Chemistry**. 1. ed. John Wiley and Sons: Nova York, 2001.