

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**ALEJANDRA ORTIZ RICO**

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE MICROALGAS EM  
SISTEMA BIOLÓGICO DE TRATAMENTO DE GASES DE UMA  
CHURRASCARIA**

**DISSERTAÇÃO**

**CURITIBA  
2014**

**ALEJANDRA ORTIZ RICO**

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE MICROALGAS EM  
SISTEMA BIOLÓGICO DE TRATAMENTO DE GASES DE UMA  
CHURRASCARIA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais, do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná– Câmpus Curitiba.

Orientador: Dr. Thomaz Aurélio Pagioro  
Coorientadora: Dra. Marlene Soares

CURITIBA  
2014

---

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

---

- O77o Ortiz Rico, Alejandra  
Otimização da produção de biomassa de microalgas em sistema biológico de tratamento de gases de uma churrascaria / Alejandra Ortiz Rico. – 2014.  
115 f. : il. ; 30 cm
- Orientador: Thomaz Aurélio Pagioro .  
Coorientador: Marlene Soares.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Curitiba, 2014.  
Bibliografia: f. 99-110
1. Microalgas. 2. Biomassa-produção. 3. Gases residuais. 4. Biotecnologia. 5. Churrascaria – tratamento biológico. 6. Tecnologia ambiental – Dissertações. I. Pagioro, Thomaz Aurélio, orient. II. Soares, Marlene, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia e Ambiental. IV. Título.

CDD (22. ed.) 363.7

## TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação nº 28

Otimização da produção de biomassa de microalgas em sistema biológico de tratamento de gases de uma churrascaria

por

Alejandra Ortiz Rico

Dissertação apresentada às 13h30min do dia 26 de fevereiro de 2014, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS, na área de concentração Tecnologias e Processos Ambientais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Curitiba. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

### Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Thomaz Aurélio Pagioro (Orientador)  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -UTFPR-

---

Profa. Dra. Adriane Martins de Freitas  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -UTFPR-

---

Profa. Dra. Susicley Jati  
Universidade Estadual de Maringá -UEM-

Visto da Coordenação:

---

Prof. Dr. Thomaz Aurélio Pagioro  
Coordenador do PPGCTA

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa”

*À memória de Saúl Ortiz Correa e Leonel Muñoz Vargas, homens guerreiros até o último dia das suas vidas... sinto e levarei vocês comigo sempre*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte inesgotável de amor e de força

À minha mãe Leonor, meus pais, Saul e Leonel, pelos ensinamentos, dedicação, compreensão, trabalho árduo e renúncia e aos meus irmãos Luisa María e Andrés Felipe, pelo seu amor que enche a minha vida de felicidade.

À Família Echeverri Vélez pelo imenso carinho e apoio, especialmente ao meu amor Sergio, por ser um verdadeiro parceiro de vida, pelo seu amor desmedido, sua companhia em momentos tristes, felizes, de dúvida e por nunca me permitir desistir frente às provas difíceis da vida.

Aos meus colegas do Mestrado em Tecnologia Ambiental, em especial a minha parceira de luta e grande amiga Janaíne Mioduski que com seu apoio, em momentos de cansaço me ajudou a concluir com sucesso esta etapa da minha vida.

À Professora Dra. Marlene Soares por o seu apoio constante e oportuno, seus ensinamentos, carinho, dedicação, orientação e acompanhamento nessa difícil tarefa de fazer pesquisa. Você mora no meu coração!

À UTFPR especificamente ao programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental (PPGCTA) pela oportunidade da realização do mestrado.

Ao Professor Dr. Thomaz Aurélio Pagioro, por ter acreditado em mim, por seu apoio em momentos difíceis, orientação e paciência ao longo desta jornada árdua de trabalho.

Aos profissionais do Laboratório de Químico/Biotecnologia de biomassa, ao Professor Dr. Jose Domingos Fontana, Dra. Adelia Grzybowski e Msc. Marcela Tiboni, pela incalculável ajuda com a caracterização bioquímica das microalgas, análise estatística dos dados, contribuição a esta pesquisa e pela amizade.

À Churrascaria Devon's, especialmente ao seu proprietário Augusto Celestino Farfuf dos Santos, pela confiança, disponibilização de instalações e recursos para a realização deste trabalho.

Ao Centro de Energia (CEN) do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), especialmente aos pesquisadores Msc. Anderson Cardoso Sakuma, Msc. Leandro Andrade Pegoraro e Tobias Carlos Almeida pela confiança, ajuda e tempo disponibilizado, para a realização deste trabalho. Igualmente, aos estagiários, Ana Carolina Rauzes, Leonardo Kozak Michelin, Debora Biasi, William Pederiva que estiveram prestes a ajudar.

Ao Professor Dr. Júlio Cezar Rodriguez Azevedo, por toda a sua colaboração antes e durante a realização do mestrado, você ajudou a tornar esse meu sonho possível.

Agradeço-lhe também por toda a sua boa vontade, disponibilização de equipamentos e contribuições ao longo da pesquisa, ficarei eternamente agradecida.

Ao Professor Dr. Marcelo Real Prado, que me apresentou e foi mentor deste lindo projeto, pelo qual me apaixonei.

Ao Laboratório de Estudos avançados em Química Ambiental especialmente às pesquisadoras Msc. Alessandra Honjo Ide e Msc. Luana Oliveira Marcante por toda a paciência, colaboração e por sempre estarem dispostas a ajudar.

A toda equipe do laboratório de Microbiologia e Toxicologia do TECPAR em especial a Msc. Izabel Cristina Figel e à Vera José.

Ao Professor Dr. Pedro Ramos e à empresa Similar S.A por participar na pesquisa na realização, análise, caracterização e quantificação dos gases.

Ao laboratório de Alimentos e medicamentos do TECPAR pela quantificação de proteica da biomassa, especialmente a Israel Mendes, Lilian Kisielewicz e a Carolina Kowalski.

À CAPES pelo apoio financeiro proporcionado através da concessão da bolsa de estudo.

A todas as pessoas que não citei aqui, mas que de uma ou outra forma contribuíram com o desenvolvimento e conclusão desse trabalho.

*“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos” Paulo Belekí.*



## RESUMO

RICO, Alejandra. **Otimização da produção de biomassa de microalgas em sistema biológico de tratamento de gases de uma churrascaria** 2014.115f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Área de concentração Tecnologias e Processos Ambientais. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2014.

As microalgas são organismos com grande versatilidade metabólica, capazes de utilizar fontes de carbono orgânicas, como a glicose, e inorgânicas, como o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ). Este pode ser fixado pelas microalgas a partir da atmosfera, de carbonatos solúveis na água ou de efluentes industriais quando acoplados em um sistema de tratamento. A pesquisa desenvolveu-se na Churrascaria Devon's onde por um sistema biológico de tratamento com microalgas, as emissões gasosas e voláteis das grelhas assadoras são parcialmente tratadas. O objetivo deste trabalho foi otimizar a produção de biomassa de dois inóculos de microalgas (*Desmodesmus subspicatus* e mescla Devon's), em sistemas abertos (caixas) e fechados de cultivo (Fotobioreatores Tipo Painel). Para monitorar o crescimento das microalgas o método de quantificação celular foi padronizado pela correlação de Pearson ( $R^2$ ) entre absorvância (682nm), clorofila-a ( $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) e peso seco ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Adicionalmente foram calculados os parâmetros, velocidade máxima específica de crescimento ( $\mu_{\text{max}}$ ), produtividade máxima de biomassa ( $P_{\text{max}}$ ) e densidade celular máxima (DCM) dos cultivos. Usando as duas biomassas dos cultivos otimizados foram feitas as análises de composição bioquímica de lipídios, carboidratos e proteínas. Os resultados indicaram que no sistema aberto a fumaça foi a variável mais significativa na produção de biomassa, seguida da adição do meio CHU e do tipo de inóculo. *D. subspicatus* em regime fechado apresentou ao final de 21 dias de cultivo  $1,63 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de biomassa seca ( $733,32 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$  de Chl-a), valor cerca de seis vezes maior do que em cultivo aberto. O mesmo foi observado com a Mescla Devon's que no mesmo período apresentou  $1,27 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de biomassa seca ( $690 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$  de Chl-a) no sistema fechado, valor cerca de três vezes maior do que em sistema aberto. Com os dados de alcalinidade e pH foi possível relacionar que o bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) foi a forma de carbono inorgânica predominante ao longo do cultivo. A centrifugação mostrou ser um método eficiente de recuperação celular para ambas as microalgas, sendo que o tempo de centrifugação foi a variável mais significativa para *D. subspicatus* e a velocidade (rotações por minuto) para a mescla Devon's. A quantificação bioquímica mostrou que a microalga *D. subspicatus* apresentou teor de lipídios de 16,77%, de carboidratos totais de 28,17% e de proteínas totais de 35,3%. Já a mescla Devon's, apresentou teor de lipídios totais de 23,23%, de carboidratos de 27,60% e de proteínas totais de 31,9%, sobre o total de biomassa seca. Esses resultados ressaltam a possível utilização da biomassa de microalgas cultivadas em sistemas de tratamento de gases de efeito estufa, tanto no setor alimentar, cosmético como energético.

**Palavras Chave:** *Desmodesmus subspicatus*. Fotobioreator. Emissões gasosas de churrascaria. Tratamento Biológico de gases.

## ABSTRACT

RICO, Alejandra. **Optimization of the production of microalgae biomass in biological treatment system of a barbecue restaurant.** 2014.115f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Área de concentração Tecnologias e Processos Ambientais. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2014.

Microalgae are organisms with high metabolic versatility, capable to use organic carbon sources such as glucose or inorganic carbon sources, such as carbon dioxide (CO<sub>2</sub>). This can be fixed by microalgae from the atmosphere, from soluble carbonates dissolved on the water or from industrial effluents when coupled to treatment system. The research developed in a barbecue restaurant Churrascaria Devon's where using a biological treatment system with microalgae, gaseous and volatile emissions are partially treated. The aim of this study was to optimize biomass production of microalgae from two different inoculums (*Desmodesmus subspicatus* and Devon's mix) in open (boxes) and closed (Panel Photobioreactor) cultivation systems. To monitor the growth of microalgae, the quantification cellular method was standardized by correlation (R<sub>2</sub>) between absorbance (682nm) Chlorophyll a (mg.m<sup>-3</sup>) and dry weight (g.L<sup>-1</sup>). Additionally were calculated some parameters as, maximum specific growth rate (μ<sub>max</sub>), maximum biomass productivity (P<sub>max</sub>) and maximum cellular density (MCD) of the cultures. Biochemical analyses for lipids, carbohydrates and proteins were performed in both biomasses from optimized cultivations. The results indicated that in the open system the smoke was the most significant variable in the production of biomass, followed by addition of medium CHU and inoculum type. The *D. Subspicatus* in a closed system shows the in the end of 21 days of cultivation was 1, 63 g.L<sup>-1</sup> of dry biomass (733, 32 mg.m<sup>-3</sup> Chl-a) six times above if compared with cultivation open systems. The same was observed with the Devon's mix, that during the same time shows 1, 27 g.L<sup>-1</sup> of dry biomass (690 mg.m<sup>-3</sup> Chl -a) in the closed system, a value three times larger than in an open system. With the alkalinity and pH values was possible to confirm that, the bicarbonate (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) was the predominant form of inorganic carbon during the cultivation. Centrifugation was an efficient method of cell recovery from both microalgae cultures; the centrifugation time was the most significant variable for *S. Scenedesmus* and the rotations per minute to Devon's mix. The biochemical quantification showed for the *S. Scenedesmus* microalgae 16,77 % of lipid content, 28,17% of total carbohydrates and total protein of 35,3 %. To the Devon's mix, the total lipid content was 23,23 %, carbohydrates of 27,60% and total protein of 31,9 %, on total dry biomass. These results showed the possibility of using biomass of microalgae from treatment of greenhouse gases systems.in the food, cosmetic and energy industry.

**Keywords:** *Desmodesmus subspicatus*. Photobioreator. Gaseous emissions from barbecue restaurant .Biological Treatment of gases.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DA FOTOSSÍNTESE REALIZADA PELAS MICROALGAS VERDES.....	19
FIGURA 2-EXEMPLOS DE SISTEMAS ABERTOS DE CULTIVO DE MICROALGAS.....	23
FIGURA 3- EXEMPLOS DE SISTEMA FECHADO DE CULTIVO A: FOTOBIOREATOR VERTICAL TUBULAR /B: FOTOBIOREATOR HORIZONTAL TUBULAR C: FOTOBIOREATOR PLANO (PVC) .....	25
FIGURA 4-ESQUEMA DE UM SISTEMA HIBRIDO DE CULTIVO DE MICROALGAS .....	27
FIGURA 5- SISTEMA ABERTO E FECHADO PARA O TRATAMENTO E APROVEITAMENTO DE FUMAÇA NA CHURRASCARIA DEVON'S UTILIZANDO MICROALGAS .....	40
FIGURA 6 - SISTEMA ABERTO DE CULTIVO (CAIXAS) .....	41
FIGURA 7 - SISTEMA FECHADO DE CULTIVO EM FOTOBIOREATOR (TIPO PAINEL) .....	42
FIGURA 8- <i>DESMODESMUS SUBSPICATUS</i> .....	43
FIGURA 9- MESCLA DEVON'S.....	44
FIGURA 10- ACOMPANHAMENTO DA CONCENTRAÇÃO DO O <sub>2</sub> (MG.L <sup>-1</sup> ) NO ESTUDO 1 NO SISTEMA ABERTO DE CULTIVO (CAIXAS) PARA A MESCLA DEVON'S.....	60
FIGURA 11- ACOMPANHAMENTO DA CONCENTRAÇÃO DO O <sub>2</sub> (MG.L <sup>-1</sup> ) NO ESTUDO 1 NO SISTEMA ABERTO DE CULTIVO (CAIXAS) PARA <i>DESMODESMUS SUBSPICATUS</i> .....	60
FIGURA 12- ACOMPANHAMENTO DO PH NAS CULTURAS DA M. DEVON'S EM SISTEMA ABERTO (CAIXAS) DURANTE A REALIZAÇÃO DO ESTUDO 1.....	61
FIGURA 13- ACOMPANHAMENTO DO PH NAS CULTURAS DE <i>D. SUBSPICATUS</i> EM SISTEMA ABERTO (CAIXAS) DURANTE A REALIZAÇÃO DO ESTUDO 1.....	62
FIGURA 14-CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE NITRATO E ORTOFOSFATO (MG.L <sup>-1</sup> ) COM A CHL-A (MG.M <sup>-3</sup> ) PARA <i>D. SUBSPICATUS</i> + FUMAÇA DURANTE O ESTUDO 1 NO SISTEMA ABERTO DE CULTIVO .....	63
FIGURA 15- DENSIDADE CELULAR MÁXIMA EXPRESSA EM CHL-A (MG.M <sup>-3</sup> ) OBSERVADO NO SISTEMA ABERTO DE CULTIVO DURANTE O ESTUDO 1.....	65
FIGURA 16- DENSIDADE CELULAR MÁXIMA EXPRESSA EM PESO SECO (G.L <sup>-1</sup> ) OBSERVADO NO SISTEMA ABERTO DE CULTIVO DURANTE O ESTUDO 1.....	66
FIGURA 17-GRÁFICO DE PARETO PARA O EFEITO DA FUMAÇA, ADIÇÃO DE MEIO DE CULTIVO E INOCULO SOBRE A PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM SISTEMA ABERTO DE CULTIVO .....	68

FIGURA 18 - MÉDIAS DA BIOMASSA EM $P_{MAX}$ (CHL-A) EM FUNÇÃO DO MEIO DE CULTIVO, FUMAÇA E MICROALGA.....	70
FIGURA 19-COMPARAÇÃO DCM (SISTEMA ABERTO) VS (SISTEMA FECHADO) EM PESO SECO ( $G.L^{-1}$ ) PARA <i>D. SUBSPICATUS</i> E M. DEVON'S .....	74
FIGURA 20-GRÁFICO DE PARETO PARA AVALIAÇÃO DE EFEITO DA CONFIGURAÇÃO ESTRUTURAL DO SISTEMA NA PRODUÇÃO MÁXIMA DE BIOMASSA.....	77
FIGURA 21- VALORES PREVISTOS DO MODELO LINEAR VERSUS VALORES OBSERVADOS NO ESTUDO 2. ....	78
FIGURA 22-GRÁFICO DE MÉDIAS PARA A CONFIGURAÇÃO ESTRUTURAL DO SISTEMA PARA <i>D. SUBSPICATUS</i> E M. DEVON'S .....	78
FIGURA 23-CONCENTRAÇÃO DE $CO_3$ NO SISTEMA FECHADO DE CULTIVO...	80
FIGURA 24-CONCENTRAÇÃO DE $CO_2$ NO SISTEMA FECHADO DE CULTIVO...	80
FIGURA 25-CONCENTRAÇÃO DE $HCO_3$ NO SISTEMA FECHADO DE CULTIVO	80
FIGURA 26- REMOÇÃO DE CO E $CO_2$ NO FOTOBIOREATOR 1 ( <i>D. SUBSPICATUS</i> ).....	81
FIGURA 27- REMOÇÃO DE CO E $CO_2$ NO FOTOBIOREATOR 2 (MESCLA DEVON'S) .....	81
FIGURA 28- GRÁFICO DE PARETO PARA A RECUPERAÇÃO CELULAR POR CENTRIFUGAÇÃO DE <i>D. SUBSPICATUS</i> E M. DEVON'S. ....	84
FIGURA 29- GRÁFICO DE MÉDIAS PARA <i>D. SUBSPICATUS</i> E M. DEVON'S PARA A OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE RECUPERAÇÃO CELULAR (CENTRIFUGAÇÃO) .....	84
FIGURA 30- CONDIÇÕES ÓTIMAS DE RECUPERAÇÃO CELULAR PARA <i>D. SUBSPICATUS</i> E M. DEVON'S AVALIADAS EM UM MENOR NÚMERO DE CÉLULAS NO SOBRENADANTE. ....	85
FIGURA 31-CCD COM O PERFIL DOS LIPÍDIOS DA BIOMASSA DAS MICROALGAS <i>D. SUBSPICATUS</i> E MESCLA DEVON'S.....	89
FIGURA 32-PERFIL DENSITOMETRICO DA CCD DE LIPÍDIOS DA BIOMASSA DAS MICROALGAS <i>D. SUBSPICATUS</i> E MESCLA DEVON' .....	90
FIGURA 33-CCD COM O PERFIL DOS CARBOIDRATOS HIDROLISADOS COM TFA 2M DA BIOMASSA DAS MICROALGAS <i>D. SUBSPICATUS</i> E MESCLA DEVON'S .....	92
FIGURA 34-CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE O LOG (1-RF/RF) VERSUS O GRAU DE POLIMERIZAÇÃO DA SÉRIE HOMÓLOGA DE OLIGOSSACARÍDEOS DE GLUCOSE E A DENSITOMETRIA DA CCD	93

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1- COMPOSIÇÃO GERAL (% DE MATÉRIA SECA) DE DIFERENTES ALGAS E OS VALORES DE COMPARAÇÃO COM AS FONTES TRADICIONAIS DE ALIMENTOS .....	32
TABELA 2- COMPOSIÇÃO DOS GASES INORGÂNICOS PRESENTES NA FUMAÇA DA CHAMINÉ DA CHURRASCARIA DEVON'S .....	39
TABELA 3- COMPOSIÇÃO DE MEIO CHU .....	44
TABELA 4- CARACTERIZAÇÃO DA ÁGUA USADA NO EXPERIMENTO.....	45
TABELA 5-PLANEJAMENTO FATORIAL 2 <sup>3</sup> PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FUMAÇA, ADIÇÃO DE MEIO CHU E INÓCULO NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA.....	50
TABELA 6 - MATRIZ PADRÃO PARA O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2 <sup>3</sup> DO ESTUDO 1 .....	50
TABELA 7- PLANEJAMENTO FATORIAL 2 <sup>2</sup> PARA AVALIAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO ESTRUTURAL DO SISTEMA NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA.....	51
TABELA 8 – MATRIZ PADRÃO PARA O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2 <sup>2</sup> DO ESTUDO 2 .....	51
TABELA 9-PLANEJAMENTO FATORIAL 3 <sup>2</sup> PARA AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE RECUPERAÇÃO DE BIOMASSA PARA <i>D. SUBSPICATUS</i> E MESCLA DEVON'S. ....	53
TABELA 10- MATRIZ PADRÃO PARA O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 3 <sup>2</sup> PARA <i>D. SUBSPICATUS</i> E M. DEVON'S DO ESTUDO 4 .....	53
TABELA 11-COEFICIENTES DE DETERMINAÇÃO (R <sup>2</sup> ) PESO SECO E CLOROFILA-A VS ABSORBÂNCIA (682NM) .....	58
TABELA 12 – RESULTADOS DA $\mu_{MAX}$ E P <sub>MAX</sub> EM PESO SECO E CLOROFILA-A.	67
TABELA 13 – ANOVA DA P <sub>MAX</sub> (CLOROFILA-A) PARA A AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA FUMAÇA, MEIO DE CULTIVO E MICROALGA.....	68
TABELA 14-COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (R <sup>2</sup> ) PARA PESO SECO (G.L-1) E CLOROFILA-A(MG.M <sup>-3</sup> ) VS ABSORBÂNCIA (682NM)NOS SISTEMAS FECHADO E ABERTO DE CULTIVO .....	71
TABELA 15-VARIAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICOS NO SISTEMA FECHADO PARA <i>D. SUBSPICATUS</i> .....	72
TABELA 16-VARIAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICOS NO SISTEMA FECHADO PARA M. DEVON'S.....	72
TABELA 17-VARIAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICOS NO SISTEMA ABERTO PARA M. DEVON'S.....	73
TABELA 18-VARIAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICOS NO SISTEMA ABERTO PARA <i>D. SUBSPICATUS</i> .....	73
TABELA 19- P <sub>MAX</sub> (CHL-A/PESO SECO) E $\mu_{MAX}$ PARA OS SISTEMAS ABERTO E FECHADO DE CULTIVO .....	75
TABELA 20-ANOVA DA P <sub>MAX</sub> (CLOROFILA-A) PARA A AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE CONFIGURAÇÃO ESTRUTURAL DO SISTEMA .....	76
TABELA 21- RESULTADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 3 <sup>2</sup> E MÉDIA DAS LEITURAS DE CÉLULAS POR MILILITRO DE SOBRENADANTE .....	82

TABELA 22-ANOVA CÉLULAS DE <i>D. SUBSPICATUS</i> .ML <sup>-1</sup> DE SOBRENADANTE PARA A AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TEMPO E VELOCIDADE DE ROTAÇÃO NA RECUPERAÇÃO DE BIOMASSA.....	83
TABELA 23-ANOVA CÉLULAS DA MESCLA DEVON'S/ML DE SOBRENADANTE PARA A AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TEMPO E VELOCIDADE DE ROTAÇÃO NA RECUPERAÇÃO DE BIOMASSA.....	83
TABELA 24-QUANTIFICAÇÃO DE LIPÍDIOS PARA <i>D. SUBSPICATUS</i> E MESCLA DEVON'S .....	87
TABELA 25-QUANTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS PARA <i>D. SUBSPICATUS</i> E MESCLA DEVON'S .....	91
TABELA 26- QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS PARA <i>D. SUBSPICATUS</i> E MESCLA DEVON'S .....	93

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$\mu_{\max}$	Velocidade Máxima específica de Crescimento.
$P_{\max}$	Produtividade máxima
DCM	Densidade celular máxima
Chl-a	Clorofila-a
PS	Peso Seco
D. subspicatus	<i>Desmodesmus subspicatus</i>
M. Devon's	Mescla de espécies de microalgas da Devon's
O <sub>2</sub>	Oxigênio
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CO	Monóxido de Carbono
SO <sub>x</sub>	Óxidos de enxofre
NO <sub>x</sub>	Óxidos de Nitrogênio
H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Ácido Carbônico
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bicarbonato
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Carbonato
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
PBR	Fotobioreator
RPM	Rotações por minuto
Abs.	Absorbância
HCl	Ácido Clorídrico
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
TECPAR	Instituto de Tecnologia do Paraná

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>3</b>	<b>CONTEXTUALIZAÇÃO DO ASSUNTO</b> .....	<b>18</b>
3.1	MICROALGAS .....	18
3.1.1	Características Metabólicas .....	19
3.1.2	Fatores que Afetam o Crescimento Celular .....	20
3.2	SISTEMAS DE PRODUÇÃO MASSIVA DE MICROALGAS .....	22
3.2.1	Sistemas Abertos .....	23
3.2.2	Sistemas Fechados .....	24
3.2.3	Sistemas Híbridos .....	26
3.3	VANTAGENS E IMPORTÂNCIA DO CULTIVO .....	27
3.3.1	Biomitigação de Emissões de CO <sub>2</sub> .....	28
3.4	COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA CELULAR .....	29
3.4.1	Lipídios .....	30
3.4.2	Proteínas .....	31
3.4.3	Carboidratos .....	33
3.5	TECNOLOGIAS DE RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA .....	34
3.5.1	Floculação e Flotação .....	35
3.5.2	Centrifugação e Sedimentação .....	35
3.5.3	Filtração .....	36
3.6	TECNOLOGIAS DE PURIFICAÇÃO E EXTRAÇÃO DE BIOMASSA .....	37
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
4.1	DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTUDO .....	39
4.1.1	Sistema Aberto de Cultivo .....	41
4.1.2	Sistema Fechado de Cultivo .....	41
4.2	MICROALGAS .....	42
4.2.1	<i>Desmodesmus subspicatus</i> , R (R. Chodat) E. Hegewald; A. Schmidt. ....	42
4.2.2	Mescla Devon's .....	44
4.2.3	Caracterização do Meio de cultivo e da Água .....	44
4.3	METODOLOGIAS ANALÍTICAS .....	45
4.3.1	Monitoramento do Crescimento Celular .....	45
4.3.2	Determinação dos Parâmetros Cinéticos de Crescimento .....	48
4.3.3	Avaliação dos Parâmetros de Produtividade de Biomassa .....	48
4.4	ESTUDO 1: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FUMAÇA, ADIÇÃO DE MEIO DE CULTIVO E TIPO DE INÓCULO NO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE BIOMASSA .....	49
4.4.1	Monitoramento das Variações Físicas e Químicas do Cultivo .....	49
4.4.2	Delineamento Experimental .....	50
4.4.3	Análise Estatística dos dados .....	50
4.5	ESTUDO 2: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CONFIGURAÇÃO ESTRUTURAL DO SISTEMA NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA .....	51



4.5.1	Delineamento Experimental.....	51
4.6	ESTUDO 3: ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DO SISTEMA FECHADO NA REMOÇÃO DE CARBONO .....	51
4.7	ESTUDO 4: OTIMIZAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA POR CENTRIFUGAÇÃO.....	52
4.7.1	Delineamento experimental.....	53
4.8	ESTUDO 5: CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS MICROALGAS.....	53
4.8.1	Obtenção da biomassa liofilizada .....	53
4.8.2	Extração e Caracterização de Lipídios Totais .....	54
4.8.3	Determinação de Carboidratos Totais .....	55
4.8.4	Determinação de Proteínas Totais .....	57
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>58</b>
5.1	ESTUDO 1: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FUMAÇA, ADIÇÃO DE MEIO DE CULTIVO E TIPO DE INOCULO UTILIZADO.....	58
5.1.1	Padronização do método quantitativo de biomassa .....	58
5.1.2	Monitoramento da concentração de O <sub>2</sub> e o pH no sistema aberto de cultivo. .....	59
5.1.3	Quantificação de Nutrientes e Velocidade de Consumo.....	62
5.1.4	Parâmetros cinéticos de crescimento. ....	65
5.2	ESTUDO 2: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CONFIGURAÇÃO ESTRUTURAL DO SISTEMA CINÉTICA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE BIOMASSA.....	71
5.2.1	Padronização do Método de Quantificação de Biomassa .....	71
5.2.2	Monitoramento do Sistema de Cultivo .....	72
5.2.3	Delineamento de Produção de Biomassa.....	75
5.3	ESTUDO 3: ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DO CARBONO NO SISTEMA FECHADO DE CULTIVO.....	79
5.4	ESTUDO 4: OTIMIZAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA POR CENTRIFUGAÇÃO.....	82
5.5	ESTUDO 5: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS MICROALGAS .....	86
5.5.1	Lipídios .....	87
5.5.2	Carboidratos .....	91
5.5.3	Proteínas .....	93
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>96</b>
<b>7</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>98</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>99</b>
	<b>APÊNDICE.....</b>	<b>111</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com o aquecimento global, consequência da emissão de gases de efeito estufa, está conduzindo a sociedade ao desenvolvimento de tecnologias limpas e renováveis. Segundo Harrington e Foster (1999) o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) é um dos principais gases que provocam o aquecimento global, representando aproximadamente 68% das emissões de efeito estufa.

Várias abordagens vêm sendo propostas para a gestão dos elevados níveis atmosféricos de CO<sub>2</sub>, tais como sua injeção em oceano profundo ou seu sequestro em ecossistemas terrestres (HALMANN, 1993). Contudo, ambos os métodos são insustentáveis do ponto de vista econômico (STEWART; HESSAMI, 2005). O sequestro de carbono atmosférico também pode ser realizado usando tecnologias como a separação por membranas, o fracionamento criogênico e a adsorção com peneiras moleculares. Esses últimos, embora menos eficientes, são considerados economicamente viáveis (STEWART; HESSAMI, 2005). Entre os métodos biológicos de mitigação de CO<sub>2</sub> atmosférico estão os mediados por microalgas autotróficas.

As microalgas possuem estrutura celular simples que lhes permite converter a energia solar em energia química em curto tempo. Além da aplicação ambiental, a biomassa e sub(produtos) possuem diversas aplicações comerciais. As proteínas são utilizadas como suplemento alimentar, os carboidratos podem ser empregados na produção de bioetanol e os lipídios, de acordo com o grau de saturação, podem ser utilizados no setor energético ou farmacêutico (DERNER, 2006).

Nessa linha de pesquisa, Yun et al. (1997) obtiveram uma taxa de fixação de CO<sub>2</sub> 0,62 gCO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> em testes com a microalga *Chlorella vulgaris* com adição de 15% (v/v) do gás. Já Cheng e outros (2006) otimizaram a dispersão de CO<sub>2</sub> no meio (1%, v/v) utilizando membranas no meio de cultivo, registrando um aumento na eficiência de biofixação de 2 para 20% (v/v). Segundo Doucha et al. (2005) para produção de 1 kg de biomassa de *Chlorella* sp. são necessários a injeção de 4,4 kg de CO<sub>2</sub> originado da queima de gás natural. No Brasil, Radmann et al (2008) realizaram um cultivo das microalgas de *Spirulina* LEB- 18 e *S. obliquus* LEB-22 a

fim de avaliar a eficiência de biofixação de CO<sub>2</sub> produzido em uma termoelétrica reportando uma máxima taxa de fixação média para a microalga *Spirulina* LEB-18 de 5,66 % e 0,86 % para *S. obliquus* LEB-22. Nessa mesma linha De morais e Costa (2007) avaliaram a resistência também das microalgas *Scenedesmus obliquus* e *Spirulina* quando submetidas a 6 e 12% de CO<sub>2</sub>. Valores mostraram que a biofixação máxima diária para *Spirulina* sp. foi de 53,29 % para 6% (v/v) de dióxido de carbono e 45,61% para 12% já, os valores para *S. obliquus* foram de 28,08% para 6% (v/v) de 13,56 % para 12 % (v/v).

O cultivo de microalgas em escala industrial pode ser feito em sistemas abertos (tanques ou lagoas) ou fechados (fotobioreatores) (BRENNAN; OWENDE, 2010; HARUN; DANQUAH, 2011; CHEN et al., 2011; SINGH; GU, 2010). Entre os fatores que influenciam a viabilidade dos processos podem-se citar características como local de cultivo, espécie utilizada, quantidade de luz e o processo de recuperação da biomassa (BARBOSA, 2012). O processo de separação celular é a etapa do processo mais crítica, sendo utilizadas técnicas como a floculação, a filtração e a centrifugação (BRENNAN; OWENDE, 2010).

O estudo foi realizado na churrascaria Devon's, localizada na região central de Curitiba (PR), que utiliza uma tecnologia de tratamento biológico com microalgas para mitigar o odor das emissões atmosféricas, além de fixar CO e CO<sub>2</sub>, sub (produtos) da queima do carvão vegetal como combustível. O sistema de tratamento é constituído por dois sistemas independentes, um aberto (caixas) e um fechado (fotobioreatores), os quais recebem a fumaça por meio de uma tubulação de aço, após remoção, do material particulado.

Neste contexto, o presente estudo visa utilizar o potencial de biofixação e a alta taxa de crescimento de dois inóculos de microalgas, *Desmodesmus subspicatus* e a M. Devon's (reisolada do sistema biológico de tratamento), com a finalidade de estabelecer as principais variáveis cinéticas e estruturais que maximizam a produção de biomassa em sistema de cultivo aberto (caixas) e fechado (Fotobioreator). A partir das condições otimizadas de cultivo, a biomassa dos cultivos foi recuperada e realizada a análise de sua composição bioquímica, com o intuito de oferecer alternativas de destinação.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar a produção de biomassa de microalgas em sistemas de cultivo abertos e fechados visando o tratamento e aproveitamento dos gases provenientes de uma churrascaria que utiliza carvão vegetal como combustível.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

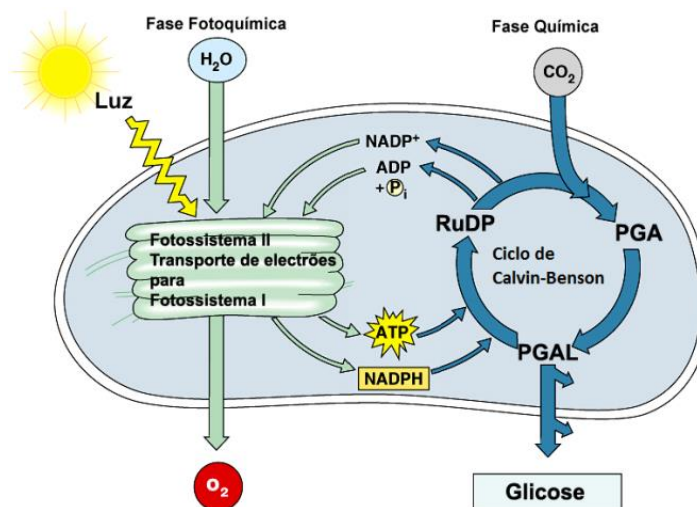
- Cultivar em escala de laboratório a microalga *Desmodesmus subspicatus* (inóculo puro) e caracterizar taxonomicamente a mescla de microalgas que se desenvolve no sistema biológico de tratamento de fumaça (Mescla Devon's);
- Avaliar o efeito da fumaça, do tipo de inóculo (microalga) e da adição do meio de cultura sintético complementar na velocidade máxima específica de crescimento ( $\mu_{max}$ ) e produção máxima ( $P_{max}$ ) de biomassa no sistema;
- Comparar a produção de biomassa, entre o sistema aberto (caixas) e o sistema fechado de cultivo (fotobioreator-Tipo Painel);
- Analisar o comportamento do carbono (CO e CO<sub>2</sub>) mediante a quantificação de gases, eficiência de remoção, alcalinidade e pH, no sistema fechado de cultivo,
- Determinar as melhores condições de recuperação de biomassa a partir do método físico de centrifugação;
- Caracterizar bioquimicamente a biomassa obtida na condição otimizada de cultivo em termos de proteínas, carboidratos e lipídios.

### 3 CONTEXTUALIZAÇÃO DO ASSUNTO

#### 3.1 MICROALGAS

As microalgas são definidas como microrganismos fotossintéticos, eucarióticos como as microalgas verdes (*Chlorophyta*) ou procarióticas como cianobactérias (*Cyanophyceae*), estando distribuídas tanto em ambientes marinhos quanto em água doce (CARLSSON et al., 2007). Esses organismos possuem uma alta taxa de crescimento associada à eficiência da conversão da energia solar em biomassa (ZAMALLOA et al., 2011). Além disso, sua estrutura unicelular ou multicelular simples lhes permite rápida adaptação e colonização de diferentes ambientes. A composição bioquímica é diversificada e inclui uma ampla variedade de carboidratos, proteínas, lipídios e ácidos graxos, estando diretamente relacionados à espécie e ao gênero, bem como aos fatores abióticos e o meio de cultura (MIAU; WU 2006).

A formação de compostos no interior das células das microalgas é regulada por complexos mecanismos metabólicos. Nas microalgas verdes (*Chloropyta*) (Figura 1) um sistema coletor de luz ligado à clorofila e ao carotenoide captura a energia solar na forma de fótons. Essa energia é utilizada pelo fotossistema II na oxidação catalítica da água, liberando prótons, elétrons e uma molécula de  $O_2$  (BEER et al., 2009). Posteriormente, os elétrons com baixo potencial são transferidos através da cadeia de transporte de elétrons fotossintéticos que levam à redução da ferredoxina para a formação de NADPH. Um gradiente eletroquímico é formado devido à liberação de prótons após a oxidação da água para o lúmen do tilacóide, o qual é utilizado para conduzir a produção de Adenosina Trifosfato via ATP sintase. Os produtos fotossintéticos NADPH e ATP são os substratos para o ciclo de Calvin-Benson, onde o  $CO_2$  é fixado em moléculas de três átomos de carbono que são assimilados na forma de carboidratos, como o amido, lipídios e outras moléculas necessárias para o crescimento celular (BEER et al., 2009).



**Figura 1 - Representação da fotossíntese realizada pelas microalgas verdes.**  
 Fonte: <http://portalgfhp.altervista.org/>

Richmond (2004) afirma que existem mais de 50 mil espécies de microalgas no mundo, mas estima-se que cerca de 30 mil foram estudadas. Não obstante, extensas coleções de microalgas têm sido criadas por pesquisadores nas últimas décadas. Um exemplo, a coleção de microalgas de água doce da Universidade de Coimbra (Portugal) com mais de mil espécies, tem sido disponibilizada a fim de avaliar aplicações que envolvem a indústria farmacêutica, alimentar, a produção de biocombustíveis, entre outros.

### 3.1.1 Características Metabólicas

As microalgas possuem três tipos principais de metabolismo, autótrofo, heterótrofo e mixótrofo, diferenciados entre si pela fonte de carbono e de energia utilizada.

Em autotrofia, as microalgas utilizam a luz solar como fonte de energia e uma fonte de carbono inorgânica, como dióxido ou monóxido de carbono disponíveis na atmosfera, ou carbonatos solúveis presentes no meio de cultura ou em efluentes industriais (WANG et al., 2008). O carbono é assimilado através dos cloroplastos e

convertido em O<sub>2</sub> e adenosina trifosfato (ATP), energia química produzida através da fotossíntese (GOVINDJEE; ZILINSKAS, 1974).

Em heterotrofia, as microalgas utilizam compostos orgânicos (e.g., glicose, acetato) como principal fonte de energia e de carbono para o seu crescimento. Dentro dessa classificação, fazem parte também microalgas fotoheterótrofas que utilizam a luz como fonte de energia e os compostos orgânicos como álcool, carboidratos, ácidos orgânicos, entre outros como fonte de carbono (DERNER, 2006).

A mixotrofia, por sua vez, envolve a utilização ou não de compostos inorgânicos e/ou orgânicos pelas microalgas, sendo que em ambos os casos a fotossíntese é a principal fonte de energia (BRENNAN; OWENDE, 2010; CHEN et al., 2011). Como subtipo da mixotrofia está o metabolismo anfitrófico, seguido por organismos capazes de viver autotrófica ou heterotróficamente, dependendo da concentração de compostos orgânicos e intensidade de luz disponível (MATA et al., 2010).

### 3.1.2 Fatores que Afetam o Crescimento Celular

Junto ao metabolismo, fatores abióticos, bióticos e operacionais encontram-se envolvidos no crescimento das microalgas. Entre os mais influentes estão a luz (qualidade, quantidade), temperatura, homogeneização do meio, difusão do O<sub>2</sub> e o pH. No entanto, variáveis como a concentração de nutrientes, a presença de outros organismos (bactérias, fungos e vírus) e as condições operacionais também são relevantes.

Gladue (1991), por exemplo, expõe que além da intensidade luminosa, o tempo de exposição (fotoperíodo ou fotofase) e a intensidade (comprimento de onda) são também determinantes, principalmente para as microalgas fotoautótrofas. Ao encontro, Abe e Galvão (1991) apontam que além da intensidade luminosa o tipo de luz também condiciona o crescimento celular. Eles submeteram a diatomácea *Cyclotella caspia* à presença de luz vermelha ou azul e observaram que na luz azul

ocorre melhor crescimento celular, enquanto que na presença da luz vermelha há aumento de clorofila-a. Outros autores justificam que a luz recebida pelas células adquire importância, por estar diretamente relacionada ao processo de fixação de carbono, que por sua vez influencia na taxa de crescimento do organismo (DERNER et al., 2006).

A temperatura é outro fator importante para o crescimento das microalgas, tanto em sistemas de cultivo fechados como em sistemas abertos. Segundo Moheimani (2005) o seu efeito em escala laboratorial encontra-se bem documentado, mas a magnitude na produção de biomassa em larga escala não é muito conhecida. O autor afirma que algumas espécies de microalgas toleram temperaturas de até 15°C acima da sua temperatura ideal, mas que para outras espécies variações de 2 a 4°C são fatais.

Moheimani (2005) afirma também que a salinidade influencia na composição bioquímica das microalgas, bem como no seu crescimento. Um aumento na concentração de sal no meio (no caso de microalgas de água doce) pode ocasionar um estresse osmótico ou iônico, devido à permeabilidade seletiva da membrana.

A aeração ou mistura também é um parâmetro importante no crescimento das microalgas. Dela dependem a homogeneização dos componentes do meio de cultivo, a suspensão das células e a transferência de calor e de gases no meio. Na medida certa, a turbulência gerada pela homogeneização facilita o deslocamento das microalgas, as quais procuram constantemente zonas luminosas. No entanto, altas velocidades de agitação ou número excessivo de bolhas no cultivo podem causar danos celulares (BARBOSA, 2003).

A maioria das espécies de microalgas são favorecidas em pH neutro; entretanto, algumas espécies toleram valores de pH diferenciados, como a *Spirulina platensis*, por exemplo, que cresce em pH 9 (HU et al., 1998) e *Chlorococcum littorale* que cresce em pH 4 (KODAMA et al., 1993).

Existe uma relação direta entre a concentração de CO<sub>2</sub> e pH. Segundo Esteves (1988) o carbono inorgânico pode estar na forma de CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (ácido carbônico), HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Bicarbonato) ou CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (Carbonato), cujas proporções dependem do pH. Quanto mais ácido, maior a proporção de CO<sub>2</sub> livre, enquanto que com a



elevação do pH as proporções de bicarbonato e carbonato ficam aumentadas no meio.

Assim, incrementos na concentração de  $\text{CO}_2$  levam a uma maior produtividade celular, porém um aumento excessivo pode diminuir o pH até criar um efeito adverso sobre a fisiologia das microalgas. Em contrapartida, pesquisas demonstram que cultivos de microalgas são responsáveis pelo aumento de pH (10 ou 11) em lagoas abertas devido à absorção de  $\text{CO}_2$  (OSWALD, 1988). Este aumento, segundo Hu et al. (1998), pode ser benéfico para a inativação de agentes patogênicos em tratamentos de águas residuais utilizando microalgas.

### 3.2 SISTEMAS DE PRODUÇÃO MASSIVA DE MICROALGAS

No meio ambiente as microalgas precisam de uma fonte de carbono e luz solar para realizar fotossíntese, produzir biomassa e suprir suas necessidades energéticas, mas, em cultivos em larga escala, requerimentos adicionais também devem ser considerados. Borowitzka (1999), por exemplo, afirma que em sistemas massivos de produção de microalgas as características biológicas da espécie e o custo energético do processo são importantes, mas, disponibilidade de água e nutrientes, bem como o tipo e processamento do produto final são determinantes na sua viabilidade de execução.

Entre os sistemas massivos de cultivos se destacam os sistemas abertos (lagoas e tanques), os fechados (fotobioreatores) e os mistos (híbridos). Estes últimos criados com o intuito de agregar as qualidades de cada sistema. Produtos e subprodutos de interesse, eficiência na utilização da luz, possibilidade de controle dos parâmetros físicos, como a viabilidade de manter a cultura estéril no caso dos monocultivos, são parâmetros decisivos na eleição do sistema apropriado de cultivo (SPOLARE et al., 2006).

### 3.2.1 Sistemas Abertos

Utilizados desde a década de 1960 no Japão, pela *Nihon*, com a cultura de *Chlorella* sp. os sistemas de cultivo abertos foram os primeiros a serem criados e são amplamente aceitos e difundidos. Esses sistemas incluem lagoas, lagos e piscinas feitas artificialmente em forma ovoide (Figura 2) com agitação constante, para estabilizar o crescimento das microalgas evitando a precipitação (BOROWITZKA, 1999).



**Figura 2-Exemplos de sistemas abertos de cultivo de microalgas.**  
**Fonte: Cyanotech Corporation**

Segundo Benemann (1996) a profundidade é um parâmetro crítico nos sistemas abertos de cultivo, indicando que piscinas rasas maximizam a produtividade por unidade de área e não por volume. Neste sentido, ao otimizar a forma de cultivo, a quantidade de água utilizada é menor e o processo de recuperação torna-se mais prático e econômico. Não obstante, os autores apontam limitações como grandes perdas de  $\text{CO}_2$  para a atmosfera, alta variação de temperatura e evaporação. XU et al. (2009) afirmam que a perda de  $\text{CO}_2$  nesses sistemas, pode ser compensada instalando dispositivos de aeração aumentando em até 78% a eficiência no uso do gás.

Nesses sistemas, as microalgas, o caldo de cultivo e os nutrientes são adicionados na parte central do tanque, o qual possui um sistema de recirculação que garante a distribuição homogênea, evitando a sedimentação dos microrganismos (TERRY, RAYMOND, 1985).

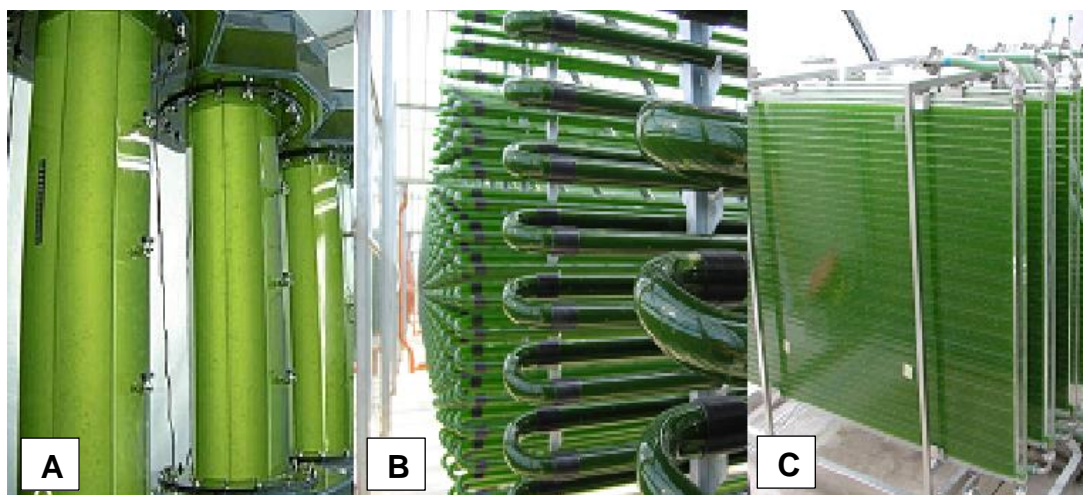
Os sistemas abertos podem ser extensivos, nos quais não há nenhum esforço para o manejo da cultura, ou intensivos, criados com o intuito de melhorar as condições do meio e aumentar a produtividade. Porém, os altos riscos de contaminação devido ao crescimento de outras espécies de organismos diminuem, em ambas as situações, a produtividade do cultivo (BARBOSA, 2012).

Os sistemas abertos são comumente utilizados quando o crescimento das microalgas ocorre em condições ambientais consideradas extremas para a colonização de outras espécies, por exemplo. É o caso de *Spirulina* sp. que sobrevive a pH alcalino, de *Dunaliella* sp. que cresce em meio com alta salinidade ou de *Chlorella* sp. que pela sua alta taxa de crescimento, compete frente a outras possíveis espécies invasoras (BRENNAN; OWENDE, 2010).

### 3.2.2 Sistemas Fechados

Os sistemas de cultivo fechados ou fotobioreatores (PBRs) (Figura 3) estão estruturalmente constituídos por uma série de tubos ou placas transparentes, de plástico, vidro ou policarbonato, de diâmetro de até 10 centímetros. Foram desenhados com uma área superficial maior em comparação aos sistemas abertos, visando, principalmente, maximizar a luz incidente mesmo nas zonas mais profundas do cultivo (CHISTI, 2007).

Mata et al. (2010) destacam que, diferente dos sistemas abertos, os PBRs promovem o crescimento de uma única espécie durante um tempo prolongado, sendo propícios para cultivos de alta susceptibilidade à contaminação. Eles ressaltam também que os sistemas fechados permitem um melhor controle do pH, que varia com o consumo de CO<sub>2</sub> pelas células.



**Figura 3- Exemplos de Sistema fechado de cultivo A: Fotobioreator vertical tubular /B: Fotobioreator horizontal tubular C: Fotobioreator plano (PVC)**  
Fonte: a) Oilfox b) <http://chlorelle.wordpress.com> c) <http://en.wikipedia.org/wiki/Photobioreactor>.

Contudo, esses sistemas apresentam limitações, como o risco de superaquecimento, o dano celular por tensão de cisalhamento e o alto custo de construção, comparado com os sistemas abertos, que, segundo Carvalho et al. (2006) com relação a produtividade, os custos não compensam. Entretanto, Brennan e Owende (2010) expõem que, embora este tipo de sistema de cultivo seja de alto custo, metabólitos de alto valor comercial o justificariam.

Autores como Ugwu e colaboradores (2008) afirmam que esse tipo de configuração é rentável no setor farmacêutico, por exemplo, em cultivos de *Haematococcus pluvialis* na produção de astaxantina, um carotenóide de alto valor agregado.

No Quadro 1 encontram-se as principais vantagens e desvantagens do sistema aberto e fechado de cultivo de microalgas

<b>Parâmetro</b>	<b>Sistema Aberto</b>	<b>Sistema fechado</b>
<b>Riscos de contaminação</b>	Alto	Baixo
<b>Perdas de CO<sub>2</sub></b>	Alta	Baixo
<b>Perdas evaporativas</b>	Alta	Baixo
<b>Eficiência do uso da luz</b>	Pobre	Excelente
<b>Razão Área/Volume</b>	Baixo	Alto
<b>Área requerida</b>	Alta	Baixa
<b>Controle de Processo</b>	Difícil	Fácil
<b>Produtividade de Biomassa</b>	Baixo	Alto
<b>Custos de investimento</b>	Baixo	Alto
<b>Custos de operação</b>	Baixo	Alto
<b>Custos de manutenção</b>	Alto	Relativamente Baixo
<b>Scale up (escalonamento)</b>	Fácil	Difícil

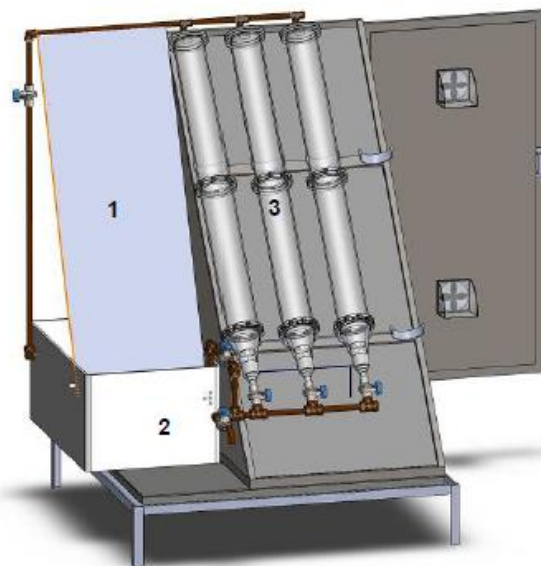
**QUADRO 1-Vantagens e desvantagens do sistema aberto e fechado de cultivo de microalgas**  
 Fonte: CARVALHO et al. (2006)

### 3.2.3 Sistemas Híbridos

Os sistemas híbridos combinam os sistemas de cultivo fechados e abertos. Eles foram idealizados com a finalidade de maximizar as vantagens e minimizar as desvantagens inerentes aos sistemas utilizados de maneira individual (RODOLFI et al., 2008). O cultivo híbrido compreende duas etapas: uma primeira de cultivo em sistema fechado onde condições controladas minimizam a contaminação por outros organismos e estimulam a divisão celular, e, uma segunda etapa em cultivo aberto, a fim de expor as células a condições de estresse de nutrientes e promover a síntese de substâncias de interesse como os lipídios (HUNTLEY, REDALJE, 2007).

Neste contexto, Demirbas (2011) afirma que efetivamente os sistemas abertos associados a sistemas fechados de cultivo, como os fotobioreatores, possibilitam obter melhores resultados. Segundo ele, a combinação de sistemas é provavelmente a escolha mais lógica para oferecer um melhor custo-benefício.

Bjerck (2012) utilizou este tipo de configuração estrutural para remover matéria orgânica utilizando microalgas, obtendo lipídios que foram utilizados na produção de biocombustíveis de terceira geração. Para isso, ele utilizou os seguintes sistemas acoplados: 1) um sistema *turf scrubber*, 2) sistema aberto (tanque) e 3) um fotobioreator tubular, que podem ser visualizados na Figura 4.



**Figura 4-Esquema de um sistema híbrido de cultivo de microalgas**  
Fonte: Bjerck (2012)

### 3.3 VANTAGENS E IMPORTÂNCIA DO CULTIVO

As microalgas possuem uma diversidade ecológica e versatilidade metabólica que as tornam alvo de pesquisas em processos de bioremediação e/ou depuração. São exemplos os cultivos de microalgas em processos que envolvem a remoção de nutrientes de efluentes industriais ou residenciais e na mitigação de CO<sub>2</sub> (WANG et al., 2008; BENEMANN et al., 2003).

### 3.3.1 Biomitigação de Emissões de CO<sub>2</sub>

Segundo Stepan et al. (2002) o carbono, pode ser utilizado pelas microalgas a partir da atmosfera, das emissões de gases de processos industriais ou a partir de carbonatos solúveis na água.

A captura do CO<sub>2</sub> atmosférico é o principal sumidouro de carbono para as microalgas, o qual depende da transferência de massa desse gás do ar até o meio aquático. Porém, a eficiência desse processo é limitada devido à baixa concentração do CO<sub>2</sub> no ar (aproximadamente 360ppm) tornando-se economicamente inviável (STEPAN et al., 2002).

Os carbonatos solúveis em água como o Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e NaHCO<sub>3</sub> são também fontes inorgânicas de carbono utilizadas pelas microalgas. Em meio aquoso, o CO<sub>2</sub>, além de ser solubilizado por difusão passiva, pode reagir com íons como o magnésio, formando precipitados que também são consumidos pelas microalgas (LEE et al., 2004; MARCUS, 1997).

As emissões de CO e CO<sub>2</sub> provenientes de usinas, produto da queima de combustíveis fósseis ou do carvão vegetal, podem ser aproveitadas pelas microalgas. Nos sistemas de cultivo que utilizam estes efluentes gasosos, além da concentração de CO<sub>2</sub> ser aproximadamente 20% maior em comparação do principal sumidouro de carbono, sistemas de condução do gás podem ser acoplados conduzindo esse gás desde a usina até o sistema de produção massiva de microalgas, sendo este um fotobioreator ou uma lagoa. No entanto, autores apontam que apenas um pequeno número de microalgas são tolerantes aos altos níveis de SO<sub>x</sub> e NO<sub>x</sub> presentes nos gases de combustão (BILANOVIC et al., 2009).

Em processos de captura ou biomitigação de gases de efeito estufa vários critérios como a alta taxa de crescimento celular, a utilização de CO<sub>2</sub>, e a tolerância da espécie de microalga frente aos subprodutos da combustão como SO<sub>x</sub> e NO<sub>x</sub>, são importantes para definir as condições ótimas de operação de um sistema de tratamento gasoso utilizando microalgas.

Yun et al. (1997) utilizaram *Chrorella vulgaris* como parte de um tratamento biológico de remoção de CO<sub>2</sub> em uma fábrica de aço. Os autores reportaram uma

fixação de 0,624 g CO<sub>2</sub> por dia. Entretanto, Doucha et al. (2005) reportaram reduções entre 10-50% na concentração de CO<sub>2</sub> utilizando *Chlorella* sp em regime aberto de cultivo e em presença de gases de combustão.

Neste contexto, De Moraes e Costa (2007) reportaram taxas de biofixação utilizando *Scenedesmus obliquus* de 28,08% e 13,56% testando concentrações de 6% (v / v) e 12% (v / v) de CO<sub>2</sub>, no meio de cultivo, respectivamente.

### 3.4 COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA CELULAR

Seja em pequena ou em larga escala, o cultivo de microalgas tem sido objetivado para aproveitar desde sua capacidade para utilizar CO<sub>2</sub> atmosférico até seu potencial de uso no desenvolvimento de alimentos funcionais. Isto porque sua biomassa se compõe por lipídios, carboidratos e proteínas interessantes para setor alimentício, farmacêutico e de biocombustíveis, como o biodiesel, etanol, metano e hidrogênio (CHACON; MARINO, 2010).

Adicionalmente, autores como Pulz e Gross (2004), destacaram a importância dos pigmentos produzidos pelas microalgas, como os carotenóides e ficobiliproteínas, que possuem propriedades antioxidantes e protetoras. Segundo os autores, isto é resultado da evolução desses organismos como mecanismo de proteção à oxidação e formação de radicais livres, num meio rico em oxigênio.

Sanchez et al. (2008) propuseram a utilização de *Scenedesmus almeriensis* como uma excelente fonte de metabólitos funcionais, destacando pigmentos como os carotenoides, considerados de alto valor tanto no setor nutricional como na indústria farmacêutica .

No Brasil, RAYMUNDO et al. (2004) destacaram a elevada atividade antioxidante *in vitro* dos extratos provenientes de algumas microalgas verdes isoladas do litoral catarinense (Brasil) de interesse tanto alimentar como farmacêutico.



### 3.4.1 Lipídios

Os lipídios contidos nas microalgas são tipicamente os triacilgliceróis (TAG<sub>S</sub>) com uma proporção entre 1% a 40%, que varia entre espécies e de acordo as condições de cultivo. FERNANDEZ et al. (2012) ressaltam que a alta produtividade lipídica está sujeita ao tipo de espécie, a condições específicas, tempo de cultivo, e à privação de nutrientes, principalmente de nitrogênio. Não obstante, os pesquisadores afirmaram também que mesmo que as microalgas possuam altos teores de lipídios para tornar o processo economicamente viável, outros componentes da biomassa celular devem ser aproveitados.

Os lipídios mais importantes no setor alimentício são os ácidos graxos poli-insaturados (propensos a reações de oxidação e, portanto, não utilizados para a obtenção de biodiesel) tais como linoleico, eicosapentaenoico (EPA) e o docosahexaenoico (DHA). Esses últimos, de alto valor agregado e de importância no setor da saúde (PULZ; GROSS, 2004).

Valencia et al. (2007) expõem que, além dos lipídios, as microalgas são uma fonte de quase todas as vitaminas importantes, melhorando assim o valor nutricional da composição da sua biomassa integral.

No setor dos biocombustíveis, lipídios de um amplo grupo de microalgas têm sido utilizados para produzir biodiesel, por via extração/transesterificação ou para a produção de biogás, por meio da fermentação anaeróbica de biomassa (ROMERO et al., 2012).

De Moraes e Costa (2007) cultivaram *Spirulina* sp. em concentrações diferentes de CO<sub>2</sub> e HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e confirmaram a relação existente entre condições de cultivo e a biossíntese de ácidos graxos. Os resultados apontaram que *Spirulina* sp cultivada com 18% de CO<sub>2</sub> e 16,8 g.L<sup>-1</sup> de bicarbonato de sódio acumula 81,6% dos seus ácidos graxos de forma saturada, utilizados na produção de biodiesel. Posteriormente os autores também testaram *Chrorella vulgaris* na presença de 12% de CO<sub>2</sub>, afirmando que 72% do perfil lipídico desta microalga encontrava-se em forma de ácidos graxos insaturados, importantes na indústria farmacêutica e de alimentos (DE MORAIS; COSTA, 2008).

### 3.4.2 Proteínas

As proteínas representam entre 28-71% do total da biomassa em peso seco, sendo o principal macronutriente da maioria das espécies de microalgas. Elas têm sido amplamente estudadas, especificamente desde a Segunda Guerra Mundial (1945) e com patrocínio de *Carnegie Institute*, com a *Chlorella* sp. sendo cultivada pela primeira vez em larga escala para fim alimentar (CHACON; MARINO, 2010).

No início de 1950, o aumento da população mundial e previsões de proteína animal insuficiente, levaram à procura mais aprofundada de alternativas proteicas, como a biomassa de microalgas (CORNET, 1998; BECKER, 2007). Fato justificado, segundo Soletto et al. (2005), em análises e estudos nutricionais que demonstraram que as proteínas de origem microalgal são de alta qualidade, comparável às proteínas vegetais convencionais. No entanto e apesar do seu elevado teor de proteína nutritivo, segundo Becker (2007) a biomassa seca não ganhou ainda importância significativa como alimento ou substituto alimentar para humanos.

Os principais obstáculos são a sua consistência, a sua cor verde escuro e o seu cheiro ligeiramente duvidoso, limitando sua incorporação em alimentos convencionais. Uma série de experimentos foi realizada para modificar ou misturar essa biomassa com alimentos conhecidos, através da aplicação de vários métodos, tais como aquecimento, cozimento, mistura. Segundo Becker (2004) tentou-se incluir algas em preparações de pão ou macarrão, mas o sabor de massa tornou-se desagradável e com uma cor acastanhada pouco atraente.

O uso de microalgas como ração animal tem sido de grande aceitação. Um grande número de avaliações nutricionais e toxicológicas demonstrou que a biomassa microalgal pode ser sim um valioso suplemento alimentar ou substituto de convencionais fontes de proteína (farelo de soja, farinha de peixe, farelo de arroz, etc.). A incorporação de microalgas nesse contexto tem sido aplicada em rações para aves como no setor da aquicultura, oferecendo uma perspectiva mais promissora para a sua comercialização (BECKER, 2007).

Na Tabela 1 é apresentada a composição bioquímica de algumas microalgas em comparação com algumas fontes tradicionais de proteínas, lipídios e carboidratos.

**Tabela 1- Composição geral (% de matéria seca) de diferentes algas e os valores de comparação com as fontes tradicionais de alimentos**

<b>Espécie</b>	<b>Proteína</b>	<b>Carboidratos</b>	<b>Lipídios</b>
<i>Spirulina platensis</i>	63	15	11
	61,32-64,43	15,09-15,81	7,09-8,03
<i>Arthrospira maxima</i>	60-71	13-16	6-7
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
	47,82	8,08	13,32
<i>Chlorella pyreïnodosa</i>	57	26	2
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
	34,1	32,1	6,53
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	--	1,9
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40
<i>Aphanizomenon fois-aquae</i>	62	23	3
<i>Chlamidomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20
<i>Spirogyra sp.</i>	6-20	33-64	11-21
<i>Synechococcus sp.</i>	46-63	8-14	4-9
<i>Nannocloropsis spp.</i>	28,8	35,9	18,36
<i>Haematococcus pluvialis</i>	48	27	15
<i>Isochrysis galbana</i>	26,99	16,98	17,16
<b>Alimentos convencionais</b>	<b>Proteína</b>	<b>Carboidratos</b>	<b>Lipídios</b>
Levedura	39	38	1
Carne	43	1	34
Ovo	47	4	41
Leite	26	38	28
Arroz	8	77	2
Soja	37	30	20

Fonte: Adaptado de Becker (2007)

No setor cosmético algumas espécies de microalgas têm adquirido força no mercado de cuidados com a pele, sendo as principais *Arthrospira* sp. e *Chlorella* sp. (SPOLAORE, 2006). Alguns esteticistas inclusive têm investido no seu próprio sistema de produção massivo de microalgas (LVMH®, Paris, França e Daniel Jouvance, Carnac, França). Extratos de microalgas podem ser encontrados principalmente em produtos para o cuidado do rosto e da pele, como cremes anti-envelhecimento, refrescantes ou regeneradores, emolientes e anti-irritantes assim como em protetores solares e para o cuidado do cabelo (STOLZ; OBERMAYER, 2005). Adicionalmente, *Arthrospira* tem sido utilizada em produtos que combatem o envelhecimento precoce da pele que à sua vez exercem efeitos tensoativos evitando a formação de estrias (Protulines, Exsymol SAM, Mônaco). Já *Chlorella vulgaris* tem sido utilizada na fabricação de cosméticos que estimulam a síntese de colágeno na pele, promovendo a regeneração dos tecidos e redução de rugas (Dermochlorella, Codif, St. Malo, França) (SPOLARE, 2006).

### 3.4.3 Carboidratos

Os carboidratos representam o segundo macronutriente mais representativo da biomassa das microalgas, com uma porcentagem que varia entre 20%-30%. Os hidratos de carbono disponíveis têm boa digestibilidade, razão pela qual são poucas as limitações de seu uso no setor alimentício (VARGAS et al., 1998). Além das vantagens de crescimento rápido, fixação de dióxido de carbono eficiente, não competição por terras aráveis e água potável, as microalgas são consideradas como uma matéria-prima renovável promissora para a produção de biocombustíveis e biorrefinarias, isto devido ao seu acúmulo de grandes quantidades de lipídios e carboidratos (CHUN et al., 2013).

No setor energético, John et al. (2011) propõem o uso das microalgas como fonte de energia alternativa, utilizando os aminoácidos e carboidratos armazenados no interior da célula para a produção de bioetanol. Isto relacionado com o fato de que suas paredes celulares são compostas principalmente de celulose e que

possuem altos teores de amido nos plastídios, que podem ser facilmente convertidos em açúcares fermentáveis (HARUN; DANQUAH; 2011).

### 3.5 TECNOLOGIAS DE RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA

Após o cultivo, seja em sistemas abertos ou fechados, as microalgas devem ser separadas do meio de cultivo, sendo utilizados diferentes métodos físicos, químicos e biológicos para tal fim (Grima et al. 2003; Brennan e Owende, 2010; Mata et al. 2010). Os métodos de recuperação incluem a sedimentação, centrifugação, filtração e ultrafiltração, floculação e flotação (Wang et al. 2008).

A recuperação da biomassa é considerada uma etapa de alto custo na produção em larga escala de microalgas. Segundo Gudín e Therpenier (1986), o processo de recuperação e de obtenção de biomassa representa cerca de 20% a 30% do custo total do processo. Este fato, segundo Davis et al. (2011) está diretamente relacionado com o tamanho celular da cada espécie de microalga, que varia entre 3-30  $\mu\text{m}$ .

Wang et al. (2008) afirmaram que a produtividade de biomassa seca de microalga está em torno de 0,3 - 0,5 gramas de biomassa seca por litro de cultura mas que valores de até 5  $\text{g.L}^{-1}$  podem ser atingidos.

Molina et al. (1999) afirmam que não existe um método de recuperação único ou adequado para todos os processos. Portanto, a seleção do melhor método ou tecnologia empregada para cada caso é determinante na eficiência do processo como um todo.

Segundo Ginzburg (1993) uma aproximação razoável das condições ótimas de recuperação consiste em realizar o processo em duas etapas. Uma primeira, preliminar de separação e concentração da biomassa como a floculação ou flotação, e uma segunda, de espessamento, que adota processos físicos como a centrifugação ou sedimentação por gravidade.

### 3.5.1 Flocculação e Flotação

A flocculação e a flotação são métodos de colheita ou recuperação de biomassa, utilizados a partir de meios líquidos de cultivo. A flocculação envolve principalmente o uso de flocculantes químicos a fim neutralizar a carga negativa da superfície celular das microalgas e promover a sua agregação. O método que utiliza flocculantes químicos, como cátions polivalentes e polímeros catiônicos, tem sido fortemente questionado em função dos subprodutos gerados no processo (MOLINA et al., 1999).

Embora questionado, muitos pesquisadores defendem esse método e propõem estratégias para aumentar sua eficiência. Knuckey et al. (2006), por exemplo, afirmam que com ajustes no pH e o uso de polímeros não-iônicos, como o Magnafloc LT-25®, a eficiência pode ser maximizada em até 80%.

A flotação, por sua vez, se baseia no princípio de flutuação das microalgas pela presença de vacúolos de ar ou pelo acúmulo intracelular de lipídios, para o seu aprisionamento utilizando microbolhas de ar. A flotação, diferentemente da flocculação, não utiliza produtos químicos ou agentes flocculantes, sendo considerada uma tecnologia limpa de recuperação celular (MORCELLI, 2011). Porém, sua utilização é ainda um desafio em larga escala, questionando-se a viabilidade técnica e econômica do método. Esta metodologia foi adotada com sucesso por Reali (2012) para recuperar células de *Chrorella vulgaris* cultivadas em fotobioreatores visando à produção de biodiesel.

### 3.5.2 Centrifugação e Sedimentação

A centrifugação é um método físico amplamente aceito na recuperação de cultivos em suspensão, mas é condicionado pelas características de sedimentação celular próprias de cada espécie. É considerado um método rápido e eficaz capaz de separar, segundo Grima et al. (2003), cerca de 90-95% da biomassa do meio de cultivo, com pouca umidade. De acordo com Zardo (2011) a centrifugação é um

método eficiente e economicamente viável quando as microalgas a serem recuperadas possuem uma excelente produtividade em biomassa ou produzem metabólitos de alto valor agregado.

Ensaio em escala de laboratório, utilizando efluentes de lagoas de estabilização, demonstraram que 80-90% das microalgas foram recuperadas em um intervalo de 2-5 minutos (MORCELLI, 2011). Porém, desvantagens como um alto consumo energético e gastos de manutenção, adicionam ao processo um alto custo operacional.

A sedimentação, assim como a centrifugação, se fundamenta na *Lei de Stokes*, a qual prevê que a velocidade de sedimentação é diretamente proporcional à diferença de densidade entre objetos esféricos, no caso as células de microalga, e o meio líquido de cultivo (SCHENK et al., 2008).

Utilizada como um método apropriado em meios com alta densidade celular, a sedimentação encontra sua melhor aplicação em bioprocessos que visem à produção massiva de microalgas, como a aquicultura. Por outro lado, Schenk et al.(2008) acreditam não ser a melhor opção quando a finalidade é a produção de biodiesel em função da alta demanda de tempo e espaço requerido.

### 3.5.3 Filtração

A filtração é um método físico baseado na separação de uma fase sólida de uma fase líquida, no caso, as microalgas do seu meio de cultivo. Este método, segundo Mohn (2008), é o melhor para recuperação celular de microalgas com tamanho celular igual ou superior a 70  $\mu\text{m}$ , como as microalgas *Arthrospira* e *Coelastrum*, mas tecnicamente inviável para a recuperação de microalgas como *Chlorella* e *Scenedesmus*, que possuem cerca de 30  $\mu\text{m}$  (BENEMANN, 1996).

Para microalgas deste tamanho ou menor, segundo Petrushevski et al.(1995), a microfiltração e a ultrafiltração (utilizam pressão hidroestática) são alternativas de recuperação celular tecnicamente viáveis comparado com os métodos de filtração convencional.

Do ponto de vista econômico, os principais custos da microfiltração e da ultrafiltração são a reposição das membranas e o sistema de bombeamento. De acordo com Rossignol et al. (1999) em operações em pequena escala (< 2 mil L), o uso da microfiltração é mais custo-efetiva quando comparado com a centrifugação. No entanto, operações em larga escala (> 20 mil L), tornam a centrifugação um método mais econômico na recuperação da biomassa.

Segundo Golueke e Oswald (1965), que fizeram uma análise comparativa entre a filtração, flotação, centrifugação, precipitação, troca iônica, eletro-diálises e vibração ultra-sônica, a centrifugação e precipitação química são as opções mais economicamente viáveis para realizar a recuperação das células suspensas em meio de cultivo.

### 3.6 TECNOLOGIAS DE PURIFICAÇÃO E EXTRAÇÃO DE BIOMASSA

Após a recuperação da biomassa, esta deve ser rapidamente processada devido à sua natureza perecível e de alta susceptibilidade à degradação. Em função disto, como da escala de operação do sistema de produção adotado, a literatura descreve alguns métodos que envolvem a desidratação e secagem do material que visam prolongar a sua viabilidade até a extração e purificação final das substâncias de interesse (BRENNAN; OWENDE, 2010).

Da Silva et al. (2011) expõem que além de conservar a biomassa, a secagem auxilia na ruptura celular das microalgas para a liberação dos metabólitos de interesse. Produtos intracelulares como lipídios, por exemplo, são de difícil extração a partir da biomassa úmida.

Entre os métodos mais comuns usados para secar e/ou desidratar microalgas têm-se a secagem por aspersão (*spray-drying*), tambor de secagem (*drum-drying*), liofilização (*freeze-drying*) e a secagem ao sol (*sund-drying*).

A secagem por aspersão (*spray-drying*) é usada principalmente quando o produto de interesse é termicamente sensível, como alimentos e produtos farmacêuticos (DESMORIEUX; DECAEN, 2006). No método de secagem por



aspersão, as microalgas são submetidas a uma contínua corrente de ar quente, que recircula dentro de uma câmara especializada até a pulverização (secagem). No entanto, alguns autores afirmam que seu custo é relativamente alto e que pode deteriorar significativamente alguns pigmentos intracelulares dos organismos.

Por outro lado, a secagem utilizando tambores (*drum drying*) utiliza como princípio o calor por condução, onde as amostras são aderidas nas paredes de cilindros giratórios aquecidos, retirando a umidade do material. Parâmetros como tempo e velocidade de rotação, pressão de vapor e temperatura são importantes para evitar desnaturação de proteínas (PRAKASH et al., 1997).

A liofilização (*freeze drying*) se fundamenta no processo de sublimação, onde a água contida na amostra (previamente congelada) é convertida em vapor sem passar pelo estado líquido. Dentre as vantagens do seu uso destaca-se a diminuição do risco de desnaturação de proteínas mas, é um método caro, especialmente para operações em grande escala.

A secagem ao sol (*sundrying*) é o método de desidratação mais econômico, em comparação aos outros métodos. Entretanto, desvantagens como longos tempos de exposição e a exigência de grandes superfícies de secagem, além do alto risco de perda por decomposição, limitam seu uso (MOLINA et al., 1994).

Como etapa posterior à secagem está o rompimento celular das microalgas. Vários métodos são empregados, dependendo do destino dos subprodutos. Alguns exemplos são: prensas, que usam a ação mecânica o congelamento, uso de solventes orgânicos (utilizados na extração de lipídios de microalgas como óleos em oleaginosas tradicionais), choque osmótico e reações ácidas, básicas e enzimáticas.

O ultrassom também pode ser utilizado para romper células em suspensão, mas sua viabilidade se restringe a processos em pequena escala (DA SILVA et al., 2011). Como exemplo de ação não mecânica está o tratamento com álcalis (usado para isolar ácidos graxos livres), considerado por alguns autores um método efetivo de ruptura da parede celular, não adequado para produtos sensíveis como proteínas (GRIMA et al., 2003; MATA et al., 2010).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTUDO

A pesquisa foi desenvolvida na Churrascaria Devon's, localizada na região central de Curitiba (Paraná) em parceria com o Instituto de Tecnológica do Paraná (TECPAR). A churrascaria utiliza uma tecnologia de captação das emissões dos gases produzidos durante o cozimento das carnes, que trata o odor, além das emissões de CO e CO<sub>2</sub> e subprodutos, como SO<sub>x</sub> e NO<sub>x</sub>, resultado da combustão incompleta do carvão emitidos junto com a fumaça pela chaminé. A caracterização desses gases inorgânicos, assim como dados operacionais e de combustão foram realizados pelo Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI) e podem ser visualizados na Tabela 2.

**Tabela 2- Composição dos gases inorgânicos presentes na fumaça da chaminé da Churrascaria Devon's**

Ensaio	Resultado	Unidade	Metodologia
CO	1669,1	mg.Nm <sup>-3</sup>	Analisador de Gases
CO <sub>2</sub>	0,6	%	
NO	6,9	mg.Nm <sup>-3</sup>	
NO <sub>x</sub>	10,9	mg.Nm <sup>-3</sup>	
NO <sub>2</sub>	3,9	mg.Nm <sup>-3</sup>	
SO <sub>x</sub>	0,0	mg.Nm <sup>-3</sup>	
O <sub>2</sub>	19,7	%	Coletor Isocinético
Vazão de gás da chaminé	1292,00	mg.Nm <sup>-3</sup>	
Temperatura	97,8	°C	Gravimétrico
Umidade	5,4	%	
Material Particulado	51,23	mg.Nm <sup>-3</sup>	

A tecnologia de tratamento biológico envolve duas configurações físicas. O sistema de cultivo aberto de cultivo, composto por oito caixas, e o sistema fechado, formado por dois fotobioreatores. Os dois sistemas trabalham simultaneamente, recebendo 35% da fumaça emitida pela churrascaria que passa previamente por um filtro que retira o material particulado. A emissão atmosférica é captada por meio do uso de um compressor radial, com capacidade de operação de 1250m<sup>3</sup>.h (motor de sucção – soprador) e direcionada por uma tubulação em aço inoxidável para ambos os sistemas de cultivos com microalgas, como pode ser observado na Figura 5.

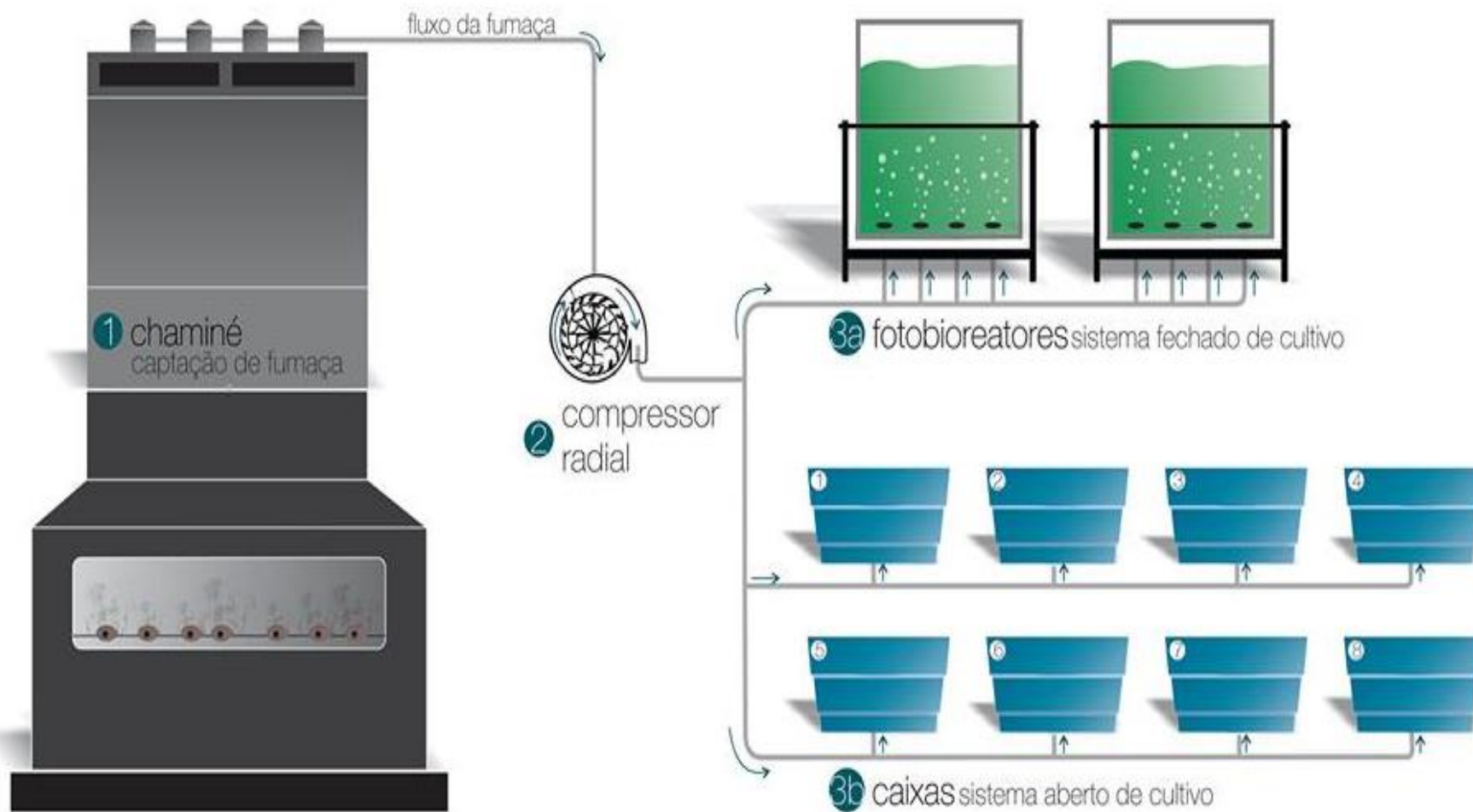


Figura 5- Sistema aberto e fechado para o tratamento e aproveitamento de fumaça na churrasceria Devon's utilizando microalgas

#### 4.1.1 Sistema Aberto de Cultivo

O sistema de cultivo aberto é formado por caixas plásticas azuis, de 1,20 m de comprimento e 0,80 m de largura, fabricadas em fibra de vidro e com volume operacional de 800 L (Figura 6). Estas foram instaladas no telhado da churrascaria, com distância de 0,20 m entre elas. A fumaça foi borbulhada com auxílio de um sistema de aspersores de ar, que garantiram a homogeneização do meio.



**Figura 6 - Sistema aberto de cultivo (caixas)**

#### 4.1.2 Sistema Fechado de Cultivo

O sistema de cultivo fechado é formado por fotobioreatores tipo painel, com capacidade máxima de 512 L e volume útil de 415 L. Estruturalmente são constituídos por duas paredes em vidro temperado transparente, a fim de aumentar a eficiência de captação de luz, adaptados em um suporte de alumínio (Figura 7). Da mesma forma que no sistema aberto de cultivo, uma tubulação de aço direciona a fumaça, gerada na churrascaria até o fotobioreator, que é aspergida em forma de bolhas no meio de cultivo.

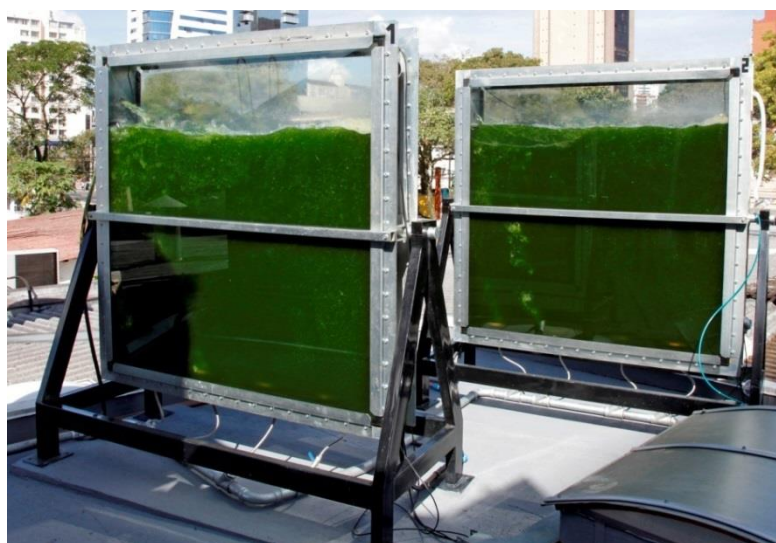


Figura 7 - Sistema fechado de cultivo em Fotobioreator (Tipo painel)

## 4.2 MICROALGAS

Nos cultivos experimentais tanto em regime aberto quanto fechado, foram utilizados dois inóculos: um de *Desmodesmus subspicatus* (Figura 8) e o outro misto chamado de Mescla Devon's. O volume utilizado em cada um dos experimentos foi de 90% do volume útil total para cada sistema. A fim de garantir a concentração de células equivalente entre os ensaios, os inóculos foram quantificados por absorbância a 682nm (BJERK, 2012).

### 4.2.1 *Desmodesmus subspicatus*, R (R. Chodat) E. Hegewald; A. Schmidt.

A microalga *Desmodesmus subspicatus* é uma microalga verde planctônica, representante dos produtores primários nos ecossistemas de água doce. Normalmente pode ser encontrada formando agregados de até 5 ou 6 células como observado na Figura 8. Bicudo e Menezes (2006) afirmam que a microalga *Scenedesmus* encontra-se nos mais diversos ecossistemas, principalmente nos eutróficos. Segundo An et al. (1999) o gênero *Desmodesmus* é constituído por

indivíduos coloniais de vida livre. Os cenóbios planos são formados por 2-16 células dispostas linear ou alternadamente, com seus eixos mais longos paralelos entre si, formando uma linha de células dispostas em uma série ou em duas. As células podem ser elipsóides ou ovóides e todas iguais entre si ou de dois tipos, isto é, as externas do cenóbio são de um tipo e as internas de outro. A parede celular é ornamentada com verrugas, espinhos, denticulos ou rosetas. Os espinhos podem ocorrer tanto nos pólos das células externas, quanto nos pólos das células internas, não ocorrendo espécies sem espinhos ou sem algum tipo de ornamentação. Cloroplastídio parietal, com um pirenóide. A cepa de *D. subspicatus* foi fornecida pelo TECPAR e o seu cultivo foi realizado em meio CHU (1942) utilizando galões de vidro de 20 L durante 12 dias, com aeração constante em condições estéreis. A classificação taxonômica de *D. subspicatus* foi proposta por Hegewald et al. (2001).

Domínio Eukaryota

Filo Chlorophyta

Classe Chlorophyceae

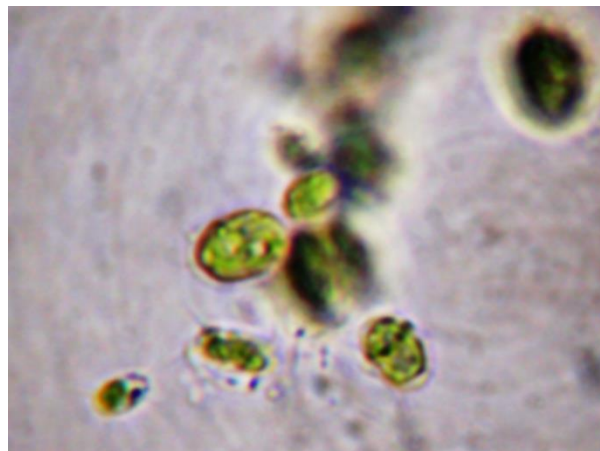
Ordem Sphaeropleales

Família Scenedesmaceae

Subfamília Desmodesmoidea

Gênero *Desmodesmus*

Espécie *Subspicatus*



**Figura 8-*Desmodesmus subspicatus***



#### 4.2.2 Mescla Devon's

A mescla Devon's (Figura 9) foi re-isolada do sistema de tratamento em funcionamento desde o ano 2011, tendo sido inicialmente coletada no Passeio Público (Curitiba- PR) por Mikami (2011). Os táxons contidos neste inóculo foram identificados a partir de bibliografia especializada (Bellinger (1992), Bicudo e Menezes (2006); Canter e Lund (1998); Cox (1996) e Kumar (1967)). As microalgas identificadas neste trabalho estão listadas a seguir:

*Chlorella sorokiniana*  
*Chlorella* sp.  
*Chlorella vulgaris*  
*Chlorococcum* sp.  
*Closteridium* sp.  
*Monoraphidium arcuatum*  
*Monoraphidium circinale*  
*Monoraphidium contortum*  
*Pediastrum duplex*  
*Scenedesmus acuminatus*  
*Scenedesmus dimorphus*  
*Scenedesmus quadricauda*  
*Scenedesmus subspicatus*  
*Schroedeira indica*  
*Selenastrum westii*

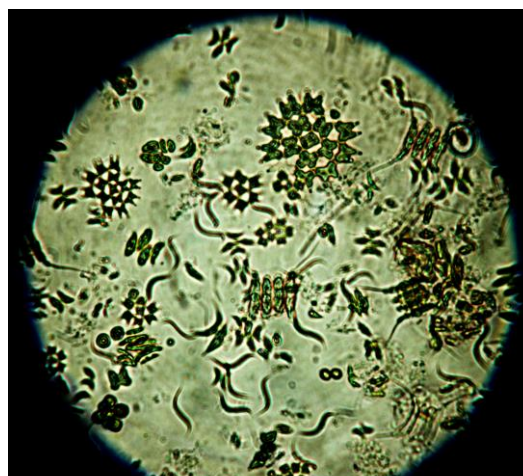


Figura 9- Mescla Devon's

#### 4.2.3 Caracterização do Meio de cultivo e da Água

A composição do meio de cultura CHU (1942) empregado tanto no cultivo do inóculo de *Desmodesmus subspicatus* quanto na otimização das condições está apresentada na Tabela 3.

**TABELA 3- Composição de meio CHU**

Reagente	Formula Molecular	Concentração (g ou mg.L <sup>-1</sup> )
Nitrato de sódio	NaNO <sub>3</sub>	25 g
Cloreto de cálcio di-hidratado	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,5 g
Sulfato de magnésio hepta-hidratado	MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	7,5 g
Fosfato de potássio dibásico	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,5 g

Fosfato de magnésio monobásico	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	17,5 g
Cloreto de sódio	$\text{NaCl}$	2,5 g
Titriplex III	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	50 g
Hidróxido de potássio	$\text{KOH}$	31 g
Sulfato ferroso hepta-hidratado	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4,98 g
Ácido bórico	$\text{H}_3\text{BO}_3$	11,42 g
Sulfato de zinco hepta-hidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,82 mg
Cloreto de manganês tetra-hidratado	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,44 mg
Óxido de molibdênio	$\text{MoO}_3$	0,71 mg
Sulfato de cobre penta-hidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,57 mg
Nitrato de cobalto hexa-hidratado	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,49 mg

Fonte: CHU (1942)

A água utilizada nos experimentos foi coletada no poço semi-artesiano da churrascaria, tendo sido caracterizada física e quimicamente (Tabela 4), seguindo a metodologia padronizada no APHA (2005).

**Tabela 4- Caracterização da água usada no experimento**

Parâmetro	Resultados	VPM	Unidade
Dureza Total	110,0	500,0	$\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$
Nitrato	<0,50	10.0 (como N)	$\text{mg.L}^{-1} \text{N-NO}_3$
Nitrito	<1,0	<1,0	$\text{mg.L}^{-1} \text{N-NO}_2$
Cloretos	53,2	250,0	$\text{mg.L}^{-1} \text{L Cl}^-$
pH	9,43	6,0-9,5	U pH
Turbidez	<1,0	5 UNT	UNT
Cor	<1,0	10Hz ou mg Pt/L	Hz
Sulfatos	<1,0	250,0 mg/L	$\text{mg.L}^{-1} \text{SO}_4$
Sólidos Dissolvidos Totais	240,0	1000,0 mg/L	$\text{mg.L}^{-1}$
Fluoretos	<1,0	1,5 mg/L	$\text{mg.L}^{-1} \text{F}^-$
Alcalinidade Total	125,0	Não consta	$\text{mg.CaCO}_3$
Manganês	0,07	0,1	$\text{mg.L}^{-1} \text{Mn}$
Sílica Total	161,7	Não consta	$\text{mg.L}^{-1} \text{SiO}_2$
Odor	Nenhum	-	-
Aspecto	Límpido	-	-

Nota: VPM: Valor Máximo permitido pela legislação vigente: Portaria n.518 de 2004.

### 4.3 METODOLOGIAS ANALÍTICAS

#### 4.3.1 Monitoramento do Crescimento Celular

Para o acompanhamento do crescimento celular nos experimentos, tanto no preparo do inóculo quanto nos estudos 1 e 4, foi adotada a medição da absorbância



(682nm). As medições foram feitas de três em três dias, por um período total de 30 e 21 dias para o sistema aberto e fechado respectivamente, utilizando um espectrofotômetro portátil modelo DR-2800 – HACH. O comprimento de onda foi definido após realizar uma varredura por fluorescência para ambas as amostras, indicando ser este o melhor comprimento de absorção. Pesquisas similares como a realizada por Bjerk (2012) utilizando microalgas em condições semelhantes de cultivo, empregando inóculos puros e mistos de *D. subspicatus* indicaram também ser este o melhor comprimento para realizar um monitoramento indireto da concentração celular.

A absorvância é uma medida indireta de concentração celular, portanto, foi necessário realizar a sua correlação com métodos quantitativos, sendo utilizadas as análises de peso seco e de determinação de clorofila-a. As amostras foram coletadas utilizando frascos plásticos previamente descontaminados e secos, e foram transportadas em uma caixa térmica até o Laboratório de Limnologia e Ecotoxicologia da UTFPR Campus Curitiba, onde foram armazenadas, sob refrigeração a 8°C até serem processadas.

#### 4.3.1.1 Peso seco

O cálculo do peso seco permite quantificar a biomassa por unidade de volume ( $\text{g.L}^{-1}$ ) (BJERK, 2012). Em laboratório, volumes conhecidos de amostra foram filtrados por pressão a vácuo utilizando microfiltros de fibra de vidro GC-3 (Millipore) com poro de 0,45 $\mu\text{m}$  e de 47mm previamente secos e pesados. Após filtração, os filtros com o material retido foram levados para a estufa a 105°C até a obtenção do peso constante. A concentração de microalgas ( $\text{g.L}^{-1}$ ) foi calculada usando a equação 1:

$$\text{Biomassa}(\text{g/L}) = \frac{\text{Peso final Filtro} - \text{Peso Inicial do Filtro}}{\text{Volume Filtrado}} \quad (\text{Equação 1})$$

#### 4.3.1.2 Clorofila-a

Amostras coletadas de três em três dias foram coletadas e filtradas e a análise de quantificação da clorofila-a foi realizada seguindo o método espectrofotométrico desenvolvido por Strickland e Parsons (1972).

A fim de evitar a fotodegradação, amostras de volume conhecido foram filtradas utilizando membranas de acetato de celulose GF/C (Millipore) com tamanho de poro de 0,45µm. Os filtros com o material celular foram cuidadosamente colocados em tubos falcon de plástico embrulhados em papel alumínio. Em seguida as células retidas foram maceradas utilizando 5mL de acetona com 90% de pureza. Logo, mais 5 mL de acetona foram adicionados em cada tubo completando um volume de 10 mL. A seguir, as amostras foram centrifugadas durante 20 min a 3000 rpm e deixadas em repouso por um período de 24 horas a 4°C . Após este período amostras de 1mL do sobrenadante, produto da centrifugação, foram lidas em espectrofotômetro antes e depois de acidificação (0,1m L de HCl 0,1mol.L<sup>-1</sup>) entre 750 e 664 nm. A concentração da clorofila-a foi calculada utilizando a equação 2 :

$$\text{Clorofila } a \left( \frac{\text{mg}}{\text{m}^3} \right) = \frac{26,7 (\text{Abs.664 nm sem } \acute{\text{a}}\text{c.} - \text{Abs.775 nm depois } \acute{\text{a}}\text{c.}) \cdot V1}{V2 \cdot L} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde, V1= Volume do sobrenadante (L); V2= Volume da amostra (m<sup>3</sup>); L= espessura da cubeta (cm); 664nm s. ac = Absorbância antes de acidificar; 775nm d. ac= Absorbância depois de acidificar

## 4.3.2 Determinação dos Parâmetros Cinéticos de Crescimento

### 4.3.2.1 Velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ )

A velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ ), permite calcular a velocidade de crescimento de um organismo na sua fase exponencial em condições específicas de cultivo. Essa velocidade é calculada através da Equação 3.

$$\mu_{max} = \frac{1}{t} \cdot \ln \frac{X_f}{X_i} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde,  $X_f$  e  $X_i$  são as concentrações celulares, expressadas em biomassa para um intervalo específico de tempo ( $t$ ) (CHIU et al., 2009; CONVERTI et al., 2009). O resultado é expresso como um número adimensional  $d^{-1}$ .

## 4.3.3 Avaliação dos Parâmetros de Produtividade de Biomassa

### 4.3.3.1 Densidade celular máxima (DCM)

A densidade celular máxima é um parâmetro analítico utilizado por alguns pesquisadores para determinar a máxima concentração celular atingida por um cultivo celular em um intervalo específico de tempo e ao longo da sua curva de crescimento (DERNER, 2006). Este critério é importante já que define o melhor momento (dias) de recuperação ou colheita celular do cultivo (OLIVERA, 1993). A DCM foi determinada para todos os cultivos experimentais e definida comparando os valores de concentração celular máxima atingida por cada um deles ao longo de 30 dias e 21 para o sistema aberto e fechado de cultivo respectivamente.

#### 4.3.3.2 Produtividade máxima de cultivo ( $P_{max}$ )

A produtividade da biomassa é um parâmetro cinético que quantifica a produção de biomassa na fase exponencial do cultivo. Seu cálculo segue a equação 4:

$$P_{max} = \frac{X - X_0}{t - t_0} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde,  $X$  e  $X_f$  correspondem à concentração de biomassa (g ou  $\text{mg.m}^{-3}$  de Chl-a) para um intervalo de tempo específico definido como  $t$  e  $t_0$ .

### 4.4 ESTUDO 1: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FUMAÇA, ADIÇÃO DE MEIO DE CULTIVO E TIPO DE INÓCULO NO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE BIOMASSA

#### 4.4.1 Monitoramento das Variações Físicas e Químicas do Cultivo

O experimento foi realizado entre os meses de março e abril de 2013, período no qual foram monitoradas, mas não controladas, as oscilações nos parâmetros físicos nas unidades experimentais no sistema aberto e fechado de cultivo. *In situ*, foram realizadas medições da temperatura, pH, intensidade luminosa do ambiente (Lux), sólidos suspensos totais (STD) e concentração de  $\text{O}_2$  ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) usando uma sonda multi-paramétrica da marca HANNA.

Ao longo dos cultivos foi também quantificada a concentração do nitrato ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) e do Ortofosfato ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) e, paralelamente, foi calculada a velocidade de seu consumo pelas duas microalgas com e sem meio de cultivo. Para isso, foram utilizados métodos espectrofotométricos padronizados no APHA (2005), sendo que a velocidade de consumo foi calculada dividindo a concentração de cada nutriente pelo tempo de cultivo (30 dias).

#### 4.4.2 Delineamento Experimental

Procedeu-se um delineamento experimental  $2^3$  com o objetivo de avaliar o inóculo de microalga (Variável 1), a presença ou ausência de Fumaça (Variável 2) e a adição ou não de meio de cultura CHU (Variável 3). Na variável resposta, a máxima produção de biomassa (Tabelas 5 e 6).

**Tabela 5-Planejamento fatorial  $2^3$  para avaliação do efeito da fumaça, adição de meio CHU e inóculo na produção de biomassa.**

Variável	(-)	(+)
<b>Fumaça</b>	Ausência	Presença
<b>Meio</b>	Água	Meio
<b>Microalga</b>	<i>D. subspicatus</i>	Mescla Devon's

**Tabela 6 - Matriz padrão para o planejamento experimental  $2^3$  do estudo 1**

Microalga	Nível	Meio	Nível	Fumaça	Nível	Resposta
<i>D. subspicatus</i>	(-)	Água	(-)	Ausência	(-)	Máxima Produção de biomassa
Mescla Devon's	(+)	Água	(-)	Ausência	(-)	
<i>D. subspicatus</i>	(-)	Meio	(+)	Ausência	(-)	
Mescla Devon's	(+)	Meio	(+)	Ausência	(-)	
<i>D. subspicatus.</i>	(-)	Água	(-)	Presença	(+)	
Mescla Devon's	(+)	Água	(-)	Presença	(+)	
<i>D. subspicatus</i>	(-)	Meio	(+)	Presença	(+)	
Mescla Devon's	(+)	Meio	(+)	Presença	(+)	

#### 4.4.3 Análise Estatística dos dados

Todos os parâmetros estudados foram analisados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para assegurar a normalidade da distribuição dos dados. As diferenças foram testadas pelos testes de ANOVA e a associação linear das curvas de calibração para a padronização do método quantitativo de biomassa foi avaliada pelo teste de correlação de Pearson. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Todos os dados foram analisados utilizando o programa Statistica 10.0 (StatSoft Inc.USA).

## 4.5 ESTUDO 2: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CONFIGURAÇÃO ESTRUTURAL DO SISTEMA NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA

### 4.5.1 Delineamento Experimental

A fim de avaliar a influência em termos de produtividade entre os dois tipos de configuração adotados na churrascaria (sistema fechado e aberto), durante 21 dias de cultivo, foi realizado um planejamento fatorial  $2^2$  variando o inóculo utilizado (Variável 1) e o tipo de sistema (Variável 2) (Tabelas 7 e 8). Segundo resultados do Estudo 1, foram fixadas as variáveis adição de meio CHU e manteve-se a presença de fumaça.

**Tabela 7- Planejamento fatorial  $2^2$  para avaliação da configuração estrutural do sistema na produção de biomassa.**

Variável	(-)	(+)
<b>Configuração do Sistema</b>	Aberto	Fechado
<b>Microalga</b>	<i>D. subspicatus</i>	Mescla Devon's

**Tabela 8 – Matriz padrão para o planejamento experimental  $2^2$  do estudo 2**

Microalga	Nível	Sistema	Nível	Resposta
<i>D. subspicatus</i>	(-)	Aberto	(-)	Máxima produção de biomassa ( $P_{max}$ )
Mescla Devon's	(+)	Aberto	(-)	
<i>D. subspicatus</i>	(-)	Fechado	(+)	
Mescla Devon's	(+)	Fechado	(+)	

## 4.6 ESTUDO 3: ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DO SISTEMA FECHADO NA REMOÇÃO DE CARBONO

Para analisar o comportamento do sistema e a eficiência na remoção de carbono foram adotados dois métodos. O primeiro, baseado na quantificação dos gases (CO e CO<sub>2</sub>) na entrada e na saída do sistema fechado de cultivo (Fotobioreatores-Tipo Painel), antes e depois dos gases saírem do sistema de tratamento com microalgas respectivamente, e um segundo, que incluiu o cálculo

das formas de carbono inorgânico presentes no meio de cultivo a fim de estabelecer e, portanto, consumidas pelas microalgas.

O monitoramento e quantificação do CO e CO<sub>2</sub> foi feito pela empresa Similar-Tecnologia e Automação- localizada na Cidade de Curitiba (PR) que utiliza um analisador de gases de leitura contínua e princípio de medição por célula eletroquímica, que permite obter uma análise instantânea das condições de emissão e realiza um acompanhamento e interpretação temporal juntamente com os parâmetros de operação. Medições semanais por um período de 4 semanas foram realizadas, começando no dia da inoculação até o dia da recuperação celular. No dia de cada amostragem, o monitoramento e quantificação de CO e de CO<sub>2</sub> foi realizado minuto a minuto durante 10 minutos na entrada e na saída de ambos os fotobioreatores, do cultivo puro e do cultivo misto respectivamente. Este método encontra-se validado pela resolução N<sup>o</sup> 054/06- SEMA emitido pelo Governo de Paraná para o controle de emissões atmosféricas (PARANÁ, 2006).

Em campo, a média dos valores (entrada e saída) foi registrada e junto com a vazão do sistema ( $1292 \text{ N/m}^3\text{h}^{-1}$ ) e a massa molar do CO e CO<sub>2</sub> foi possível calcular a taxa de remoção desses gases pelo sistema em g de CO ou g de CO<sub>2</sub> por hora.

Já os cálculos para quantificar as formas e a proporção do carbono inorgânico no meio foram realizados a partir da determinação da alcalinidade ou a capacidade do sistema para tamponar ácidos utilizando o programa Alcagran.Bas (Carmouze 1994). Os valores foram reportados em micromol por Litro.

#### 4.7 ESTUDO 4: OTIMIZAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA POR CENTRIFUGAÇÃO

Para separar as células do meio de cultivo foi adotado o método físico de separação por centrifugação, no qual foi utilizado uma centrífuga não refrigerada (Excelsa II Modelo 206 BL) com capacidade máxima de 800 mL. Foram avaliados os tempos de centrifugação de 5, 8 e 10 minutos e velocidades de 2500, 2700 e 2900 rpm para ambas as microalgas, tendo como resposta o número de células.mL<sup>-1</sup> no sobrenadante, usando o método de contagem por câmara de Neubauer. No

experimento considerou-se como condição ótima de recuperação o menor número de células no sobrenadante.

#### 4.7.1 Delineamento experimental

O delineamento estatístico para a otimização do método de recuperação celular, para ambas as microalgas, pode ser visualizado nas Tabelas 9 e 10.

**Tabela 9-Planejamento fatorial  $3^2$  para avaliação do método de recuperação de biomassa para *D. subspicatus* e Mescla Devon's.**

Variável	(-)	0	(+)
Rotações por minuto (rpm)	2500	2700	2900
Tempo de Centrifugação (minutos)	5	8	10

**Tabela 10- Matriz padrão para o planejamento experimental  $3^2$  para *D. subspicatus* e M. Devon's do estudo 4**

Rpm	Nível	Minutos	Nível	Resposta
2500	(-)	5	(-)	No de células.mL <sup>-1</sup> no sobrenadante
2500	(-)	8	0	
2500	(-)	10	(+)	
2700	0	5	(-)	
2700	0	8	0	
2700	0	10	(+)	
2900	(+)	5	(-)	
2900	(+)	8	0	
2900	(+)	10	(+)	

## 4.8 ESTUDO 5: CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS MICROALGAS

### 4.8.1 Obtenção da biomassa liofilizada

As análises da composição bioquímica da biomassa seca foram realizadas no -LQBB- Laboratório de Químio/ Biotecnologia de Biomassa da Universidade Tecnologia Federal do Paraná (UTFPR), excetuando a quantificação protéica, feita



no Laboratório de Alimentos e Medicamentos no Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR).

A biomassa úmida após centrifugação otimizada no Estudo 4 foi colocada em tubos de ensaio plásticos e imediatamente congelada num freezer horizontal (CONSUL) a  $\pm 20^{\circ}\text{C}$ . A seguir, os tubos com a biomassa congelada foram transferidos para um liofilizador (Liobras, Modelo L101) até as amostras desidratarem completamente. Finalmente, a biomassa foi estocada no freezer a  $20^{\circ}\text{C}$  até o processamento e caracterização bioquímica.

#### 4.8.2 Extração e Caracterização de Lipídios Totais

A extração dos lipídios totais ocorreu segundo procedimento adaptado do método desenvolvido por Bligh e Dyer (1959).

Em frascos de vidro com capacidade para 6 mL colocou-se 200 mg de cada amostra liofilizada ( $R_1 = D. subspicatus$  e  $R_2 =$  Mescla Devon's ). A seguir, adicionou-se 2 mL de uma mistura de clorofórmio: metanol (2:1). Os frascos fechados foram submetidos a ultrassom (Unique, modelo USC-800A) em banho de água com gelo por três ciclos de oito min cada. Posteriormente, foram levados à chapa de aquecimento (Thermolyne, modelo Cimarec 3) até fervura incipiente (aproximadamente  $55^{\circ}\text{C}$ ) e finalmente centrifugados (CELM LS-3 plus) durante 20 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante da centrifugação foi recuperado com o auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro em recipiente metálico pré-tarado para completa evaporação dos solventes em chapa de aquecimento (Corning, modelo PC-351). Posteriormente, com o precipitado foi feita uma nova extração com 2 mL de uma mistura clorofórmio: metanol (1:2), um ciclo de oito min em ultrassom e chapa de aquecimento até fervura incipiente, seguida de centrifugação e evaporação dos solventes no mesmo recipiente metálico conforme descrito anteriormente. A seguir, foi realizada uma terceira extração utilizando 2 mL uma mistura de clorofórmio: metanol (1:1) e deixado *overnight* em geladeira. Novamente foi centrifugado e o sobrenadante recuperado no mesmo recipiente metálico para completa evaporação

dos solventes. Os recipientes metálicos contendo amostra foram pesados e o teor de lipídios foi determinado por gravimetria segundo Marsh e Weistein (1966).

#### 4.8.2.1 Caracterização e quantificação dos lipídios extraídos por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A caracterização dos lipídios foi realizada por Cromatografia em Camada Delgada (*Thin Layer Chromatography*) utilizando como fase estacionária uma placa de sílica-gel (Merck). A fase móvel utilizada foi composta por uma mistura de clorofórmio: metanol: água (65: 25: 4) num volume de 25 mL. As amostras foram recolhidas dos recipientes metálicos em viais (capacidade 4 mL) utilizando alíquotas de 500 µL de uma mistura de clorofórmio: metanol (1:1) num volume total de 2 mL. Como padrões foram utilizados: óleo de soja (50 mg/mL), ácido oléico (20 mg/mL), trioleína (20 mg/mL), ácido palmítico (50 mg/mL) e lecitina de soja (IMCOPA® = 20 mg/mL), todos preparados em isopropanol. As amostras e os padrões foram aplicados em forma de “banda”. Após a corrida em ascensão (8 cm até o *front*) da fase móvel, a placa foi seca e revelada com iodo e anisaldeído sulfúrico. Para a revelação com iodo, foi utilizada uma cuba de vidro saturada com cristais de iodo em chapa de aquecimento. Após o registro fotográfico, o iodo foi sublimado e a placa foi revelada com spray de anisaldeído sulfúrico, seguida de aquecimento em chapa para a revelação dos compostos presentes na amostra (STAHL, 1967).

#### 4.8.3 Determinação de Carboidratos Totais

A determinação de carboidratos foi realizada a partir das amostras deslipidificadas e hidrolisadas com ácido trifluoroacético (TFA). As amostras de 20 mg foram colocadas em viais (capacidade para 4 mL) e adicionados 2 mL de TFA 2 M. A seguir, os viais foram levados ao Banho Maria a 95°C durante três diferentes

tempos para cada amostra em vias independentes: 30, 60 e 120 minutos. Após as hidrólises ácidas, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 3000 rpm em uma centrífuga CELM LS-3 plus. O sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur e procederam-se as análises dos carboidratos totais pelo método do Fenol sulfúrico (DUBOIS, 1956) após diluição das amostras. As amostras diluídas (50 µL) foram colocadas em tubos de ensaio e completado o volume com água para 625 µL. A seguir, foi adicionado 400 µL de fenol 5 % e um jato de 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, totalizando um volume de 3525 µL. As amostras foram deixadas em repouso em temperatura ambiente por 15 minutos e as absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu, modelo UV-1650PC) em 490 nm. As determinações dos açúcares totais foram feitas a partir de uma curva analítica de glicose na faixa de concentração de 10 a 100 µg/ensaio.

#### 4.8.3.1 Caracterização e quantificação dos carboidratos extraídos por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A caracterização dos carboidratos por realizada por CCD utilizando como fase estacionária uma placa de sílica-gel (Merck). A fase móvel utilizada foi composta por 25 mL de uma mistura de Acetonitrila: Isopropanol : água (15:3:5). Os padrões utilizados foram: Arabinose, Xilose, Celobiose, Galactose, Manose e Glucose a  $10\text{mg.L}^{-1}$ , e Rahanose a  $20\text{mg.L}^{-1}$ , todos preparados em isopropanol . As amostras e os padrões foram aplicados em forma de “banda” utilizando dois *spots*, sendo que para as amostras também foram aplicadas com apenas um spot para representar a amostra menos concentrada. Após a corrida em ascensão (8 cm até o front) da fase móvel, a placa foi seca e revelada com Orcinol (Acido orselinico) seguida de aquecimento em chapa para a revelação dos compostos presentes na amostra (STAHL, 1967).

#### 4.8.4 Determinação de Proteínas Totais

A análise de proteína foi realizada no Laboratório de Alimentos e medicamentos no TECPAR seguindo o método de pelo Método de Rittenberg Kjeldahl (1948). Neste, as proteínas e outros compostos nitrogenados são decompostos na presença do ácido sulfúrico concentrado à quente e catalisadores com produção de sulfato de amônia. O sulfato de amônia resultante, na presença de solução concentrada de hidróxido de sódio, libera  $\text{NH}_3$ , que é recebido na solução de ácido bórico. A amônia ( $\text{NH}_3$ ), na solução de ácido bórico, é titulada com ácido sulfúrico de título conhecido e, assim determina-se o teor de nitrogênio do material (Equação 5).

A determinação de proteínas foi realizada a partir de amostras liofilizadas nas condições otimizadas dos cultivos da *M. Devon's* e *D. subspicatus*. Onde, 0,5(±0,1) g do material foram pesadas e homogeneizadas sobre papel de cigarro. Após pesagem, foi transferido ao tubo de digestão Kjeldahl (Sistema Büchi Auto Kjeldahl Unit K – 370) e em capela com exaustão foi adicionada uma pastilha catalizadora e 10 mL de ácido sulfúrico concentrado. Logo, as amostras foram submetidas à digestão até se tornarem límpidas dando assim, fim ao processo. A quantificação de proteínas totais (Equação 6) realizou-se a partir do resultado do nitrogênio total, valor, multiplicado por o fator de correção protéico utilizado para a determinação de proteínas vegetais (5,75) segundo a AOAC (*Official methods of Analysis* 18ª Ed., 2005).

$$\text{Nitrogênio total} \left( \frac{g}{100g} \right) = \frac{1,401(Va-Vb)*N*Fc}{m} \quad (\text{Equação 5})$$

$$\text{Proteínas Totais} \left( \frac{g}{100} \right) = \text{Nitrogênio total} * F \quad (\text{Equação 6})$$

Onde:

Va = Volume da solução de ácido sulfúrico para titulação do material (mL).

Vb = Volume da solução de ácido sulfúrico para titulação do branco (mL).

N = Normalidade da solução de ácido sulfúrico.

Fc = Fator de correção da solução de ácido sulfúrico.

m = Massa do material (g) ou volume do material (mL).

F = Fator de conversão para teor protéico (5,75)

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ESTUDO 1: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FUMAÇA, ADIÇÃO DE MEIO DE CULTIVO E TIPO DE INOCULO UTILIZADO

#### 5.1.1 Padronização do método quantitativo de biomassa

Para padronizar o método de quantificação celular, a absorbância foi correlacionada com as análises de peso seco ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e clorofila-a ( $\text{mg.m}^{-3}$ ) conforme a metodologia descrita nos itens 4.3.1.1 e 4.3.1.2. Na Tabela 11 estão apresentados os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) cujos gráficos podem ser visualizados no APÊNDICE-A.

**Tabela 11-Coefficientes de determinação ( $R^2$ ) peso seco e clorofila-a vs absorbância (682nm)**

<b>Experimento</b>	<b><math>R^2</math> chl-a vs Abs.</b>	<b><math>R^2</math>- Peso Seco vs Abs.</b>
Mescla Devon's+ Fumaça	0,9865	0,9654
Mescla Devon's+ Fumaça +Meio CHU	0,9891	0,9721
<i>D. subspicatus</i> + Fumaça+ Meio CHU	0,9898	0,9774
<i>D. subspicatus</i> + Fumaça	0,9836	0,9618
<i>D. subspicatus</i>	0,9655	0,6873
Mescla Devon's+ Meio CHU	0,9985	0,8996
Mescla Devon's	0,9622	0,8739
<i>D. subspicatus</i> +Meio CHU	0,9887	0,8544

Os resultados mostrados na Tabela 11 demonstraram que os métodos de quantificação celular utilizados na pesquisa, peso seco e clorofila-a apresentam uma alta correlação com a absorbância. Contudo, a análise de clorofila-a apresentou uma melhor correlação em todos os experimentos com  $R^2$  que variou de 0,962 a 0,998. Já para o peso seco o valor de  $R^2$  variou de 0,687 a 0,977, método de quantificação útil especialmente quando a concentração celular é alta.

Segundo NUSH (1980), embora a porcentagem de clorofila varie entre as células (aproximadamente 1,5-2%), este é um método considerado confiável para a quantificação de microalgas verdes (SAKSHAU, 1981), visto que responde de acordo com o estado fisiológico das células, principal limitação das análises de absorbância e peso seco.

Contudo, cabe salientar que existem outros métodos de medida da densidade ou concentração dos cultivos. São exemplo, o contador automático de partículas (*Coulter counter*®) e o microscópio usando Câmara de Neubauer. Sendo que, contadores automáticos permitem uma contagem rápida, enquanto que a contagem no microscópio é demorada, mas possibilita ao mesmo tempo a observação do estado das microalgas (KNIE; LOPES, 2004).

#### 5.1.2 Monitoramento da concentração de O<sub>2</sub> e o pH no sistema aberto de cultivo.

O monitoramento das variáveis físicas no sistema aberto de cultivo foi realizado conforme o item 4.4.1 durante 30 dias de cultivo. A temperatura média nesse período foi de 20°C e a intensidade luminosa média de 9800 lux. Os outros valores dos parâmetros monitorados no sistema aberto dos cultivos da Mescla Devon's e *D. subspicatus* podem ser visualizados nas Tabelas 17 e 18, respectivamente.

Em relação à concentração de O<sub>2</sub> (Figuras 10 e 11) no meio de cultivo, medições mostraram oscilações entre 6,6 mg.L<sup>-1</sup> e 11,31 mg.L<sup>-1</sup> para M. Devon's e de 6,8 e 10,76 para *D. subspicatus* sendo que, as maiores concentrações observadas desse gás, estiveram aos 20 dias em todos os experimentos, indicando uma alta atividade fotossintética dos organismos presentes no meio de cultivo.

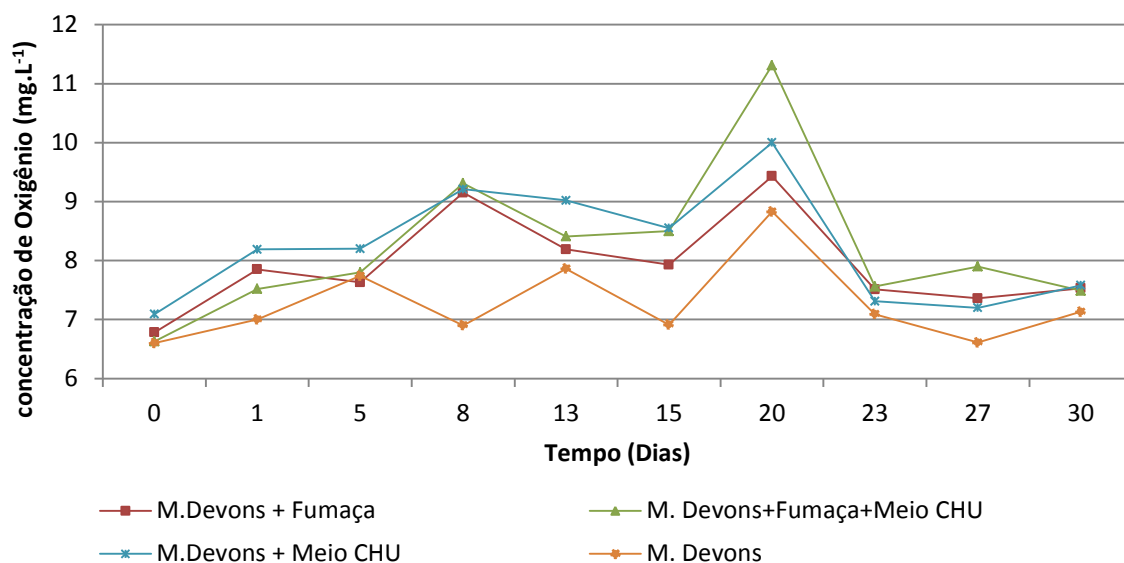


Figura 10- Acompanhamento da concentração do O<sub>2</sub> (mg.L<sup>-1</sup>) no estudo 1 no sistema aberto de cultivo (caixas) para a Mescla Devon's.

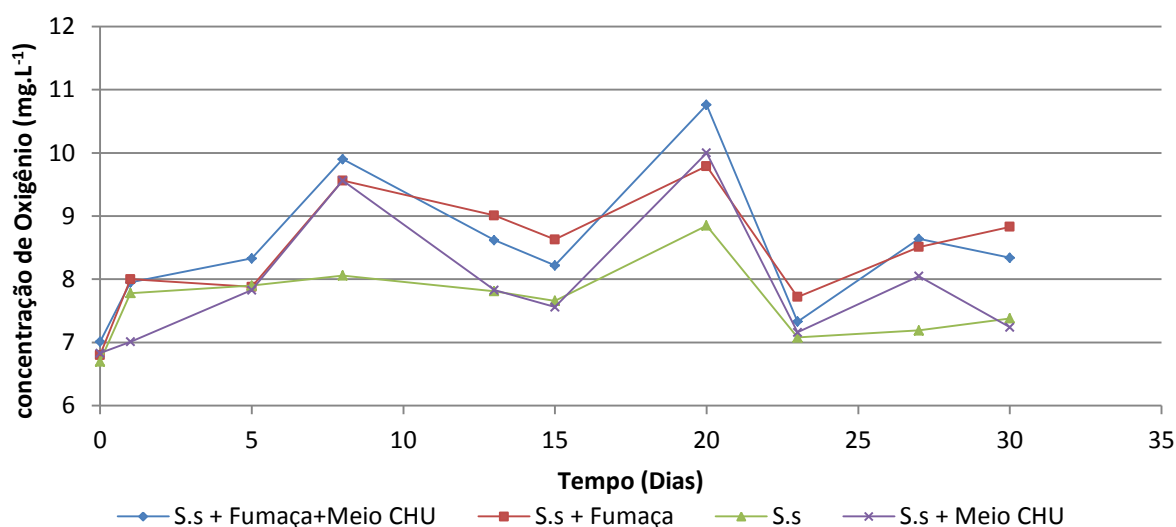


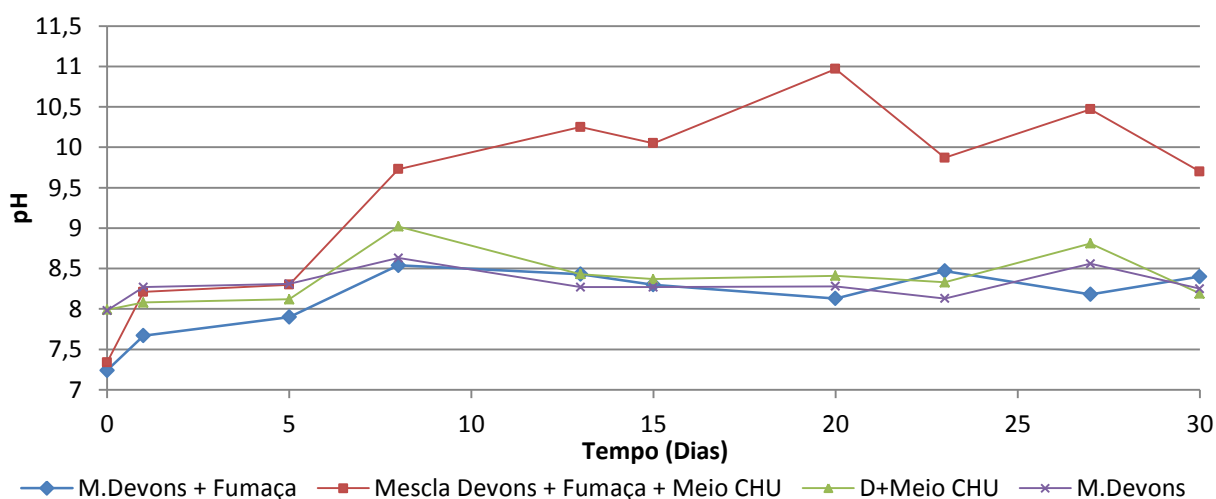
Figura 11- Acompanhamento da concentração do O<sub>2</sub> (mg.L<sup>-1</sup>) no estudo 1 no sistema aberto de cultivo (caixas) para *Desmodesmus subspicatus*

O monitoramento e a determinação da concentração de O<sub>2</sub> são importantes já que valores acima de 35 mg.L<sup>-1</sup> de O<sub>2</sub> são considerados tóxicos para a maioria das microalgas (CARVALHO et al., 2006). Fato relacionado segundo Hiroyama et al. (1996), já que a presença da luz e de oxigênio (subproduto da fotossíntese)

promovem um efeito conhecido como foto-oxidação ou morte oxidativa nas microalgas.

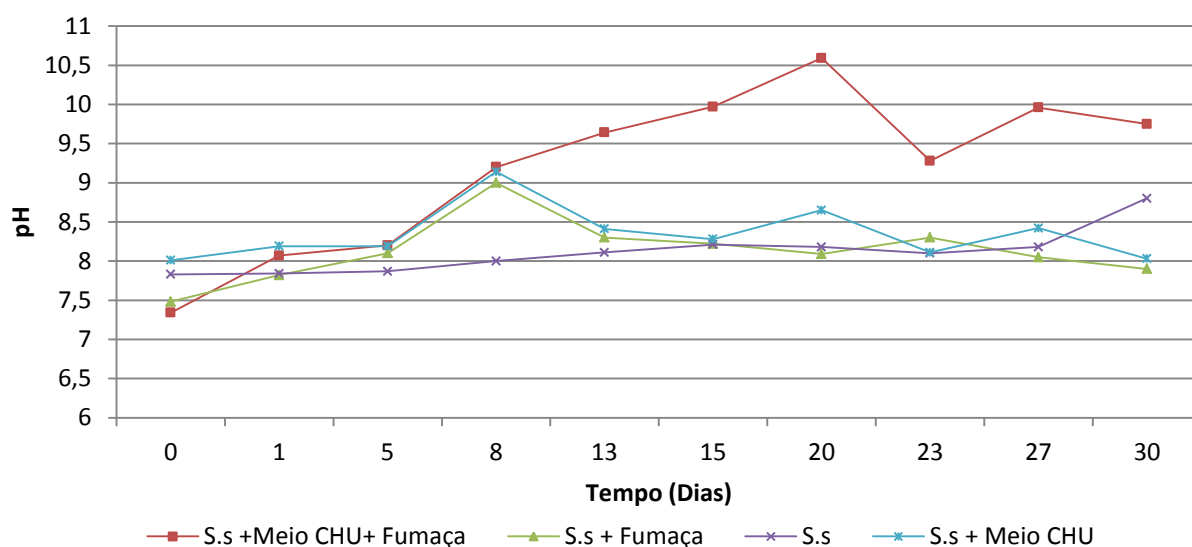
A eficiência do mecanismo de agitação também pode ser avaliada segundo Richmond et al. (1993) mediante a determinação das concentrações de oxigênio no cultivo. Segundo os autores, um adequado mecanismo de agitação ou mistura diminui o risco de supersaturação do  $O_2$  e a subsequente foto-oxidação celular. Uma vez que nos experimentos os valores reportados da concentração de oxigênio estiveram abaixo dos  $35 \text{ mg.L}^{-1}$  de oxigênio, descarta-se assim uma possível inibição do crescimento por saturação desse gás ao longo dos cultivos.

Em relação ao pH, o pH dos cultivos da *M. Devon's* (Figura 12) oscilou entre 7,24 alcançando ao longo do cultivo valores de até 11,00, este último correspondente à adição de meio de cultura CHU e presença de fumaça. Já, no caso das unidades experimentais utilizando o inóculo de *D. subspicatus* (Figura 13), o valor mínimo reportado foi de 7,34 e o máximo foi de 10,59 sendo este, no cultivo onde houve adição de meio de cultura CHU e presença de fumaça.



**Figura 12-** Acompanhamento do pH nas culturas da *M. Devon's* em sistema aberto (caixas) durante a realização do estudo 1.





**Figura 13- Acompanhamento do pH nas culturas de *D. subspicatus* em sistema aberto (caixas) durante a realização do Estudo 1.**

Segundo Esteves (1988), em meio aquoso, o carbono inorgânico pode estar na forma de  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{CO}_3$  (ácido carbônico),  $\text{HCO}_3^-$  (bicarbonato) ou  $\text{CO}_3^{2-}$  (carbonato) cujas proporções dependem do pH. Conforme aumenta o valor do pH (alcalinização) as proporções de bicarbonato e carbonato aumentam no meio de cultura. Ao analisar as oscilações nos valores do pH notou-se que os valores no começo dos cultivos estiveram perto de neutralidade mas, ao longo do cultivo foram aumentando, indicando a alcalinização do meio. Fato, diretamente relacionado com a atividade fotossintética das microalgas que ocasiona um aumento no pH do médio promovendo que carbono inorgânico (que entra em forma de  $\text{CO}_2$  e CO na fumaça) se biodisponibilize nas formas de carbonato e bicarbonato. Segundo Soares-Gomes e Figueiredo (2002), esta é a razão principal pela qual as formas mais abundantes no oceano sejam o bicarbonato e o carbonato, cujo pH oscila entre 8,2 e 8,6.

### 5.1.3 Quantificação de Nutrientes e Velocidade de Consumo

Para exemplificar o consumo de nutrientes foi avaliada a taxa de consumo de nitrato e ortofosfato com e sem adição de meio CHU. Nas Figuras 14 e 15 observou-se

uma relação inversamente proporcional entre o crescimento celular expresso em clorofila-a e o consumo, esgotamento e/ou disponibilidade destes nutrientes no meio. No caso da pesquisa realizada, o mesmo comportamento foi observado, indiferentemente se houve ou não adição de meio de cultivo.

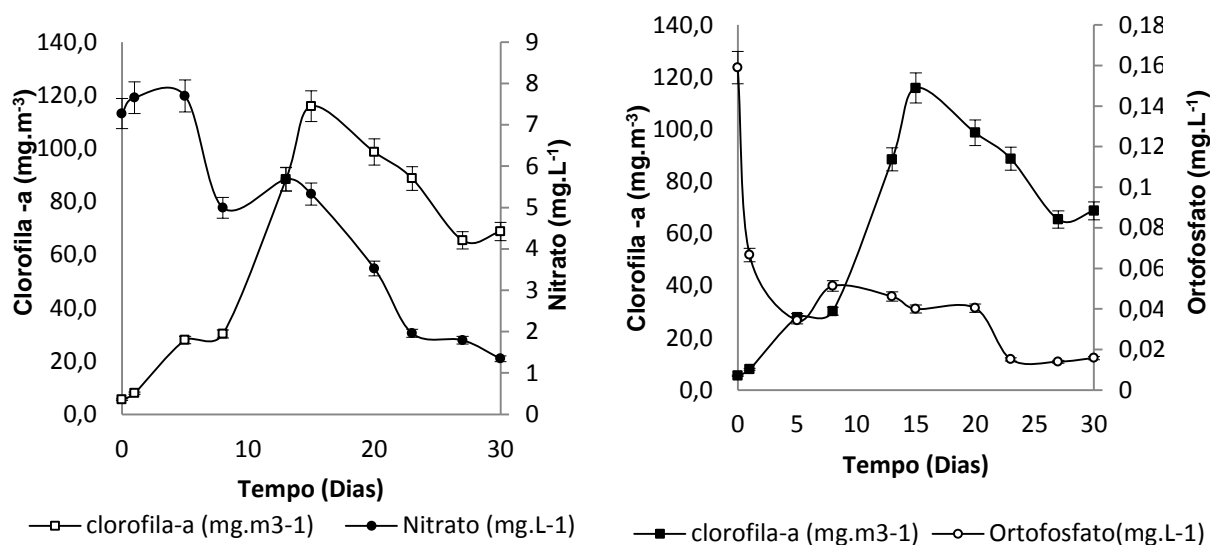


Figura 14-Correlação entre a concentração de nitrato e ortofosfato ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) com chl-a ( $\text{mg.m}^{-3}$ ) para *D. subspicatus* + fumaça durante o estudo 1 no sistema aberto de cultivo

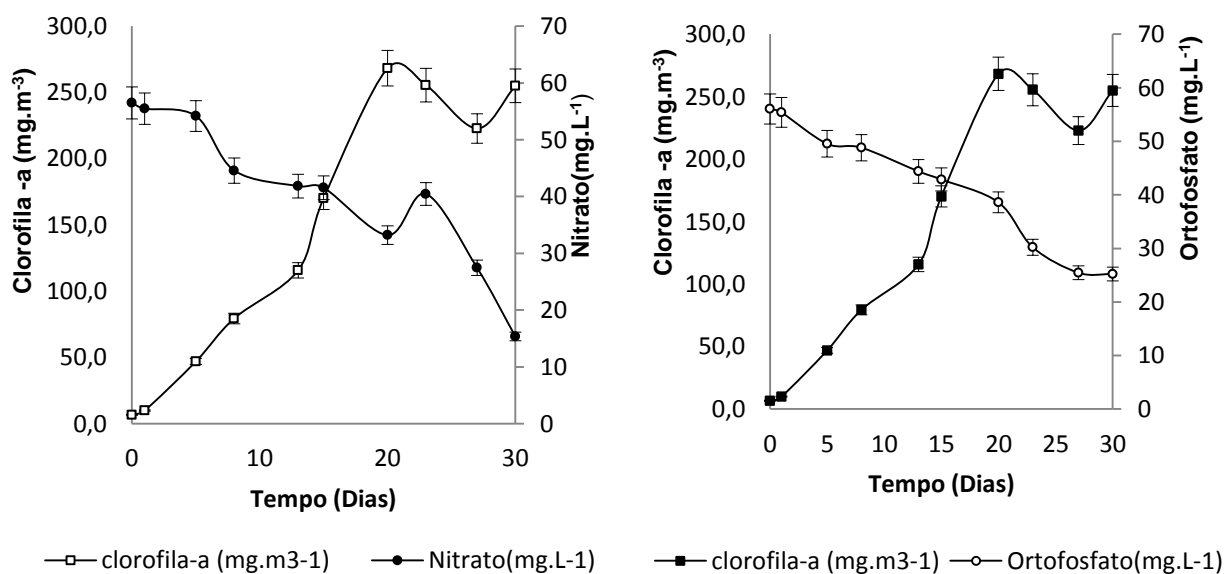


Figura 15-Correlação entre a concentração de nitrato e ortofosfato ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) com a chl-a ( $\text{mg.m}^{-3}$ ) para *D. subspicatus* + fumaça+ Meio CHU durante o estudo 1 no sistema aberto de cultivo

Segundo Lourenço (2006), o ortofosfato e o nitrato são as fontes de nitrogênio e de fósforo mais utilizadas pelas microalgas. Segundo o autor, o nitrato é a forma de nitrogênio de mais fácil utilização, enquanto o ortofosfato é a forma mais estável de fósforo presente na água.

Para o inóculo *M. Devon's* e *D. subspicatus* com adição de meio de cultivo CHU, foi determinado um consumo de nitrato e de ortofosfato de 1,38 mg.L<sup>-1</sup> e 1,67 mg.L<sup>-1</sup> e de 1,10 mg.L<sup>-1</sup> e 1,80 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Para a Mescla *Devon's* e para *D. subspicatus* a relação nitrogênio: fósforo foi de 1:0,82 (N:P) e para *D. subspicatus* foi de 1:0,61 (N:P). A partir desta relação foi possível inferir que o ortofosfato foi o nutriente limitante no crescimento celular para ambos os cultivos de microalgas com adição de meio CHU.

Ao analisar o consumo de nitrato e de ortofosfato para a *M. Devon's* e para *D. subspicatus* sem adição de meio de cultivo foi observado o consumo de nitrato e ortofosfato de 0,1720 e 0,00134 e de 0,046 e de 0,0152 mg.L<sup>-1</sup> respectivamente para cada dia de cultivo. A relação de consumo neste caso foi de 1:128 (N:P) para a *M. Devon's* e de 1:4,37(N:P) para *D. subspicatus*.

Análises de consumo de nutrientes são realizadas a fim de promover a síntese de algum metabólito de interesse. A síntese de lipídios em algumas espécies de microalgas depende da concentração de nitrogênio no meio, Costa et al. (2000) destacam que uma baixa concentração estimula o acúmulo intracelular nesses organismos.

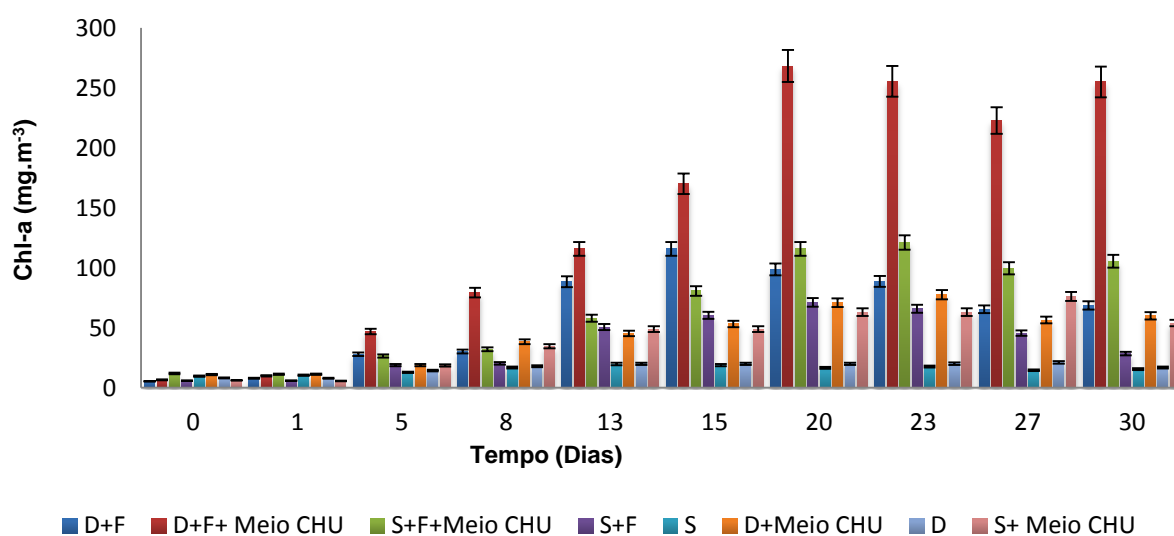
Xin et al. (2010) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo sobre o crescimento e acumulação de lipídios em *Scenedesmus* sp. e observaram que é possível incrementar o seu teor lipídico entre 30% e 53% cultivando-a em condições de estresse nutricional, isto é, com baixa concentração de nitrogênio (2,5 mg.L<sup>-1</sup>) e fósforo (0,1 mg.L<sup>-1</sup>).

#### 5.1.4 Parâmetros cinéticos de crescimento.

##### 5.1.4.1 Densidade Celular Máxima (DCM)

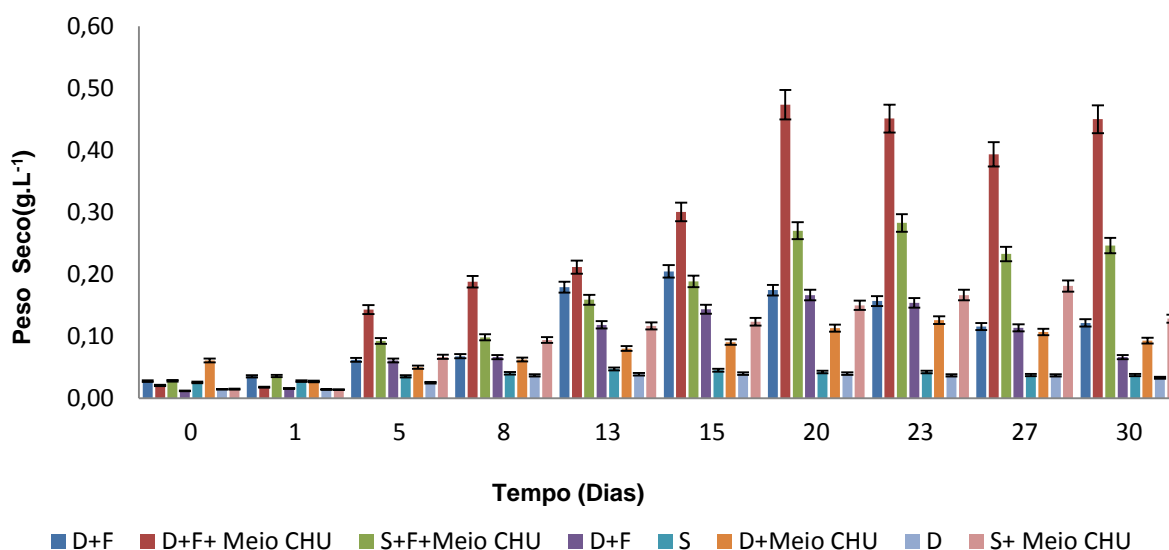
A densidade celular máxima (DCM) permite analisar a produção de biomassa em tratamentos diferenciados visando estabelecer o melhor tempo de recuperação celular para cada unidade experimental. Esse parâmetro, acompanhado de parâmetros cinéticos tais como a  $P_{max}$  e a  $\mu_{max}$  são amplamente utilizados para avaliar o desempenho ou comportamento do crescimento celular de um determinado organismo em condições específicas de cultivo, auxiliando na análise das melhores condições segundo os objetivos da pesquisa.

Nas Figuras 16 e 17 pode ser visualizado o comportamento das unidades experimentais e as concentrações máximas atingidas ao longo dos 30 dias em regime aberto de cultivo (caixas), ressaltando que as maiores foram apresentadas pelos cultivos com adição de meio CHU e presença de fumaça.



**Figura 16- Densidade celular máxima expressa em chl-a ( $\text{mg.m}^{-3}$ ) observado no sistema aberto de cultivo durante o estudo 1.**

Nota: D: Mescla Devon's/ S: *D. subspicatus*/F: fumaça



**Figura 17- Densidade celular máxima expressa em peso seco (g.L<sup>-1</sup>) observado no sistema aberto de cultivo durante o estudo 1.**

Nota: D: Mescla Devon's/ S: *D. subspicatus*/ F: fumaça

A *M. Devon's* apresentou um valor de 268 mg.m<sup>-3</sup> expresso em clorofila-a ou de 0,473 g.L<sup>-1</sup> em peso seco aos 20 dias de cultivo. Já *D. subspicatus* mostrou uma concentração de 121,1 mg.m<sup>-3</sup> de clorofila-a ou 0,283 g.L<sup>-1</sup> em peso seco aos 23 dias de cultivo. Quantitativamente o cultivo com a *M. Devon's* foi 1,7 vezes superior ao cultivo com *D. subspicatus*.

Entretanto, os cultivos nos quais não foi adicionado meio de cultivo e não estiveram expostos à presença de fumaça reportaram valores de DCM de 19,81 e 20,01 mg.m<sup>-3</sup> de clorofila-a e 0,047 e 0,040 g.L<sup>-1</sup> de biomassa em peso seco aos 15 dias e cultivo, respectivamente.

Esses resultados mostram que existe efetivamente um processo de adaptação das microalgas a ambientes em presença de gases subprodutos da queima do carvão vegetal destacando ainda mais a sua versatilidade metabólica em condições não usuais de cultivo. No experimento observou-se que existe sim uma dependência de ambos os inóculos por uma fonte externa de carbono no caso, do CO e CO<sub>2</sub> oferecido pela fumaça da churrasqueira permitindo-lhes atingir concentrações celulares maiores, isto, em comparação aos cultivos onde foi adicionado meio CHU, mas, não fumaça.

Na Tabela 12 são apresentados os parâmetros cinéticos de crescimento  $\mu_{\max}$  e  $P_{\max}$ , avaliados em clorofila-a e peso seco para todas as unidades experimentais em regime aberto de cultivo.

**Tabela 12 – Resultados da  $\mu_{\max}$  e  $P_{\max}$  em peso seco e clorofila-a**

Microalga	Meio	Fumaça	$\mu_{\max}$ Clorofila-a (d <sup>-1</sup> )	$P_{\max}$ Clorofila-a (mg.m <sup>-3</sup> )	$P_{\max}$ Peso seco (mg.L <sup>-1</sup> )
<i>D. subspicatus</i> .	Água	Ausência	0,0238	0,7771	1,7
Mescla Devon's	Água	Ausência	0,0299	0,7873	1,8
<i>D. subspicatus</i> .	M.CHU	Ausência	0,0404	2,5933	1,6
Mescla Devon's	M.CHU	Ausência	0,0403	2,8924	2,8
<i>D. subspicatus</i> .	Água	Presença	0,0671	3,2656	7,8
Mescla Devon's	Água	Presença	0,0891	4,7455	11,1
<i>D. subspicatus</i> .	M.CHU	Presença	0,0779	7,3551	12,5
Mescla Devon's	M.CHU	Presença	0,0927	13,0817	22,6

Os parâmetros cinéticos foram calculados na fase exponencial de crescimento antes do cultivo atingir a fase de declínio. Lembrando que, a velocidade máxima específica de cultivo ( $\mu_{\max}$ ) calculado a partir da clorofila-a apresentou uma melhor correlação linear com a absorvância a 682nm.

Segundo os resultados foi possível observar que a melhor velocidade de crescimento foi apresentada em cultivos com fumaça e meio de cultivo, sendo que M. Devon's mostrou um valor de  $\mu_{\max}$  de 0,0927d<sup>-1</sup>, enquanto que a da espécie *D. subspicatus* foi de 0,077d<sup>-1</sup> nessas condições de cultivo. Já nas unidades experimentais onde não houve presença de fumaça nem adição de meio de cultura foram calculados valores de  $\mu_{\max}$  para m. Devon's e *D. subspicatus* de 0,0299 d<sup>-1</sup> e de 0,0238 d<sup>-1</sup>, respectivamente. Consequentemente, a  $P_{\max}$  da M. Devon's mostrou que um meio alimentado com fumaça e meio de cultivo desenvolve uma taxa de produção de biomassa em peso seco de 22,6 mg.L<sup>-1</sup> diferentemente da *D. subspicatus* que atinge uma  $P_{\max}$  de 12,5 mg.L<sup>-1</sup>, valor 1,28 vezes menos que a M. Devon's em regime aberto de cultivo.

Esses resultados sugerem a M. Devon's como o inóculo com melhor desempenho em condições abertas de cultivo. Não obstante, a microalga *D. subspicatus* também mostrou uma capacidade de colonização, adaptação e crescimento nessas condições. Embora possuam velocidades específicas de

crescimento, ambas as microalgas demonstraram que podem ser utilizadas em sistemas de tratamentos biológicos de poluentes atmosféricos industriais, onde além de CO e CO<sub>2</sub> subprodutos tóxicos, como SO<sub>x</sub> e NO<sub>x</sub>, estão presentes em menores concentrações.

Para a ANOVA foi considerando o P<sub>max</sub> (mg.m<sup>-3</sup>) (Tabela 13) calculado a partir de Clorofila-a, método que apresentou uma melhor correlação linear com a absorvância.

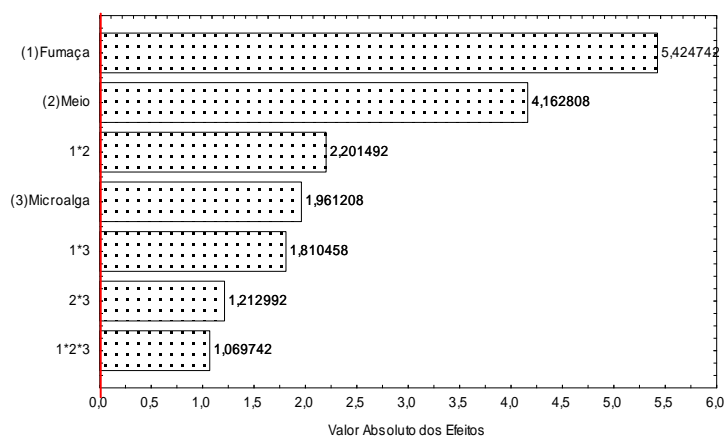
**Tabela 13 – ANOVA da P<sub>max</sub> (Chl-a) para a avaliação dos efeitos da fumaça, meio de cultivo e microalga.**

Variável	SQ	G.L.	MQ	F	p
(1) Fumaça	176,5669	1	176,5669	7605,389	<0,0001
(2) Meio	103,9738	1	103,9738	4478,537	<0,0001
(3) Microalga	23,0780	1	23,0780	994,056	<0,0001
1*2	29,0794	1	29,0794	1252,557	<0,0001
1*3	19,6666	1	19,6666	847,111	<0,0001
2*3	8,8281	1	8,8281	380,259	<0,0001
1*2*3	6,8661	1	6,8661	295,748	<0,0001
Erro Puro	0,3715	16	0,0232		
Total SQ	368,4304	23			

Nota: SQ – Soma dos Quadrados / MQ – Média dos Quadrados / GL – Graus de Liberdade

Segundo os valores de p (Tabela 13) foi possível observar um efeito significativo de todos os fatores analisados sobre o crescimento celular. Observou-se também que houve significância para as interações secundárias e terciárias, confirmados por valores de  $F_{1,16} > 6,12$  ( $p < 0,0001$ ).

Para quantificar o efeito dos fatores sobre a variável resposta foi construído um gráfico de Pareto, contendo os valores calculados para cada variável e suas interações (Figura 18).



**Figura 18-Gráfico de Pareto para o efeito da fumaça, adição de meio de cultivo e inoculo sobre a produção de biomassa em sistema aberto de cultivo.**

Analisando o gráfico de Pareto na Figura 18 observou-se que entre todas as variáveis testadas nos experimentos a presença de fumaça teve um efeito mais significativo na produção de biomassa (variável resposta) em comparação às outras variáveis qualitativas: adição de meio de cultivo e tipo de microalga. Tal resultado aponta que efetivamente o carbono é um componente limitante do crescimento e que sua presença maximiza ou exerce um efeito positivo na produção de biomassa.

Em segundo lugar, está a adição do meio de cultivo, o que é razoável partindo do fato de que além de uma fonte de carbono as microalgas precisam uma fonte de nitrogênio e de fósforo além de elementos traço oferecidos pelo meio de cultivo. O tipo de inóculo empregado exerce também um efeito significativo na produção de biomassa.

Analisando de forma paralela com os parâmetros cinéticos avaliados na pesquisa e apresentados na Tabela 12, observou-se que na ausência de fumaça e sem adição de meio CHU, a  $\mu_{\max}$  foi de  $0,0238 \text{ d}^{-1}$ , a  $P_{\max}$  de  $0,7771 \text{ mg.m}^{-3}$  de chl-a ou  $1,7 \text{ mg.L}^{-1}$  para *D. subspicatus* e de  $0,0299 \text{ d}^{-1}$ ,  $0,7873 \text{ mg.m}^{-3}$  de chl-a ou  $1,8 \text{ mg.L}^{-1}$  para a Mescla Devon's. Estes valores foram inferiores em relação aos reportados em cultivos com adição de meio CHU e presença de fumaça onde *D. subspicatus* apresentou uma  $\mu_{\max}$   $0,0779 \text{ d}^{-1}$ ,  $P_{\max}$  de  $7,3551 \text{ mg.m}^{-3}$  expresso em chl-a ou de  $12,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de biomassa seca. Já a M. Devon's nessas mesmas condições apresentou uma  $\mu_{\max}$  de  $0,0927 \text{ d}^{-1}$ ,  $13,08 \text{ mg.m}^{-3}$  de chl-a ou de  $22,6 \text{ mg.L}^{-1}$  por dia de cultivo na fase exponencial de crescimento.

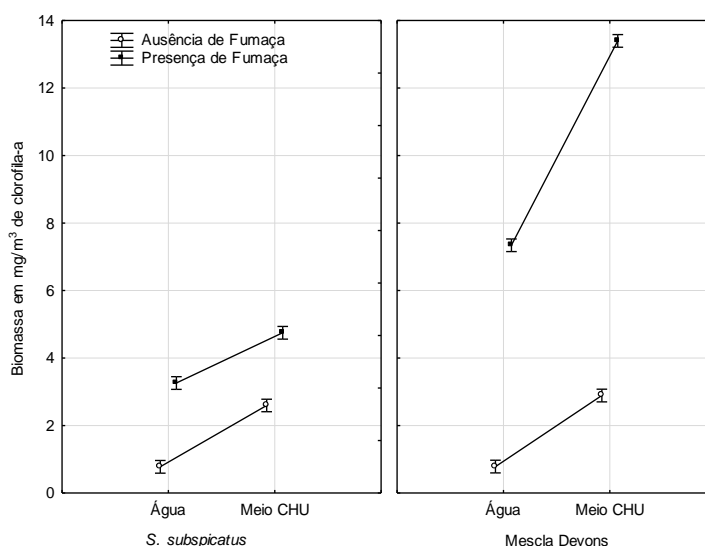
Esses dados apresentam concordância com a informação reportada por Ishida et al. (2000) que afirmam que a baixa disponibilidade de carbono pode causar limitação do crescimento microalgal e que meios com adição de  $\text{CO}_2$  podem aumentar até 7 vezes a produtividade dos mesmos.

Ao comparar a informação do gráfico de Pareto, que indicou a adição de fumaça como a variável mais significativa na produção de biomassa, observou-se também a sua correlação com a DCM alcançada nos cultivos. O cultivo de *D. subspicatus* sem adição de meio CHU mostrou que, com e sem fumaça, atinge uma DCM de  $71,25 \text{ mg.m}^{-3}$  e  $16,71 \text{ mg.m}^{-3}$  de chl-a ou em peso seco de  $0,166 \text{ g.L}^{-1}$  e de  $0,047 \text{ g.L}^{-1}$  aos 20 dias de cultivo, com um incremento de 3,53 vezes. Já a M. Devon's apresentou um aumento de cerca de 4 vezes, com uma concentração



máxima celular de 20,08 de  $\text{mg.m}^{-3}$  quantificada em chl-a ou de 0,050  $\text{g.L}^{-1}$  em biomassa seca, sem adição de fumaça e 115,85  $\text{mg.m}^{-3}$  em chl-a ou de 0,204  $\text{g.L}^{-1}$  aos 15 dias de cultivo.

O gráfico de médias (Figura 19) permite observar o efeito da fumaça e do meio de cultivo no crescimento de ambos inóculos. O gráfico indica que a presença da fumaça e do meio de cultivo CHU favoreceram a produção de biomassa em  $P_{\text{max}}$  clorofila ( $\text{mg.m}^{-3}$ ) nos sistemas abertos de cultivo para ambas as microalgas. Entretanto, a *M. Devon's* que já estava adequada ao sistema biológico de tratamento de fumaça, apresentou resultados em biomassa superiores em comparação aos resultados apresentados para a microalga *D. subspicatus*.



**Figura 19 - Médias da biomassa em  $P_{\text{max}}$  (chl-a) em função do meio de cultivo, fumaça e microalga**

O gráfico de médias (Figura 19) mostrou que a presença de fumaça no meio exerce um efeito mais significativo na produção de biomassa na *M. Devon's* que em *D. subspicatus*, fato relacionado ao maior tempo de exposição de dito inóculo aos gases presentes na fumaça. Os dados mostram que a *M. Devon's* apresentou uma  $\mu_{\text{max}}$  de  $0,0927 \text{ d}^{-1}$ ,  $P_{\text{max}}$  de  $13,08 \text{ mg.m}^{-3}$  de chl-a ( $22,6 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e uma DCM de  $268 \text{ mg.m}^{-3}$  ( $0,473 \text{ g.L}^{-1}$ ) aos 20 dias de cultivo. Estes resultados são superiores em comparação aos obtidos por *D. subspicatus*, cuja  $\mu_{\text{max}}$  foi de  $0,077 \text{ d}^{-1}$ ,  $P_{\text{max}}$  de  $7,35 \text{ mg.m}^{-3}$  de chl-a ( $12,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e DCM de  $121,1 \text{ mg.m}^{-3}$  de chl-a aos 23 dias de cultivo. Neste contexto é importante destacar que a *M. Devon's* foi isolada pela primeira vez da lagoa da Praça do Passeio Público (Curitiba-PR), cujo corpo de

água apresenta características de um ambiente eutrofizado e é hoje resultado de um processo de especiação e adaptação de espécies nessas condições específicas de cultivo. Contudo, *D. subspicatus* depois de tal adaptação poderia também apresentar um crescimento ou produção de biomassa talvez maior.

Além das condições físicas, químicas do cultivo e as características metabólicas inerentes a cada espécie, o regime de cultivo (aberto ou fechado) também condiciona, limitando ou promovendo o crescimento celular, razão pela qual, no Estudo 2 foi avaliado o efeito da configuração estrutural na produção de biomassa e nos parâmetros cinéticos de crescimento.

## 5.2 ESTUDO 2: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CONFIGURAÇÃO ESTRUTURAL DO SISTEMA CINÉTICA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE BIOMASSA.

### 5.2.1 Padronização do Método de Quantificação de Biomassa

Para cada conjunto de experimentos foi necessário realizar uma curva analítica de correlação linear entre a absorbância (682nm) e as análises de peso seco e chl-a. Os coeficientes de correlação linear ( $R_2$ ) podem ser visualizados na Tabela 14, cujas curvas e equações da reta podem ser observadas no Apêndice A.

**Tabela 14-Coeficiente de correlação ( $R^2$ ) para peso seco ( $g \cdot L^{-1}$ ) e clorofila-a ( $mg \cdot m^{-3}$ ) vs absorbância (682nm) nos sistemas fechado e aberto de cultivo**

Sistema	Método de quantificação	Coeficiente de correlação ( $R^2$ )	
		<i>D. subspicatus</i>	Mescla Devon's
Aberto	Peso seco ( $g \cdot L^{-1}$ )	0,9965	0,9922
	Clorofila-a ( $mg \cdot m^{-3}$ )	0,9971	0,985
Fechado	Peso seco ( $g \cdot L^{-1}$ )	0,9774	0,9721
	Clorofila-a ( $mg \cdot m^{-3}$ )	0,9898	0,9881

Ao comparar os métodos de quantificação com a absorbância a 682nm, observou-se que efetivamente há boa correlação entre os métodos empregados.

Chiu et al. (2008) também quantificaram a concentração celular por peso seco para cultivos de *Chlorella* sp, cujo  $R^2$  foi de 0,997, mas indicaram a ampla susceptibilidade do método a erros analíticos. Bjerk (2012) fez também análise por

peso seco para medir a concentração celular em um cultivo misto com varias espécies de microalgas reportando um  $R^2=0,999$ , resultado muito próximo aos obtidos nesta pesquisa.

### 5.2.2 Monitoramento do Sistema de Cultivo

As Tabelas 15 a 18 registram as variações encontradas nos parâmetros físicos para as microalgas *D. subspicatus* e *M. Devon's* em presença de fumaça, adição de meio CHU nos regimes aberto e fechado de cultivo.

**Tabela 15-Variação dos parâmetros físicos no sistema fechado para *D. subspicatus***

Dia Cultivo	OD (mg.L <sup>-1</sup> )	pH	T (°C)	Tds (g.L <sup>-1</sup> )	Int. Luminosa (lux)
0	6,83	7,34	24,42	0,537	34600
1	6,85	8,21	24,67	0,543	28900
4	6,27	8,30	24,69	0,559	30200
5	8,6	9,2	23,05	0,553	25600
7	10,15	9,64	13,64	0,571	23400
11	10,08	9,99	20,51	0,560	28000
14	10,97	10,05	17,1	0,534	23400
18	11,7	10,18	16,49	0,549	28600
21	11,42	10,36	15,43	0,523	27300

Nota: OD: Oxigênio Dissolvido; TDS: Sólidos Dissolvidos Totais.

**Tabela 16-Variação dos parâmetros físicos no sistema Fechado para *M. Devon's***

Dia Cultivo	OD (mg.L <sup>-1</sup> )	pH	T(°C)	Tds (g.L <sup>-1</sup> )	Int. Luminosa (lux)
0	6,71	7,26	23,79	0,611	29800
1	6,68	8,07	23,06	0,587	25800
4	6,27	8,17	24,17	0,587	28600
5	6,3	8,43	22,91	0,575	25900
7	10,15	9,00	13,19	0,572	16500
11	10,02	9,20	20,26	0,508	24000
14	10,7	9,66	17,39	0,587	22400
18	10,96	9,87	15,98	0,593	24600
21	11,08	9,98	15,04	0,552	23100

Nota: OD: Oxigênio Dissolvido; TDS: Sólidos Dissolvidos Totais

**Tabela 17-Varição dos parâmetros físicos no Sistema Aberto para *M. Devon's***

Dia Cultivo	OD (mg.L <sup>-1</sup> )	pH	T (°C)	Tds (g.L <sup>-1</sup> )	Int. luminosa (Lux)
0	7,09	6,80	22,99	0,36	29800
1	8,19	6,84	18,82	0,331	25800
5	8,2	6,86	18,71	0,342	28600
8	9,21	6,90	15,55	0,396	25900
13	9,02	6,91	19,06	0,452	16500
15	8,55	7,42	20,65	0,446	24000
21	10	7,38	18,43	0,452	22400

Nota: OD: Oxigênio Dissolvido; TDS: Sólidos Dissolvidos Totais

**Tabela 18-Varição dos parâmetros físicos no Sistema Aberto para *D. subspicatus***

Dia Cultivo	OD (mg.L <sup>-1</sup> )	pH	T(°C)	Tds (g.L <sup>-1</sup> )	Int. luminosa(Lux)
0	7,01	6,74	22,96	0,478	24000
1	7,69	6,98	18,54	0,453	22400
5	8,33	7,04	18,39	0,449	24600
8	9,56	7,16	15,33	0,436	23100
13	8,62	7,23	18,67	0,453	29800
15	7,56	6,74	20,57	0,465	24000
21	9,79	7,30	18,23	0,479	25900

Nota: OD: Oxigênio Dissolvido; TDS: Sólidos Dissolvidos Totais.

Ao comparar os resultados mostrados nas Tabelas de 15 a 18, observou-se que a temperatura e a intensidade luminosa apresentaram poucas oscilações entre os sistemas abertos (caixas) e fechados de cultivo (fotobioreatores), sendo pequenas as variações decorrentes da sua posição no telhado da churrascaria, e, portanto à incidência de luz em cada cultivo.

Notou-se que o aumento progressiva no pH ocorreu em todos os cultivos. Segundo Kochem (2010), era um resultado esperado devido à remoção massiva de CO<sub>2</sub> e intensa atividade fotossintética, deslocando o equilíbrio  $\text{CO}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3^-$  e tornando o pH alcalino. Entretanto, a absorção ineficiente desse gás pode resultar na acidificação, já que há formação de ácido carbônico (Xu et al., 2009).

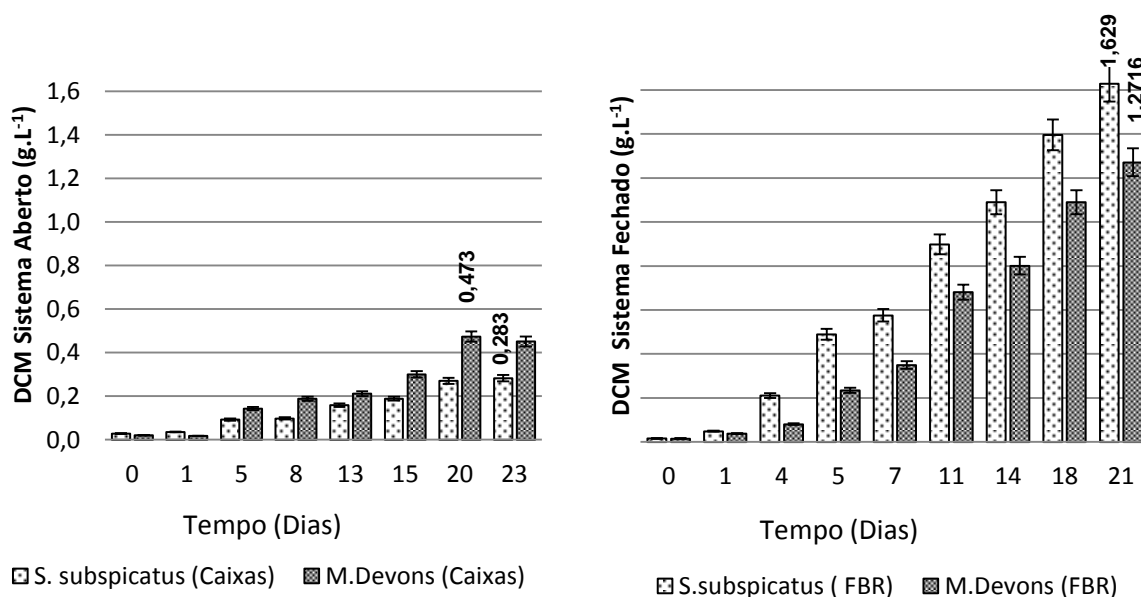
Além disso, na reação fotossintética há formação de radicais OH<sup>-</sup>, que se não são metabolizadas ou eficientemente dissolvidas e agregadas a outras moléculas do meio de cultura podem, em excesso, aumentar o pH e a concentração do oxigênio e, possivelmente, inibir a fotossíntese (KOCHEM, 2010).

Assim, um bom sistema de cultivo deve manter equilibradas as taxas de aumento do íon hidroxila ( $\text{OH}^-$ ) produzido pela fotossíntese, bem como o aumento do ácido carbônico devido à aeração de  $\text{CO}_2$  no meio (XU et al., 2009).

Radamam e Costa (2008) relatam que microalgas do gênero *Scenedesmus* sp. suportam temperaturas entre 20 e 38 °C, sendo ótimo o crescimento a 35°C. A temperatura nos cultivos mostrou oscilações entre 13,19 e 23,79°C, sendo estes valores típicos da estação de outono no Sul de Brasil.

Segundo Torzillo e Vonshak (1994), a redução na temperatura do cultivo diminui a atividade fotossintética, prejudicando a fixação de  $\text{CO}_2$ . Porém, a biomassa obtida em temperaturas abaixo de 35 °C possui maiores teores de compostos fenólicos (Colla et al., 2007) e ácidos graxos insaturados como  $\omega 3$  e  $\omega 6$ .

A Figura 20 mostra a comparação dos valores de DCM em peso seco ( $\text{g.L}^{-1}$ ) para *D. subspicatus* e *M. Devon's* em regime de cultivo aberto e fechado, com adição de meio CHU e presença de fumaça.



**Figura 20-Comparação DCM (Sistema Aberto) vs (Sistema Fechado) em peso seco ( $\text{g.L}^{-1}$ ) para *D. subspicatus* e *M. Devon's***

Observando a Figura 20 é possível afirmar que a *M. Devon's* alcança uma DCM superior em comparação a *D. subspicatus* com valores de 0,473 e 0,283  $\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente, aos 20 e 23 dias quando cultivada em regime aberto de cultivo

(caixas). Já, no sistema fechado *D. subspicatus* apresentou um crescimento celular maior em comparação a *M. Devon's* com valores de 1,629 g.L<sup>-1</sup> e 1,2716 g.L<sup>-1</sup> aos 21 dias de cultivo.

Ao comparar o desempenho em termos de produção de biomassa de ambas as microalgas, tanto em regime fechado como aberto de cultivo, fica evidente que a configuração estrutural do sistema de cultivo apresenta efeito positivo tendo em vista que a produção de biomassa se vê maximizada quando tanto a *D. subspicatus* e *M. Devon's* passam de serem cultivadas de um regime aberto para um regime fechado de cultivo. Isto é, em termos quantitativos, a produção máxima de biomassa *D. subspicatus* e da *M. Devon's* se incrementa aproximadamente 5,70 e 2,70, respectivamente, ao passar do regime aberto de cultivo (Caixas) para o sistema fechado de cultivo, ambos com presença de fumaça e adição de meio CHU.

Segundo Demirbas (2011), a produtividade nos sistemas fechados de cultivo é maximizada em função da sua maior área superficial, superior à dos sistemas abertos, como os tanques. Adicionalmente, esses sistemas são confeccionados de maneira que o caminho ótico seja menor, promovendo assim uma melhor distribuição da luz e, por conseguinte, estimulando o crescimento celular.

### 5.2.3 Delineamento de Produção de Biomassa

Na Tabela 19 são apresentados os dados dos parâmetros cinéticos determinados em função da configuração estrutural do sistema: aberto ou fechado. Em ambos os sistemas se mantiveram constantes a adição do meio de cultura CHU e a presença de fumaça. Todos os valores foram calculados na fase exponencial de crescimento.

**Tabela 19- P<sub>max</sub> (chl-a/Peso seco) e μ<sub>max</sub> para os sistemas aberto e fechado de cultivo**

Microalga	Sistema	μ <sub>max</sub> Chl-a (d <sup>-1</sup> )	P <sub>max</sub> Chl-a (mg.m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	P <sub>max</sub> Peso seco (g.L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
<i>D. subspicatus</i>	Aberto	0,077	7,3551	0,0125
Mescla Devon's	Aberto	0,089	13,08	0,0226
<i>D. subspicatus</i>	Fechado	0,250	34,02	0,070
Mescla Devon's	Fechado	0,120	32,139	0,067

Notou-se que a produção máxima das microalgas responde em função da sua velocidade específica de crescimento, sendo que ambas as microalgas mostraram valores diferenciados nas duas configurações estruturais testadas: caixas e fotobioreatores.

Analisando os valores desses parâmetros (Tabela 19) notou se que a  $P_{\max}$  e  $\mu_{\max}$  desenvolvidas por *D. subspicatus* na sua fase de crescimento passaram de  $0,077d^{-1}$  para  $0,250 d^{-1}$  e de  $7,3551 \text{ mg.m}^{-3}$  de chl-a ou  $0,0125 \text{ g.L}^{-1}$  para  $34,02 \text{ mg.m}^{-3}$  ou  $0,070 \text{ g.L}^{-1}$  ao passar do regime aberto para o regime fechado de cultivo. Já no caso da *M. Devon's* os dados mostram que a  $\mu_{\max}$  passou de  $0,089 d^{-1}$  para  $0,120d^{-1}$  e que a  $P_{\max}$  passou de  $13,08 \text{ mg.m}^{-3}$  ou  $0,0226 \text{ g.L}^{-1}$  para  $32,139 \text{ mg.m}^{-3}$  ou  $0,067 \text{ g.L}^{-1}$  ao passar das caixas para os fotobioreatores.

Realizando uma comparação entre as duas microalgas testadas pode se afirmar que a troca de configuração estrutural influenciou mais o crescimento de *D. subspicatus* cujos valores de  $P_{\max}$  e  $\mu_{\max}$  tiveram um incremento de  $3,24 d^{-1}$  e  $5,6 \text{ g.L}^{-1}$  por dia de cultivo. A diferença da *M. Devon's*, onde a influência da mudança de regime de cultivo representou um incremento de 1,34 na  $\mu_{\max}$  e de 2,96 em  $\text{g.L}^{-1}$  por dia de cultivo.

Ao relacionar a  $P_{\max}$  e  $\mu_{\max}$  com a DCM nas mesmas condições de cultivo fica evidente que existe uma proporcionalidade entre ambos os critérios. Isto é, os valores da DCM aumentaram para *D. subspicatus* e da *M. Devon's* em uma escala 5,70 e 2,70 vezes na mesma proporção que parâmetros  $P_{\max}$  e  $\mu_{\max}$ , sendo estes 5,6 e 2,96 vezes. Valores calculados para ambas as microalgas, passando do sistema aberto para fechado de cultivo, na presença da fumaça e com adição de meio CHU.

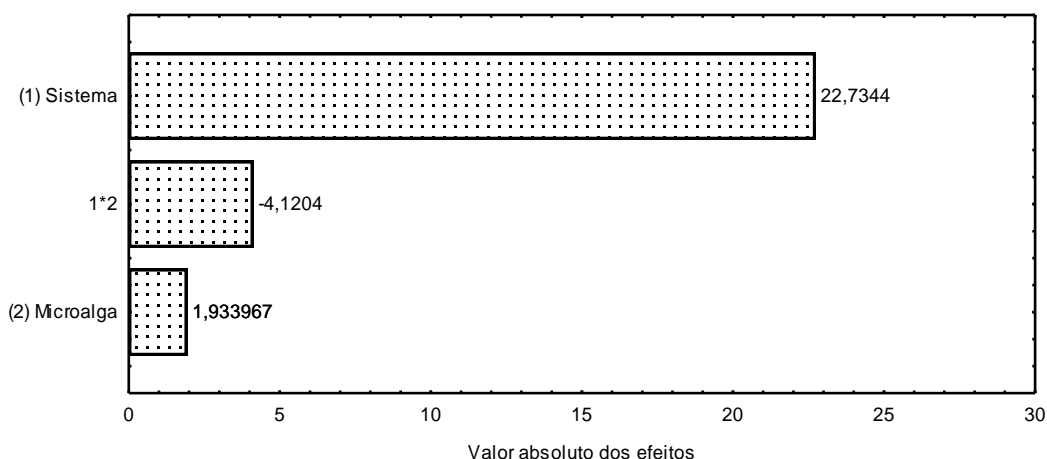
Segundo a análise de ANOVA (Tabela 20) a resposta foi significativa para todas as variáveis, inclusive para a interação secundária, confirmados por valores de  $F_{1,8} > 7,57$  ( $p < 0,0001$ ).

**Tabela 20-ANOVA da  $P_{\max}$  (clorofila-a) para a avaliação dos efeitos de configuração estrutural do sistema**

Variáveis	SQ	G.L.	MQ	F	p
(1) microalga	1550,559	1	1550,559	27359,62	< 0,0001
(2) Sistema	11,221	1	11,221	197,99	< 0,0001
1*2	50,933	1	50,933	898,71	< 0,0001
Erro Puro	0,453	8	0,057		
Total SQ	1613,166	11			

Nota: SQ – Soma dos Quadrados / MQ – Média dos Quadrados / GL – Graus de Liberdade

O Gráfico de Pareto contendo os valores dos efeitos calculados para cada variável e suas interações estão apresentadas abaixo na Figura 21. A significância dos efeitos foi calculada a partir do erro padrão dos efeitos (0,14) multiplicado pelo valor de  $t_{\text{tab}0,95,8} = 2,30$  resultando em  $0,32 \text{ mg de clorofila m}^{-3}$ .

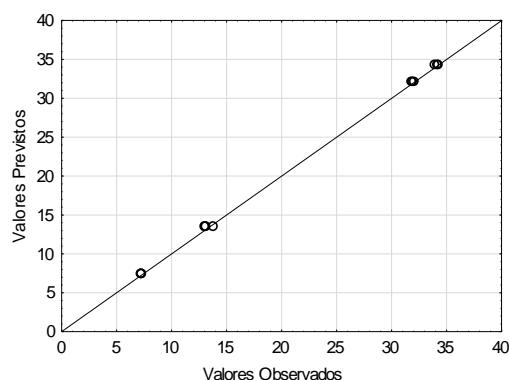


**Figura 21-Gráfico de Pareto para avaliação de efeito da configuração estrutural do sistema na produção máxima de biomassa**

Analisando o gráfico de Pareto (Figura 21) para avaliação do efeito da configuração estrutural do sistema em cultivos de *D. subspicatus* e Mescla Devon's, fica evidente que o regime de cultivo influencia mais a produção de biomassa que o tipo ou espécie de microalga utilizada. Que dizer, o tipo de espécie seja esta *D. subspicatus* o M. Devon's torna-se menos importante quando o seu cultivo se realiza em regime fechado de cultivo, caso contrário acontece em regime aberto de cultivo onde o tipo de microalga exerce um efeito significativo na produção de biomassa.

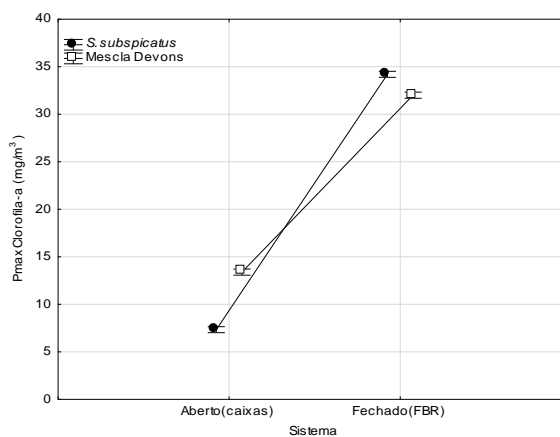
Analisando o gráfico dos valores previstos *versus* os valores observados (Figura 22) pelo planejamento, é possível observar a correlação entre eles. O valor obtido de correlação foi de  $R^2 = 0,9997$  e o valor ajustado de  $0,9996$ , indicando excelente ajuste do modelo linear.





**Figura 22- Valores previstos do modelo linear versus valores observados no estudo 2.**

O gráfico de médias (Figura 23) ratifica que efetivamente o tipo de configuração estrutural maximiza ou limita a produção de biomassa. Sendo que, sistemas fechados apresentam melhores e mais significativos resultados na produção de biomassa quando comparado com o sistema aberto. No gráfico é evidente que o tipo de inóculo não é tão influente como observado no sistema aberto de cultivo, onde a *M. Devon's* teve um crescimento maior em comparação a *D. subspicatus*.



**Figura 23-Gráfico de médias para a configuração estrutural do sistema para *D. subspicatus* e *M. Devon's***

Resultados apontam que o melhor regime de cultivo depende do custo-benefício associado ao processo. O uso de inóculos puros torna-se interessante quando o objetivo da biomassa visa a obtenção de metabólitos específicos de interesse, compensando assim o custo do seu pré-cultivo em escala de laboratório.

Mas, se o foco for a produção de biomassa ligada única e exclusivamente à captura de carbono inorgânico proveniente da churrascaria, inóculos mistos com

meios sem adição de fonte externa de carbono podem atingir o objetivo. Se for o caso, inóculos mistos são economicamente viáveis partindo do fato que podem ser re-circulados no mesmo sistema sem necessidade de uma aclimação prévia.

### 5.3 ESTUDO 3: ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DO CARBONO NO SISTEMA FECHADO DE CULTIVO.

Os cálculos mostraram que a concentração média de  $\text{CO}_2$  para os cultivos de *D. subspicatus* e *M. Devon's* foi de 430,7 e de 386,6  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  respectivamente, sendo que as formas de  $\text{CO}_3^{-2}$  e  $\text{HCO}_3^-$ , apresentaram valores de 1,99, 1,13 e 2338 e 1935  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  para ambas as microalgas em regime fechado de cultivo. É importante ressaltar que a concentração de carbono inorgânico total livre (somatória de todas as formas no meio) foi de 2917 e de 2318  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Segundo Kirk (1994) a forma predominante de carbono em sistemas aquosos é altamente dependente do pH, sendo que valores de pH mais alcalinos favorecem a formação de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), e valores de pH entre 7 e 9, favorecem as formas de  $\text{CO}_2$  livre e carbonato ( $\text{CO}_3^{-2}$ ).

Nas Figuras 24, 25 e 26 se observa que a forma predominante de carbono inorgânico ao longo do cultivo foi o  $\text{HCO}_3^-$ , produto da rápida dissolução do  $\text{CO}_2$  em um meio aquoso em pH entre 6 e 8. Embora o  $\text{CO}_2$  represente um menor custo energético para as microalgas, seu curto tempo de residência tornou-o pouco disponível para as microalgas, tornando o bicarbonato a principal fonte inorgânica de carbono disponível para o consumo.

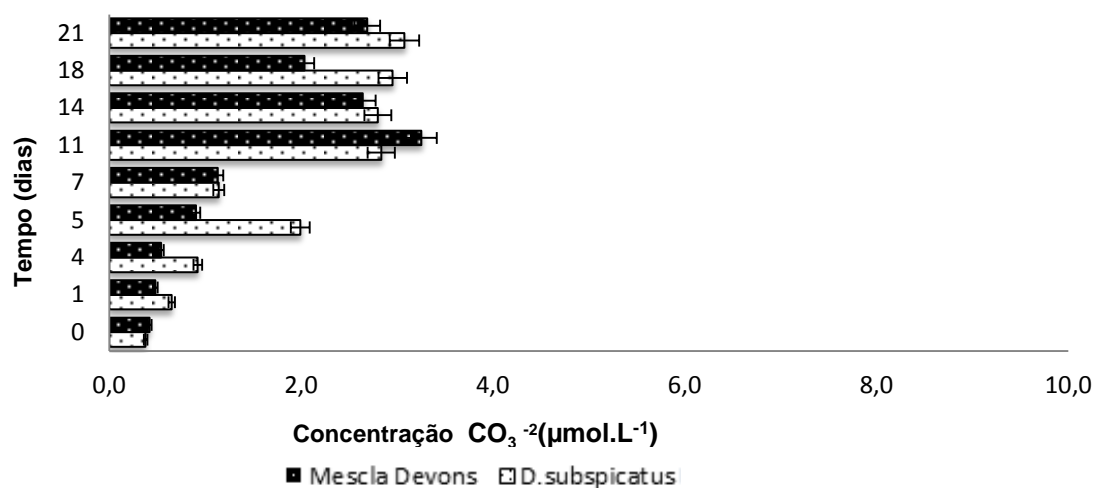


Figura 24-Concentração de  $\text{CO}_3$  no sistema fechado de cultivo

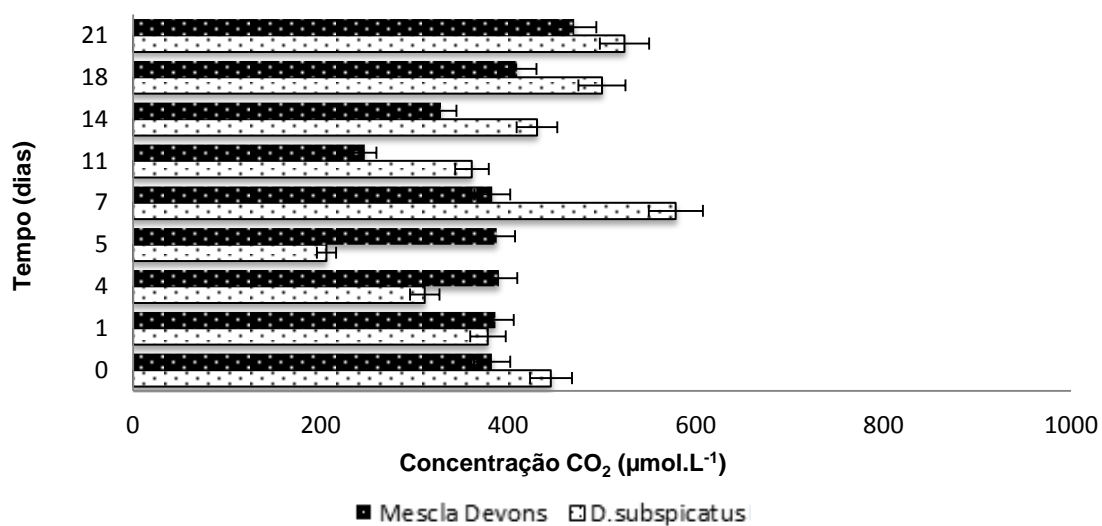


Figura 25-Concentração de  $\text{CO}_2$  no sistema fechado de cultivo

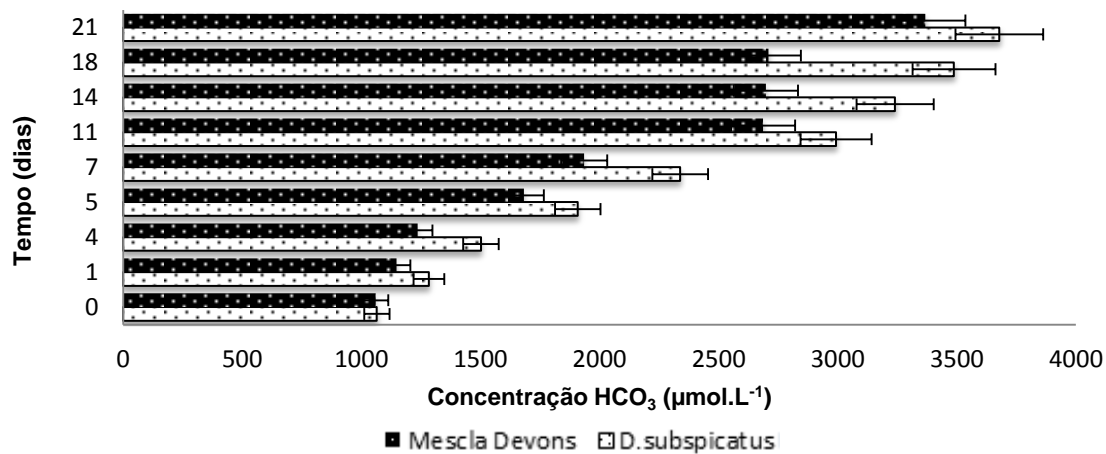


Figura 26-Concentração de  $\text{HCO}_3$  no sistema fechado de cultivo

Neste contexto, Esteves (1988) expõe que valores de pH fora da faixa de 7-8 prejudicam o crescimento das microalgas, afetando a disponibilidade de outros elementos além do carbono, como o fósforo e ferro dissolvido nas formas biodisponíveis.

Analisando as Figuras 27 e 28 é possível visualizar a remoção do monóxido de carbono e dióxido de carbono em função do crescimento celular (clorofila-a) em ambos os sistemas de tratamento biológico da fumaça

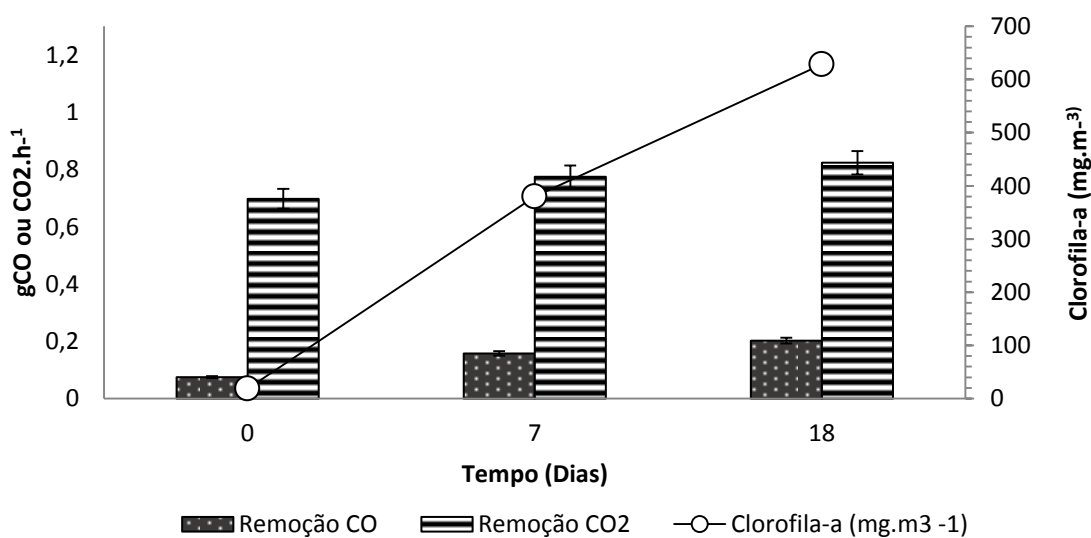


Figura 27- Remoção de CO e CO<sub>2</sub> no fotobioreator 1 (*D. subspicatus*)

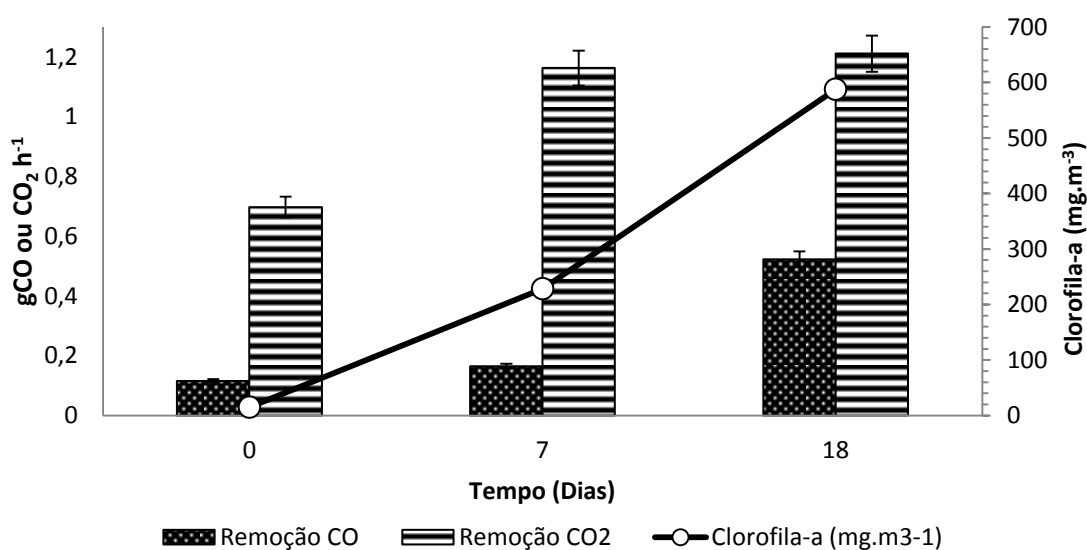


Figura 28- Remoção de CO e CO<sub>2</sub> no fotobioreator 2 (Mescla Devon's)

Ao analisar individualmente as figuras observou-se que, embora a *M. Devon's* apresentou um crescimento celular menor em comparação a *D. subspicatus*, a quantidade de carbono removido foi maior. Em ambos os sistemas, a remoção dos gases aumenta proporcionalmente à densidade celular (produção de biomassa) expressa em clorofila-a. Adicionalmente, notou-se que a diferença do sistema de cultivo aberto onde a *M. Devon's* apresentou taxas de crescimento e de produção de biomassa superiores à *D. subspicatus*, no sistema fechado essa última apresentou um crescimento maior indicando o bom desempenho de cultivos puros utilizando este tipo de configuração estrutural.

Quantitativamente, o fotobioreator com a *M. Devon's* apresentou uma máxima remoção de CO<sub>2</sub> de 1,21 g.h<sup>-1</sup> e de 0,523 g de CO aos 18 dias de cultivo e com uma concentração celular de 628 mg.m<sup>-3</sup> de clorofila-a ou em peso seco de 1,396 g.L<sup>-1</sup>.

Já *D. subspicatus* atingiu um valor máximo de remoção de 0,823 g.h<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub> e de 0,202 g.h<sup>-1</sup> para o mesmo período de tempo que a *M. Devon's* para uma concentração celular de 587,74 mg.m<sup>-3</sup> de clorofila-a e 1,09 g.L<sup>-1</sup> em peso seco.

#### 5.4 ESTUDO 4: OTIMIZAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA POR CENTRIFUGAÇÃO

Na Tabela 21 são apresentados os valores obtidos do número de células por mL presentes no sobrenadante após centrifugação.

**Tabela 21- Resultados do planejamento fatorial 3<sup>2</sup> e média das leituras de células por mililitro de sobrenadante**

Rpm	Nível	Minutos	Nível	<i>D. subspicatus</i>	Mescla Devon's
2500	(-)	5	(-)	1,7 x10 <sup>4</sup>	1,8 x10 <sup>5</sup>
2500	(-)	8	0	9 x10 <sup>3</sup>	1,9 x10 <sup>5</sup>
2500	(-)	10	(+)	3,3 x10 <sup>1</sup>	7,3 x10 <sup>4</sup>
2700	0	5	(-)	1,1 x10 <sup>4</sup>	9,7 x10 <sup>4</sup>
2700	0	8	0	0	1,0 x10 <sup>4</sup>
2700	0	10	(+)	0	7,0 x10 <sup>3</sup>
2900	(+)	5	(-)	9,0 x10 <sup>2</sup>	2,0 x 10 <sup>3</sup>
2900	(+)	8	0	0	8,7 x 10 <sup>1</sup>
2900	(+)	10	(+)	0	0

Segundo os resultados mostrados na Tabela 21, foi possível afirmar que o método de centrifugação atingiu o objetivo de recuperação celular para ambas as microalgas. Foram avaliadas as condições operacionais que permitissem o menor número de células no sobrenadante. Os dados obtidos evidenciaram que a partir dos 8 minutos e utilizando 2700 rpm é possível apreciar recuperação da biomassa celular de *D. subspicatus*. Já para a m. Devon's foram necessários 10 min e 2900 rpm.

Segundo a análise de ANOVA, o tempo de centrifugação e as rotações por minuto são estatisticamente significativas ( $p < 0,0001$ ) na recuperação da biomassa de ambos os cultivos as microalgas em regime fechado (Fotobioreatores) (Tabelas 22 e 23), incluindo a interação secundária de ambas as variáveis antes mencionadas com valores de  $F_{1,26} > 5,66$  ( $p < 0,0001$ ).

**Tabela 22-ANOVA células de *D. subspicatus*. mL<sup>-1</sup> de sobrenadante para a avaliação do efeito do tempo e velocidade de rotação na recuperação de biomassa**

Fatores	SQ	G.L.	MQ	F	p
(1) Tempo	4,32 x10 <sup>8</sup>	1	432185975	63,72322	0,00000
(2) rpm	3,54 x10 <sup>8</sup>	1	354289825	52,23790	0,00000
1*2	1,88 x10 <sup>8</sup>	1	188107734	27,73535	0,00005
Falta de Ajuste	5,96 x10 <sup>7</sup>	5	11930295	1,75905	0,17232
Erro Puro	1,22 x10 <sup>8</sup>	18	6782237		
Total SQ	1,12 x10 <sup>9</sup>	26			

Nota: SQ – Soma dos Quadrados / MQ – Média dos Quadrados / GL – Graus de Liberdade

**Tabela 23-ANOVA células da mescla Devon's/mL de sobrenadante para a avaliação do efeito do tempo e velocidade de rotação na recuperação de biomassa.**

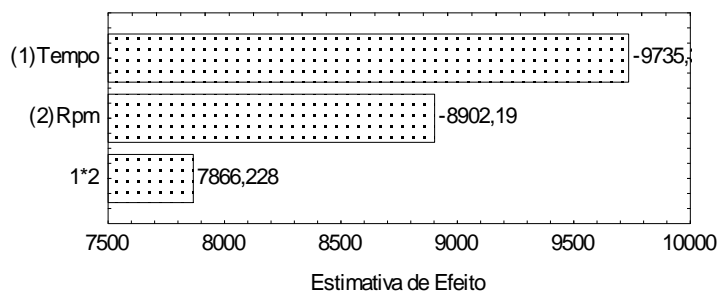
Fatores	SQ	G.L.	MQ	F	p
(1) Tempo	1,96 x10 <sup>10</sup>	1	1,96 x10 <sup>10</sup>	337,536	0,00000
(2) rpm	1,03 x10 <sup>11</sup>	1	1,03 x10 <sup>11</sup>	1769,272	0,00000
1*2	7,35 x10 <sup>9</sup>	1	7,35 x10 <sup>9</sup>	126,790	0,00000
Falta de Ajuste	2,26 x10 <sup>10</sup>	5	4,51 x10 <sup>9</sup>	77,883	0,00000
Erro Puro	1,04 x10 <sup>9</sup>	18	5,80 x10 <sup>7</sup>		
Total SQ	1,49 x10 <sup>11</sup>	26			

Nota: SQ – Soma dos Quadrados / MQ – Média dos Quadrados / GL – Graus de Liberdade

O gráfico de Pareto (Figura 29) permite estimar o efeito das variáveis sobre a recuperação da biomassa celular. Observa-se que para a microalga *D. subspicatus* o tempo é mais significativo que a velocidade de centrifugação, oposto do ocorrido para a M. Devon's. A interação secundária de velocidade de rotação (rpm) e tempo

de centrifugação sobre a variável resposta teve um efeito mais significativo em *D. subspicatus* que na Mescla Devon's.

#### *D. subspicatus*



#### Mescla

#### Devon's

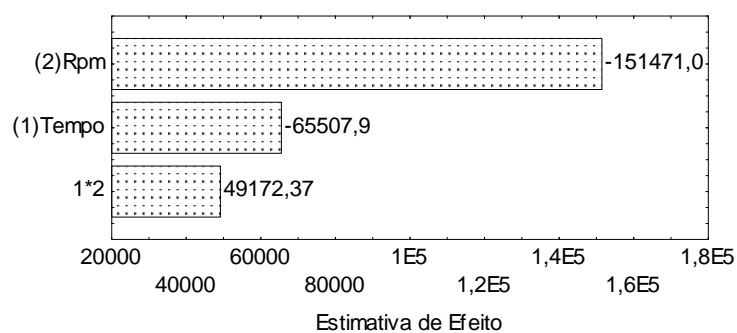


Figura 29- Gráfico de Pareto para a recuperação celular por centrifugação de *D. subspicatus* e M. Devon's.

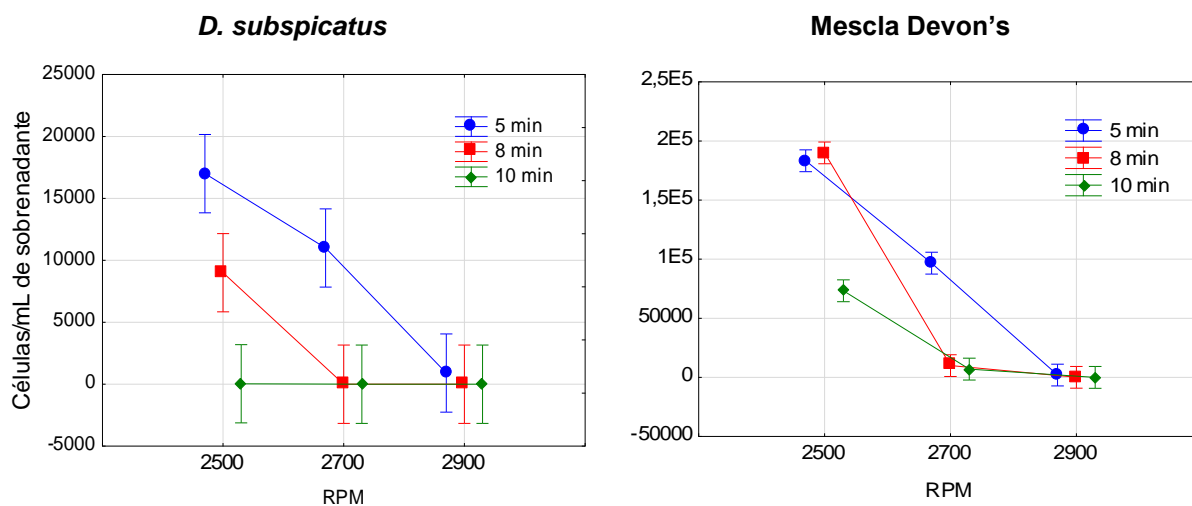
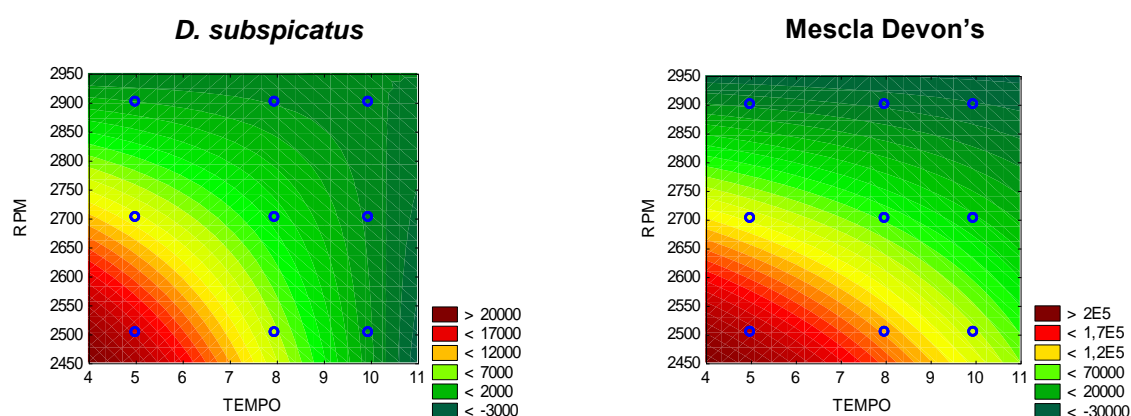


Figura 30- Gráfico de médias para *D. subspicatus* e M. Devon's para a otimização do método de recuperação celular (centrifugação)

Ao analisar a informação fornecida pelo gráfico de Pareto (Figura 29) e compará-la com o gráfico de médias (Figura 30), observa-se que efetivamente o tempo de centrifugação foi a variável mais significativa para *D. subspicatus*, onde 5 minutos a 2900 rpm já reduz o número de células no sobrenadante a zero. Não obstante, esse mesmo resultado pode ser obtido mudando o tempo de centrifugação para 10 minutos e as rotações para 2900. Diferentemente de *D. subspicatus*, para a M. Devon's as rotações por minuto são a variável mais significativa. Observou-se que para essa microalga 2500 rpm e 5 minutos não são suficientes para causar algum efeito significativo na recuperação celular. Tempos de 8 e 10 min com 2700 e 2900 rpm, respectivamente, conseguem separar todas as células de *D. subspicatus* do meio de cultivo.

De modo geral, a recuperação da biomassa foi mais efetiva para a microalga *D. subspicatus*. Não obstante, para obter uma precipitação celular efetiva tanto do cultivo puro como do cultivo misto um tempo de 5 minutos a 2900 rpm já é suficiente.

Para o experimento foi realizado o gráfico de contorno (Figura 31) que mostrou que as condições otimizadas (verde) são aquelas em que com um menor número de rotações por minuto e tempo de centrifugação o número de células no sobrenadante é menor, indicando um efeito positivo das condições operacionais na recuperação celular.



**Figura 31-Condições ótimas de recuperação celular para *D. subspicatus* e m. Devon's avaliadas em um menor número de células no sobrenadante.**

No caso de recuperação celular para *D. subspicatus* resultados mostram que 5 min a 2850 rpm e 8 minutos a 2700 rpm são condições equivalentes para tal fim.



Já no caso da m. Devon's resultados similares podem ser obtidos utilizando 8 minutos a 2700 rpm ou 10 minutos a 2600 rpm. Embora não tenha sido testado o estresse celular, rompimento por cisalhamento ou custo energético do processo, esses parâmetros são geralmente devem ser considerados na hora de avaliar as melhores condições operacionais e/ou a viabilidade do método utilizado de recuperação celular.

Costa (2012) também adotou a centrifugação como método de colheita após pré-tratamento por floculação com Cloreto de Alumínio ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), Cloreto de Ferro ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) e Sulfato de Alumínio ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ ) utilizando 10 min e 5000 rotações por minuto.

Embora questionada por seu alto custo energético, a centrifugação tem sido um método bastante adotado em processos industriais. É o caso de empresas que comercializam a pasta de microalgas com finalidade alimentar em larga escala (MONTAINI et al., 1995; McCAUSLAND et al., 1999; ROBERT et al., 2001). Neste sentido, Nunez (2005) avaliou a viabilidade morfológica e tempo de armazenamento máximo das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Chaetoceros calcitrans* após terem sido submetidas a um processo de centrifugação de 2800 rpm. O autor indica que, esse método é uma alternativa viável, já que o baixo teor de umidade após o processo permite que as microalgas possam ser armazenadas por mais tempo sem diminuindo o risco por apodrecimento e, portanto, o uso de conservantes.

## 5.5 ESTUDO 5: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS MICROALGAS

A caracterização bioquímica da biomassa recuperada da condição otimizada de cultivo realizou-se a fim de oferecer alternativas de destinação do material celular recuperado do sistema de tratamento das emissões, maximizando assim, a viabilidade dessa tecnologia.

Conforme detalhado na metodologia, a caracterização bioquímica das microalgas foi feita a partir dos cultivos realizados em regime fechado. Portanto, só corresponde às microalgas *Desmodesmus subspicatus* e M. Devon's cultivadas em fotobioreatores

(Tipo painel) em presença de fumaça e utilizando o meio de cultura CHU como meio de cultivo para ambas as microalgas.

### 5.5.1 Lipídios

Na Tabela 24 são apresentados os valores de lipídios totais para as microalgas *D. subspicatus* e Mescla Devon's

**Tabela 24-Quantificação de lipídios para *D. subspicatus* e Mescla Devon's**

Microalga	Média teor de Lipídios (%)	mg de lipídios/g biomassa seca	Desvio Padrão (%)
<i>D. subspicatus</i>	23,23	236	1,58
Mescla Devon's	16,77	167	0,63

Os resultados (Tabela 24) apontam que a concentração de lipídios para *D. subspicatus* nesta pesquisa estão próximos aos valores obtidos por alguns pesquisadores para a mesma e para outras espécies do mesmo gênero. Gressler (2011), por exemplo, avaliou a porcentagem de lipídios totais para *Desmodesmus subspicatus* com e sem adição de CO<sub>2</sub> no meio e mudando o regime de cultivo. Os resultados de lipídios totais em biomassa seca obtidos no sistema híbrido de cultivo com e sem adição de CO<sub>2</sub> foram, respectivamente, de 1,36 % e 6,07 %, inferiores aos obtidos utilizando um fotobioreator tubular, cujos valores foram de 18,73% e de 12,00% com e sem adição de gás carbônico, respectivamente.

Becker (2007) reportou valores de entre 16 e 40% para *Scenedesmus dimorphus* e 13 e 14% de lipídios totais para *Scenedesmus obliquos*. Os resultados de Mata et al. (2010) apresentaram teores de 11-55% para essa última espécie de microalga, 1,9-18,4% para *Scenedesmus quadricauda* e 19,6-21,1% para *Scenedesmus* sp. Sanchez et al. (2008) reportaram valores de 12% para *Scenedesmus almeriensis*. O maior teor de lipídios totais reportado em literatura consultada foi de 73% obtido por Matsunaga et al. (2009) utilizando a microalga marinha *Scenedesmus rubescens*.

Poucos trabalhos têm desenvolvido sistemas de tratamento de CO<sub>2</sub> com cultivos não puros de microalgas. Bjerck (2012), por exemplo, avaliou a porcentagem de lipídios

utilizando um cultivo misto com as espécies *Chlorella cf*, *Euglena cf*, *Spirogyra cf*, *Scenedesmus cf*, *Desmodesmus cf*, *Pseudokirchneriella cf* (algas verdes-chlorophyta); *Phormidium cf* (cianobactéria) e *Nitzschia cf* (diatomácea) em presença e ausência de CO<sub>2</sub> em um sistema misto de cultivo. O autor reportou valores de 1,36 % e 6,07% de lipídios totais na presença e ausência do gás de combustão para 20 dias de cultivo. Esses valores foram inferiores se comparados com os reportados nesta pesquisa, onde foi observada uma porcentagem de 16,7% lipídios encontrada para a M. Devon's no mesmo número de dias de cultivo.

Segundo Guschina e Harwood (2006) as proporções, bem como os tipos de ácidos graxos produzidos, estão relacionadas com a espécie da microalga, composição do meio e do ambiente o qual se desenvolvem. Os resultados nesta pesquisa apontaram que a espécie de microalga não foi tão relevante como o meio de cultivo e a presença e ausência de fumaça (CO<sub>2</sub>), sem considerar a fase específica de crescimento na qual a biomassa foi recuperada.

No mesmo contexto, pesquisas recentes vêm avaliando o conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos em microalgas expostas a gases de combustão.

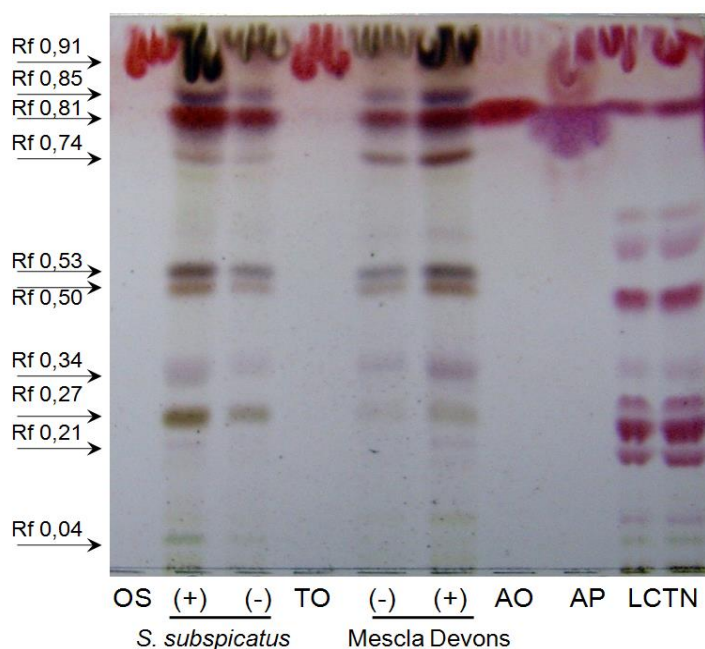
Radmann e Costa (2008) quantificaram o teor lipídico e composição lipídica em cultivos das microalgas *Spirulina sp.*, *Synechococcus nidulans* e *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus obliquos*, na presença de CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e NOx. Eles determinaram que *Scenedesmus obliquos* apresentou um teor de lipídios de 6,18%. Já as microalgas *Spirulina sp.*, *Synechococcus nidulans* e *Chlorella vulgaris* reportaram valores que oscilaram entre 4,56 e 5,97%. Valores, que ao serem comparados com os obtidos no presente trabalho, 23,23% e 16,7% para *Desmodesmus subspicatus* e M. Devon's são consideravelmente inferiores.

Segundo Radamann e Costa (2008) *Scenedesmus obliquos* foi também a microalga que apresentou o maior conteúdo de ácidos graxos insaturados com um percentual aproximado de 66,01% sobre o total de Lipídios totais quantificados. Esses últimos utilizados na prevenção e tratamento doenças cardiovasculares, redução da pressão arterial, e, além disso, são considerados essenciais para nutrição infantil (BOROWITSKA, 1993)

Os resultados nesta pesquisa apontam que tanto a microalga *Desmodesmus subspicatus* como a m. Devon's são fontes alternativas de lipídios. A escolha da melhor

destinação desses lipídios depende do grau de saturação dos mesmos, sendo que ácidos graxos insaturados são ideais para os setores alimentar e farmacêutico. Já aqueles com um maior número de saturações são amplamente aceitos no setor energético e na produção de biocombustíveis.

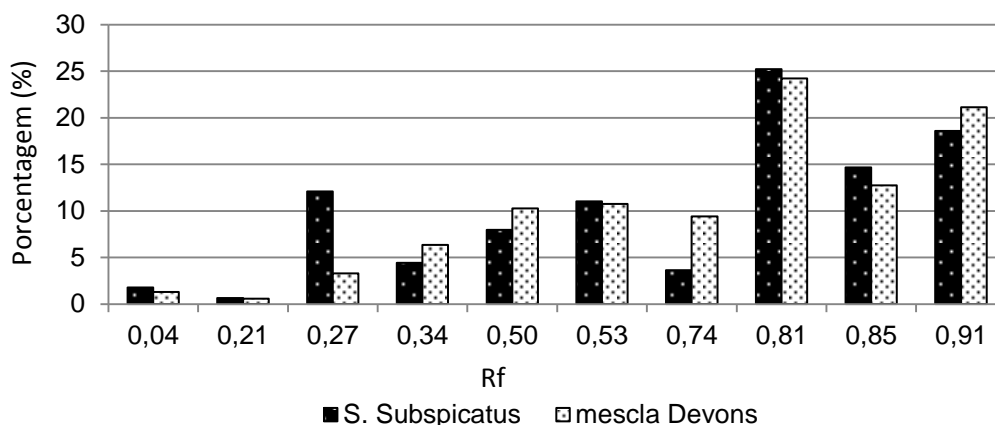
Analisando o perfil cromatográfico dos lipídios (figura 32) foi possível observar que tanto *D. subspicatus* como a M. Devon's estão compostas pelos mesmos lipídios com poucas diferenças quanto à sua composição.



**Figura 32-CCD com o perfil dos lipídios da biomassa das microalgas *D. subspicatus* e mescla Devon's.**

NOTA: Padrões de (OS) óleo de soja, (TO) trioleína, (AO) ácido oléico, (AP) ácido palmítico e (LCTN) Lecitina

Ao comparar as proporções entre os ácidos graxos existentes na microalga *D. subspicatus* e na M. Devon's (Figura 32), se observa que a composição lipídica é relativamente proporcional entre elas, com as principais diferenças nos compostos de Rfs 0,27 e Rf 0,74. Entretanto, o composto majoritário, cerca do 25% (Figura 33) e representado pelo Rf 0,81 identificado através do padrão como o ácido oléico.



**Figura 33-Perfil densitométrico da CCD de lipídios da biomassa das microalgas *D. subspicatus* e mescla Devon's**

Os lipídios das microalgas estão classificados em apolares, como os triacilgliceróis e ácidos graxos de cadeia longa, e lipídios mais polares, como o fosfo e glicolipídios, além dos ácidos graxos de cadeias curtas. Ao analisar a cromatografia em camada delgada é possível observar que aproximadamente 65% dos lipídios extraídos são de natureza apolar. O óleo de soja é constituído principalmente por triacilgliceróis. Já a trioleína é formada por uma molécula de glicerina unida a três moléculas de ácido oléico; já o óleo de soja é constituído principalmente pelos ácidos linoléico, oléico e linolênico.

Ao comparar os padrões utilizados e anteriormente descritos com o perfil lipídico de ambas as microalgas, foi possível perceber a presença de ao menos 20% de triacilgliceróis para ambas as microalgas testadas, cerca de 30% do ácido oleico na forma livre, o 20% restante corresponde a outros ácidos graxos de cadeia longa.

Para analisar a composição dos lipídios totais na cromatoplaça, além dos padrões, foi preciso pesquisar tanto a composição da fração lipídica nas microalgas como a sua solubilidade na fase móvel empregada.

Segundo a sua solubilidade, os lipídios das microalgas podem ser polares como os fosfolipídios e glicolipídios e apolares como os triacilgliceróis (BASOVA, 2005). Os triacilgliceróis são a principal forma de estocagem de energia das microalgas, enquanto que os glicolipídios são estruturas lipídicas presentes na parede celular. Ao encontro, Molina et al.(1999) afirmam que além dos triacilgliceróis

ácidos graxos saturados e poli-insaturados estão presentes em maiores proporções nas microalgas.

### 5.5.2 Carboidratos

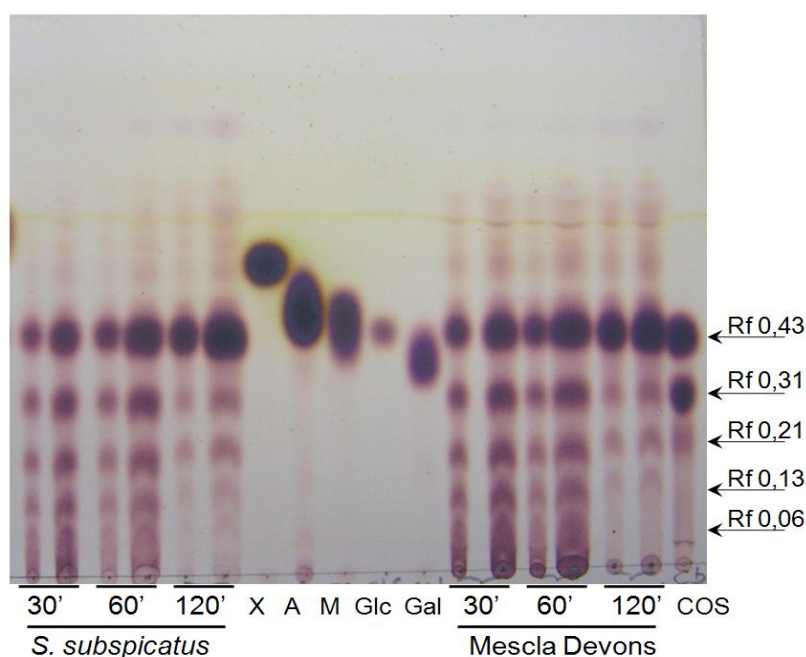
Na Tabela 25 são apresentados os resultados de carboidratos totais das microalgas *D. subspicatus* e *M. Devon's*.

**Tabela 25-Quantificação de carboidratos para *D. subspicatus* e Mescla Devon's**

Microalga	Média teor de Carboidratos (%)	mg de carboidratos.g biomassa seca	Desvio Padrão (%)
<i>D. subspicatus</i>	27,60	272,64	0,58
Mescla Devon's	28,17	281,35	1,90

Para ambas as microalgas os valores de carboidratos foram muito próximos. Rodriguez (2008) expõe que microalgas do gênero *Scenedesmus* possuem um teor de carboidratos totais entre 21 e 52% sobre o total de biomassa seca. Rodjaroem et al. (2007) trabalharam com diferentes microalgas verdes nativas na Tailândia e reportaram um valor médio de 20,4% para o gênero *Scenedesmus sp*, próximo ao valor indicado por Rodriguez (2008). Adicionalmente Rodjaroem et al. (2007) encontraram teores de 16,4, 18,6, 12,9 e 23,4% para as espécies de *S. acutiformis*, *S. arcuatus*, *S. armatus* e *S. obliquus*, respectivamente. Os teores encontrados nessa pesquisa estiveram próximos aos reportados nas literaturas consultadas, sugerindo potencial uso como matéria prima no setor dos biocombustíveis, especificamente para a produção de bioetanol.

Ueda et al. (1996) avaliaram as microalgas *Chlamydomonas*, *Chlorella* e *Spirulina*, *Oscillatoria* e *Microcystis*, estas últimas pertencentes ao grupo *Cyanobacteria*, a fim de avaliar seu potencial na produção de bioetanol. Eles afirmaram que em condições anaeróbias e de escuridão, as microalgas armazenam altas concentrações de polissacarídios, que são armazenadas intracelularmente em forma de glicose, tornando-as dessa forma, organismos alvo para a produção de biocombustíveis, especificamente de bioetanol.



**Figura 34-CCD com o perfil dos carboidratos hidrolisados com TFA 2M da biomassa das microalgas *D. subspicatus* e mescla Devon's**

NOTA: Padrões de (X) xilose, (A) arabionose, (M) manose, (Glc), glucose, (Gal) galactose e (COS) celo-oligossacarídeos.

Segundo os resultados indicados na cromatoplaça (Figura 34) e comparando-os com os padrões utilizados, o perfil obtido indica a presença de traços de xilose e, principalmente, a presença da glicose e sua família de oligossacarídios, homólogos para ambas as microalgas, como comprovado através da forte correlação linear ( $R=0,9949$  e  $R^2 = 0,9899$  - teste t  $p < 0,0001$ ) do  $\text{Log}(1-R_f/R_f)$  e o grau de polimerização (BOUVENG; LINDBERG, 1961) como pode ser visto na Figura 35. Na CCD também foi possível visualizar que houve diferença entre os diferentes tempos de hidrólise com TFA ( $2 \text{ mol.L}^{-1}$ ) aos 30, 60 e 120 minutos, sendo que quanto maior for o tempo de hidrólise, maior a conversão de oligossacarídios para monossacarídios.

Os resultados da cromatoplaça correspondem aos dados fornecidos pela literatura que indicam que os carboidratos estruturais presos às paredes celulares e entre as matrizes intercelulares nas microalgas estão em forma de polissacarídios em forma de amido cujo monômero é a glicose, além de outros açúcares como a manose, ribose, xilose, ramnose e fucose (Becker, 2004).

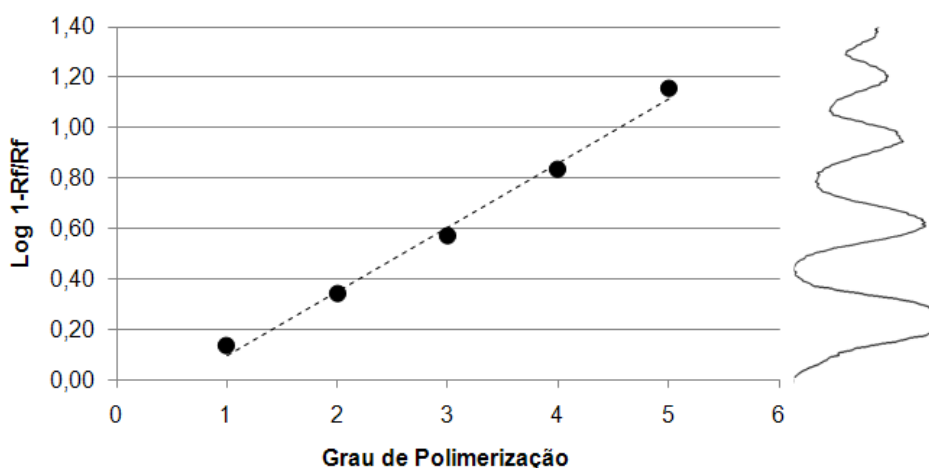


Figura 35-Correlação linear entre o Log (1-Rf/Rf) versus o grau de polimerização da série homologa de oligossacarídeos de glicose e a densitometria da CCD

### 5.5.3 Proteínas

Na tabela 26 são apresentados os resultados de proteínas totais das microalgas *D. subspicatus* e *M. Devon's*.

Tabela 26- Quantificação de proteínas Totais para *D. subspicatus* e Mescla Devon's

Microalga	Teor médio de Proteínas (%)	mg de proteínas/g biomassa seca	Desvio Padrão (%)
<i>D. subspicatus</i>	35,30	353,00	1,84
Mescla Devon's	31,90	391,00	1,06

As microalgas são fonte promissora de proteínas, algumas com teores superiores quando comparadas com alimentos convencionais. Segundo Quevedo et al. (2008), microalgas pertencentes ao gênero *Scenedesmus* sp. possuem teores de proteína que oscilam entre 25 e 35% sobre o total de biomassa seca, que variam, em função da espécie e condições de cultivo, sendo assim consideradas como uma fonte alternativa de proteína.

Os resultados nessa pesquisa mostram que o teor médio de proteínas foi 35,30 e 31,90% para *D. subspicatus* e *m. Devon's* respectivamente, dados muito próximos aos apresentados por Quevedo et al. (2008) que reportaram valores de



24,87%, 33,86% e 35,1% de proteínas totais em cultivos *Scenedesmus* sp. utilizando  $\text{NaHCO}_3$  como fonte de carbono.

Neste mesmo contexto, Abalde et al.(1995) afirmam que a produtividade de proteínas totais em espécies do gênero *Scenedesmus* sp. está diretamente ligada à concentração de nitrogênio no meio de cultivo. Eles avaliaram a porcentagem proteica *Scenedesmus obliquos* variando a concentração de nitrogênio reportando teores médios de 34,0% e 32,9% em meios de cultivo com uma concentração de nitrogênio de 0,01% e 0,1% respectivamente.

González (2006) afirma que espécies pertencentes ao gênero *Scenedesmus* sp. são de amplo potencial biotecnológico e de bioremediação. Segundo o autor, este fato está relacionado com a alta taxa metabólica e produtividade em biomassa, capacidade de resistir variações ambientais e suportar elevadas concentrações de nutrientes, como é o caso das águas residuais.

Sistemas de cultivos de *Scenedesmus* sp. acoplados a sistemas de tratamento e de produção de biomassa tem sido estudados. Um exemplo, é o trabalho realizado por Andrade et al. (2009) cujo objetivo principal foi a produção de biomassa utilizando águas residuais da indústria pesqueira. Os resultados mostraram que *Scenedesmus* sp. possui em biomassa seca cerca de 24,41%, de proteínas, 10,04% de fibra, 2,47% de lipídios e 23,52% de minerais, demonstrando o seu potencial para ser usada no tratamento de águas residuais tendo como valor agregado uma biomassa que pode ser usada como ração animal. Adicionalmente, resultados da pesquisa reportaram que a eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal, fosfatos e matéria orgânica utilizando microalgas foi de 94,44%, 77,54% e 35,59% respectivamente.

Derner (2006) determinou o teor protéico das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassioria fluviatilis* quando cultivadas em meios com adição de  $\text{CO}_2$ , a fim de avaliar o seu potencial na mitigação do principal gás de efeito estufa e alternativas de destinação. Os resultados mostraram as microalgas apresentaram uma concentração protéica de 33,82% e 40,00% para *Chaetoceros muelleri* e *Thalassioria fluviatilis* respectivamente, destacando as microalgas no tratamento biológico de gases de efeito estufa e como uma fonte protéica alternativa.

Os resultados de composição bioquímica da biomassa recuperada nas condições ótimas de cultivos de *Desmodesmus subspicatus* e Mescla Devon's destacam as microalgas como uma fonte alternativa de proteínas, carboidratos e lipídios, os quais podem ser aproveitados no setor alimentar, farmacêutico ou energético. Adicionalmente, resultados nessa pesquisa indicaram que a presença de CO<sub>2</sub> no meio foi a variável mais significativa na produção de biomassa valorizando assim, o potencial que possuem as microalgas autótrofas no tratamento biológico de efluentes gasosos e em tecnologias que visem a biomitigação de gases de efeito estufa.

## 6 CONCLUSÕES

Entre as variáveis analisadas, a presença de fumaça foi o efeito mais significativo na produção de biomassa, apresentando efeito positivo para ambos os inóculos, segundo os resultados fornecidos pela análise de ANOVA e Pareto. A adição de meio de cultivo CHU e o tipo de microalga empregada demonstraram ser as variáveis significativas na produção de biomassa, com melhor resultado para a Mescla Devon's. Adicionalmente, não houve indício de que subprodutos derivados da queima do carvão vegetal (como SO<sub>x</sub> e NO<sub>x</sub>) pudessem ser tóxicos ou inibir o crescimento das microalgas. Os resultados indicam que o uso de microalgas acopladas a sistemas de tratamento de efluentes gasosos é mais uma alternativa na mitigação de gases de efeito estufa como o CO e CO<sub>2</sub> e passível de ser usado em condições similares às da churrascaria avaliada.

A configuração estrutural e regime de cultivo condicionam a  $P_{max}$ ,  $\mu_{max}$  e DCM do cultivo. No experimento determinou-se que sistemas fechados como fotobioreatores tipo painel utilizados na pesquisa oferecem uma maior área superficial de contato o que maximiza a eficiência na captação de luz e, portanto, a fotossíntese, o que se traduz em um incremento da produção de biomassa para os dois inóculos avaliados na pesquisa. Em termos quantitativos isto quer dizer que houve um aumento de 5,70 vezes e 2,70 vezes na produção de biomassa para M. Devon's e *D. subspicatus* respectivamente ao passar do regime aberto de cultivo para o fechado de cultivo.

A centrifugação, método de separação celular empregado na pesquisa, demonstrou ser útil na recuperação celular de ambas as microalgas, com a vantagem adicional de restringir o uso de coagulantes ou floculantes químicos. Não obstante, a viabilidade em função do custo energético do seu uso dever ser avaliada para projetos futuros.

Dentro das variáveis que condicionam a composição bioquímica das microalgas estão a fonte de carbono, nitrogênio e fósforo no meio, somado à espécie e o gênero do organismo. Na pesquisa, ao analisar a composição bioquímica de *Desmodesmus subspicatus* e *M. Devon's* observou-se, que o tipo de fonte de carbono foi o fator mais relevante quando comparado ao tipo de espécie. Adicionalmente, a biomassa recuperada nesse sistema de tratamento apresentou uma concentração de macronutrientes como proteínas, carboidratos e lipídios interessante, a qual pode ser destinada para outros usos, fechando assim o ciclo completo de aproveitamento da fumaça emitida pela churrascaria.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com os resultados obtidos na realização deste trabalho, assim como o conhecimento adquirido no desenvolvimento do estudo, podem-se sugerir os seguintes trabalhos a serem desenvolvidos.

Pesquisar o rendimento do uso de outros meios de cultura não sintéticos, diferentes ao meio CHU utilizado nesse trabalho, no crescimento e produção de biomassa em sistemas abertos de cultivo. Resíduos agroindustriais são um exemplo, reduzindo o custo operacional do processo, aumentando a viabilidade técnica e tornando a tecnologia ainda mais disponível para ser replicada em outros sistemas de tratamento.

Avaliar o efeito de outras variáveis físicas como a intensidade luminosa, aeração e temperatura sobre a produção de biomassa e cinética de crescimento de *Desmodesmus subspicatus* como de outras espécies de microalgas que apresentem potencial em termos de produção de metabólitos alto valor agregado ou simplesmente biomassa.

Testar outros métodos físicos e químicos na separação e recuperação da biomassa que tornem mais eficiente dito processo sem afetar a qualidade do material recuperado (Biomassa) o que, sem dúvida, facilitaria a sua comercialização em grande escala.

Monitorar a cinética e quantificar a produtividade como o potencial de outras espécies de microalgas em sistemas de tratamento de efluentes, isto, em função da versatilidade metabólica das microalgas, sua ampla composição bioquímica, tornando este tipo de tratamento biológico uma tecnologia social.

## REFERÊNCIAS

ABALDE, J.; CID, A.; FIDALGO, P.; TORRES, E.; HERRERO, C. **Microalgas: Cultivo y Aplicaciones**. Monografía. No. 3. Laboratório de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de La Coruña, España, p.210, 1995.

ABE, S.; GALVÃO, M. Pigment chrometic adaptation in *Cyclotella caspia* Grunow (Bacillanophyta). **Boletim do instituto Oceânico. São Paulo**, v. 39, n.2, p:123-130, 1991.

AN, S.S., FRIEDL, T; HEGEWALD, E. Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Scenedesmus* like coccoid green algae as referred from ITS-2 rDNA sequence comparisons. **Plant biology**, v.1,p. 418-428,1999.

ANDRADE, C. E.; VERA, A. L.; CARDENAS, C. H.; MORALES, E. D. Producción de biomasa de la microalga *Scenedesmus* sp. utilizando aguas residuales de pescadería . **Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia** v.32, n.2, p. 126-134, 2009.

APHA, American Public Health Association. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 20<sup>th</sup> edition. 102001 – Determination of biomass (standing crop). 2005.

BARBOSA, M.J.G.V. **Microalgal photobioreactors: scale-up and optimisation**. PhD thesis. Wageningen University, The Netherlands; 2003

BARBOSA, V. **Produção de biodiesel a partir do cultivo de microalgas: estimativa de custos e perspectivas para o Brasil**. 2012.171f.Dissertacao (Mestrado em Planejamento Energético), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

BASOVA, M. M.; Fatty acid composition of lipids in microalgae. **International Journal on Algae**, v. 7, n.1, p.33, 2005.

BECKER, E.W. Microalgae in human and animal nutrition. In: Richmond A, editor. Handbook of Microalgal Culture. **Biotechnology and Applied Phycology**. Oxford: Blackwell Science. p. 312–51, 2004.

BECKER, E, W. Production and utilization of the blue-green algae *Spirulina* in India. **Biomass**, v. 4, p .105-125, 1984.

BECKER, E.W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances** v, 25, p.207–10, 2007.

BEER, L.; BOYD, E. S; PETERS, J; POSEWITZ, M. C. Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. **Current Opinion in Biotechnology**, v.20, p.264-271, 2009.

BELLINGER, E. B. **Key to Common Algae. Freshwater, estuarine and some coastal species**. The institute of water and Environmental Management - London, p.138, 1992.

BENEMANN, R. **Systems and economic analysis of microalgae ponds for conversion of CO<sub>2</sub> to biomass**. 4th Quarterly technical progress report. Conference: US/Japan meeting on coal energy research, Albuquerque, United States, 1996.

BENEMANN, J.R.; VAN, J.C.; MASSINGILL, M.J.; WEISSMAN, J.C.; BRUNE, D.E. **The controlled eutrophication process: using microalgae for CO<sub>2</sub> utilization and agricultural fertilizer recycling**. In: Gale J, Kaya Y, editors. Greenhouse gas control technologies—6th international conference. Oxford: Pergamon, p. 1433–8, 2003.

BICUDO, C. E. M; MENEZES, M. **Gênero de Algas de águas continentais do Brasil** - Chave para Identificação e Descrição. Rima – São Carlos – SP, 2006.

BILANOVIC, D.; ANDARGATCHEW, A.; KROEGER, T.; SHELEF, G.. Freshwater and marine microalgae sequestering of CO<sub>2</sub> at different C and N concentration response surface methodology analysis. **Energy Conversion and Management**, v.50, n.2, p.262–7, 2009.

BJERK, T. **Cultivo de microalgas em fotobiorreator e reator misto visando a biorremediação e produção de biocombustíveis**. 2012. 106 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental)- Departamento de Química Industrial -, Universidade de Santa Cruz, Rio Grande do Sul, 2012.

BLIGH, G.; DYER, J. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Journal of Physiology and biochemistry**, v. 37, p.911-917, 1959.

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

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

BOUVENG, H. O.; LINDBERG, B. **Methods in structural polysaccharide chemistry**. Academic Press. Volume 15: p. 53-89, 1961.

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

CANTER-LUND, H.; LUND, J. **Freshwater Algae – Their Microscopic world explored**. Biopress Limited - England, 1998.

CARLSSON A; VAN B; MOLLER R; CLAYTON D. **Micro- and macro-algae: utility for industrial applications**. EPOBIO Project, 2007. Disponível em: <http://epobio.net/pdfs/0709AquaticReport.pdf>. Acesso em Novembro, 2013.

CARMOUZE, J.P. **O metabolismo dos ecossistemas aquáticos: fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas**. Editora Edgard Blucher/FAPESP, São Paulo, p.254, 1994.

CARVALHO, A.; MEIRELES, L.; MALCATA, F. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. **Biotechnology Progress**, v. 22, n. 6, p. 1490–506, 2006.

CHACON, LEE.; MARIÑO. G.E. Microalgae for “Healthy” Foods—Possibilities and Challenges T.L **Comprehensive Reviews. Food Science and Food Safety**, v. 9, p.655-675, 2010.

CHEN, C.; YEH, K.; AISYAH, R.; LEE, D.; CHANG, J. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. **Bioresource Technology**, v.102, p. 71-81, 2011.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n.33, p.294–306, 2007.

CHIU, S.; KAO, C.; CHEN, C.; KUAN, T.; ONG, S.; LIN, C. Reduction of CO<sub>2</sub> by a high density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 9 p. 3389–96, 2008.

CHIU,S.; TSAI, M.; KAO, C.; ONG, S.; LIN. The air-lift photobioreactors with flow patterning for high-density cultures of microalgae and carbon dioxide removal. **Engineering in Life Sciences**, v. 9, n. 3, p. 254-260, 2009.

CHU, S. P. The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae. Methods and culture media. **Journal of Ecology**, n.30, p. 284-325, 1942.

CHUN, Y. C.; XIN, Q. Z.; HONG, W.Y.; SHIH, H. H.; CHIEH, L. C.; DUU, J. L.; FENG, W. B; JO, S. C. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal** v, p. 1-1078, 2013.



COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; REICHERT, C.; COSTA, J. A. V. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1489-1493, 2007.

CORNET, J. F.: Le technoscope: les photobioréacteurs. **Biofutur**, v, 176, p.1–10, 1998.

COSTA, L.P. **Projeto de construção de um fotobioreator para crescimento acelerado de microalgas**. 2012.118f. Dissertação (Mestrado em engenharia mecânica)-Escola de engenharia-, Universidade do Minho, Portugal, 2012.

COSTA, G. A.; LINDE, D. I. P.; ATALA, G. M.; MIBIELLI.; R. T. KRÜGER. Modelling of Growth Conditions for Cyanobacterium *Spirulina platensis* in Microcosms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 15-18, 2000.

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.

COX, E. J. **Identification of freshwater Diatoms from live Material**. Chapman & Hall – London, p.158, 1996.

DAVIS, R.; ADEN, A.; PIENKOS, P.T. "Techno-Economic Analysis of Autotrophic Microalgae for Fuel Production." **Applied Energy** v.88; p. 3524–3531, 2011.

DA SILVA, A; VIEIRA, G.E; MARQUES, A. O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis, **Revista Brasileira de Biociências**, v.9, n.4, 2011.

DEMIRBAS, M. F. Biofuels from algae for sustainable development. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3473-3480, 2011.

DE MORAIS, M.; COSTA, V. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. And *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. **Journal of Biotechnology**, v.129, n.3, p.439–45, 2007.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Bioprocessos para remoção de dióxido de carbono e óxido de nitrogênio por microalgas visando a utilização de gases gerados durante a combustão do carvão. **Química Nova**, v. 31, p. 1038-1042, 2008.

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

DERNER, R. **Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos polinsaturados**. 2006,158f. Tese

(Doutorado em ciência dos alimentos)- Departamento de ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

DESMORIEUX H, DECAEN N. Convective drying of *spirulina* in thin layer. **Journal of Food Engineering**, v.66,n.4, p.497–503,2006.

DOUCHA, J.; STRAKA, F.; LIVANSKY, K. Utilization of flue gas for cultivation of microalgae (*Chlorella* sp.) in an outdoor open thin-layer photobioreactor. **Journal of Applied Phycology**, v. 17, n.5, p.403–12, 2005.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**. v.28, n.3, p.350-356, 1956.

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

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

FERNÁNDEZ, F.G.; GONZÁLEZ, C.V.; FERNÁNDEZ, J.M.; MOLINA, E. Conversion of CO<sub>2</sub> into biomass by microalgae: how realistic a contribution may it be to significant CO<sub>2</sub> removal? **Applied microbiology biotechnology**, v. 96, p.577–586, 2012.

GINZBURG B. Z. Liquid fuel (oil) from halophilic algae: a renewable source of non-polluting energy. **Renewable Energy**, v.3, p.249–252,1993.

GLADUE, M. Heterotrophic microalgae production potential for application to aquaculture feeds. In: FULKS,W.; MAIN.K (EDS). **Rotifer and microalgae culture Systems**. In: US-ASIA Workshop, Honolulu, p: 275-286, 1991.

GOLUEKE, C. G.; OSWALD, W. J. Harvesting and Processing Sewage-Grown Planktonic Algae." **Journal Water Pollution Control Federation**, v, 37, n.4, p.471-498,1965.

GOVINDJEE; B.; ZILINSKAS, B. **Light Absorption, Emission and Photosynthesis**. Algal Physiology and Biochemistry (ed. W.D.P. Stewart).Blackwell Scientific Publication Ltd, Oxford, p. 346-390, 1974.

GRESSLER, P.D. **Avaliação da eficiência de *Desmodesmus subspicatus* (Chlorophyceae) (R. Chodat) cultivada em fotobiorreator tubular com efluente da ETE-UNISC, visando biorremediação e obtenção de energia**. 2011. 130 f. Dissertação (Mestrado em tecnologia ambiental).Departamento de química industrial. Universidade de Santa Cruz, Rio Grande do Sul, 2011.

GRIMA, E.; BELARBI, E.; FERNÁNDEZ, F.G.; MEDINA, A.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, n.7-8, p.491-515, 2003.

GONZÁLEZ, M. "Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales". Laboratorio de Microbiología Ambiental y Tratamiento de Aguas Residuales. Departamento de Biotecnología. UAM-I. México. **Contactos**, v.59, p.64-70, 2006.

GUDIN, C.; THERPENIER, C. Bioconversion of solar energy into organic chemicals by microalgae. **Advances in Biotechnological Processes**, v.6, p. 73–110, 1986.

GUSHINA, A.; HARWOOD, L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae, **Progress in Lipid Research**, v. 45, p. 160–186, 2006.

HALMANN, M. **Chemical fixation of carbon dioxide: methods for recycling CO<sub>2</sub> into useful products**. CRC Press, Ann Arbor, MI, 1993.

HARRINGTON, L.; FOSTER, R. Australian residential building sector greenhouse gasemissions 1990–2010. **Final Report, Energy Efficient Strategies**. Australian Greenhouse Office. 1999.

HARUN, R.; DANQUAH, M. K. Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. **Process Biochemistry**, v.46, p. 304-309, 2011.

HEGEWALD, E.; SCHMIDT, A.; SCHNEPF, E. Revision der lateral bestachelten Desmodesmus-Arten.1.*Desmodesmus subspicatus* (R. Chodet.) E. Hegew. Et A. Schmidt. **Algological Studies** n.101,p.1-26, 2001.

HIRAYAMA, S.; UEDA, R.; SUGATA, K. Evaluation of active oxygen effect on photosynthesis of *Chlorella vulgaris*. **Free Radical Research**, v.25, n.3, p.247-257, 1996.

HU, Q.; ZARMI, Y.; RICHMOND, A. Combined effects of light intensity, light path and culture density on output rate of *Spirulina platensis* (Cyanobacteria). **European Journal of Phycology**, v. 33, p.165–171, 1998.

HUNTLEY, M.E.; REDALJE, D.G. **CO<sub>2</sub> mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal. Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, v.12, n. 4, p.573–608, 2007.

ISHIDA, Y.; HIRAGUSHI, N.; KITAGUCHI, H.; MITSUTANI, A.; NAGAI, S.; YOSHIMURA, M. A highly CO<sub>2</sub>-tolerant diatom, *Thalassiosira weissflogii* H1, enriched from coastal sea, and its fatty acid composition. **Fisheries Science**, v.66, n.4, p. 655, 2000.

JOHN, R.P.; ANISHA, G.S.; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, v.102, p.186–193, 2011.

KNIE, L.W.; LOPES, E. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis : FATMA/GTZ, p.289, 2004.

KIRK, O. **Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems**, Second Edition, Cambridge Univ. Press, 1994.

KNUCKEY, R.; BROWN, M.; ROBERT, R.; FRAMPTON, D. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. **Aquacultural Engineering** , v.35, n.3, p.300–13, 2006.

KODAMA, M.; IKEMOTO, H.; MIYACHI, S. A new species of highly CO<sub>2</sub>-tolerant fast growing marine microalga suitable for high-density culture. **J. Marine Biotechnol**, v.1, p. 21–25, 1993.

KOCHEM, L.E. **Caracterização de fotobioreator air-lift para cultivos de microalgas**. 2010. 47f. Trabalho de conclusão de curso (Engenharia Química) Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

KUMAR, K. Chlorophyta, **Indian Council of agricultura research**. New Delhi, p.365, 1957.

LEE, D.; APEL, W.A.; WALTON, M.R. Screening of cyanobacterial species for calcification. **Biotechnology Progress**, v. 20; p. 1345-1351, 2004.

LOURENÇO, S.O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006.

McCAUSLAND, M.A.; BROWN, M.R.; BARRET, S.M.; DIEMAR, J.A.; HEASMAN, M.P. Evaluation of live of microalgae pastes supplementary food for juvenile Pacific Oysters (*Carassostrea gigas*). **Aquaculture**, v.174, p. 323-342, 1999.

MAKULLA, A. Fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus*: correlation to dilution rates. **Limnologica**, v.30, p.162–8, 2000.

MARCUS, Y. Distribution of inorganic carbon among its component species in cyanobacteria: do cyanobacteria in fact actively accumulate inorganic carbon? **Journal of Theoretical Biology**, v. 185, p.31-45, 1997.

MARSH, J. B.; WEINSTEIN, D.B. Simple charring method for determination of lipid. **The Journal of Lipid Research**, v. 7, p. 574-576, 1966.

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

MATSUNAGA, T.; MATSUMOTO, M.; MAEDA, Y.; SUGIYAMA, H.; SATO, R.; TANAKA T. Characterization of marine microalga, *Scenedesmus* sp. Strain JPCC GA0024 toward biofuel production, **Biotechnology Letters**, v. 31, p.1367 – 1372, 2009.

MIAO, X.; WU, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology**, v.97, p.841-846, 2006.

MIKAMI, W. **Avaliação da eficiência de um sistema biológico para tratamento de emissões atmosféricas**. 2011,62f. Trabalho de conclusão de curso (Curso superior em Tecnologia de processos ambientais)-Departamento de Química e Biologia Universidade Tecnológica Federal de Paraná (UTFPR) Campus Curitiba.

MOHN, F.H. **Experiences and strategies in the recovery of biomass from mass cultures of microalgae**. Shelef G, Soeder CJ, editors. p. 547–71, 2008.

MOHEIMANI, N.R. **The culture of Coccolithophorid Algae for carbon dioxide bioremediation**. Thesis for the degree of doctor of philosophy. School of Biological Sciences and Biotechnology, Murdoch University, 2005.

MOLINA, E.; MEDINA, A.; GIMENEZ, A.; SANCHEZ, J.A.; CAMACHO, F.; GARCIA, J.L. Comparison between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass. **Journal of the American Oil Chemistry Society**; v.71, n. 9, p.955–9, 1994.

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

MONTAINI, E.; CHINI, G.; TREDICI, M.R.; GRIMA, E.M.; SEVILLA, J.M.F.; SANCHEZ, J.A. Long term preservation of *Tetraselmis suecica*: influence of storage on viability and fatty acid profile. **Aquaculture**, v.134, n.1 p.81-90, 1995.

MORCELLI, A. **Estudo da eficiência de diferentes agentes coagulantes na sedimentação de microalgas cultivadas em fotobioreatores**. Trabalho de diplomação em Engenharia Química – Departamento de engenharia química Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2011.

NUNEZ, M. **Avaliação da qualidade de pastas de microalgas em laboratório de larvicultura de moluscos no sul de Brasil**. 2015. 35 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura)- Departamento de Aquicultura -, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

NUSCH, E. A. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. **Archiv für Hydrobiologie–Beiheft Ergebnisse der Limnologie**, v.14, p. 14-36, 1980.

OLIVERA, A. **Crescimento das diatomáceas bacillariophyceae, *Chaetoceros* sp., *Skeletonema costatum* e *Thalassiosira fluviatilis* em diferentes meios de cultivo e em condições controladas de temperatura e sanidade.** 1993. 204 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura)– Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

OSWALD, W. Large-scale systems (engineering aspects). **Microalgal Biotechnology.** Cambridge University Press, p. 357-394, 1988.

PETRUSEVSKI, B.; BOLIER, G.; VAN, A.N.; ALAERTS, G.J. Tangential flow filtration: a method to concentrate freshwater algae. **Water Research**, v. 29, n.5, p.1419–24, 1995.

PARANÁ. Governo do estado de Paraná. Secretaria de estado do meio ambiente e recursos hídricos (SEMA). Resolução N° 054/06. Dezembro, 2006. Disponível em : <http://www.abic.com.br/publique/media/res05423191.pdf> Acesso em: 5 Novembro, 2013.

PRAKASH, J.; PUSHPARAJ, B.; CARLOZZI, P.; TORZILLO, G.; MONTAINI, E.; MATERASSI, R. Microalgae drying by a simple solar device. **International Journal of Solar Energy**, v, 18, n. 4, p.303–11, 1997.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 65, p. 635–48, 2004.

QUEVEDO, C.; MORALES, S.; ACOSTA, A. Crecimiento de ***Scenedesmus* sp. en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal** , v.15, n.1, p. 25-31, 2008.

RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e NO. **Química Nova**, v. 31 n.7, p. 1609-1612, 2008.

RAYMUNDO, M.; HORTA, P.; FETT, R. Atividade antioxidante in vitro de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.40, n. 4, 2004.

REALI, M.A. **Flotação de microalgas cultivadas em fotobiorreatores alimentados com vinhaça pré-tratada por coagulação, floculação e sedimentação ou microfiltração, com vistas à produção de biodiesel.** Escola de Engenharia de São Carlos, 2012.

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

RITTENBERG, D.; In: Wilson, D.W.; Nier, A.O.C.; Riechman (eds.) **Preparation and measurement of isotopic tracer.** Edwards, Ann Arbor, Mich., p.31-42, 1948.

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

RODOLFI, L.; ZITTELLI, G.C.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering** v. 102, n. 1, p. 100–120, 2008.

RODRIGUES, F. Pequenas notáveis. **Revista BiodieselBR**, n. 6, p.36-41, 2008

ROSSIGNOL, N.; VANDANJON,L.; JAOUEN, P.; QUÉMÉNEUR, F. "Membrane technology for the continuous separation microalgae/culture medium: compared performances of cross-flow microfiltration and ultrafiltration." **Aquacultural Engineering**, v.20, n. 3, p. 191-208,1999.

ROMERO, J.; ACIÉN, F.; FERNÁNDEZ, J. Development of a process for the production of l-amino-acids concentrates from microalgae by enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v.112, p. 164–170, 2012.

SAKSHAUG, E. Problems in the methodology of studying phytoplankton. In MORRIS, I. (Ed) **Physiological ecology of phytoplankton**. Balckwell, Oxford, p. 57-94, 1981.

SANCHEZ, J.F.; FERNANDEZ, J.M.; ACIEN, F.G.; RUEDA, A. ; PEREZ, J.; MOLINA, E. Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. **Process biochemistry**, v, 43, p. 398-405, 2008.

SCHENK, P., S.; THOMAS, S.; STEPHENS, E.; UTE, M.; MUSSGUG, J.; POSTEN, C.; KRUSE,O.; HANKAMEN, B. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. **BioEnergy Research**, v.1, n.1, p. 20-43, 2008.

SINGH, J.; GU, S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, p. 2596-2610, 2010.

SOARES, A.; FIGUEIREDO, A.G. O ambiente marinho. Em: PEREIRA, R. G., SOARES-GOMES, A (Organizadores). **Biologia Marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, p.1-34, 2002.

SOLETTI, D.; BINAGHI, L.; LODI, A.; CARVALHO, J. C. M.; CONVERTI, A. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. **Aquaculture**, v.243, p. 217–224, 2005

SPOLAORE, P.; JOANNIS, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101,p. 87–96,2006.

STAHL, E. **Thin Layer Chromatography- a laboratory handbook**, p.979, 1967.

STEWART, C.; HESSAMI, M. A study of methods of carbon dioxide capture and sequestration. The sustainability of a photosynthetic bioreactor approach **Energy Conversion and Management**, v 46, p. 403-420, 2005.

STEPAN D.J.; SHOCKEY, R.E.; MOE, T.A.; DORN, R. **Carbon dioxide sequestering using microalgae systems**. Pittsburgh, PA: U.S. Department of Energy, 2002.

STRICKLAND, J. D. H.; PARSONS, T. R. **A practical handbook of seawater analysis**. Bulletin Fisheries Research board of Canada, Ottawa, n. 167, p. 1-205, 1972.

STOLZ, P.; OBERMAYER, B. **Manufacturing microalgae for skin care**. Cosmetics Toiletries, 120, p. 99-106, 2005.

TERRY, K.; RAYMOND, L. System design for the autotrophic production of microalgae. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, n. 10, p. 474–87, 1985.

TORZILLO, G.; VONSHAK, A. Effect of light and temperature on the photosynthetic activity of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Biomass and Bioenergy**, v.6, p.5, p. 399-403, 1994.

UEDA, R.; HIRAYAMA, S.; SUGATA, K.; NAKAYAMA, H. Process for the production of ethanol from microalgae. **US Patent**, v.5, p. 578, 472, 1996.

UGWU, C.; AOYAGI, H.; UCHIYAMA, H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. **Bioresource Technology**, v 99, n.10, p.4021–28, 2008.

VALENCIA, I.; ANSORENA, D.; ASTIASARI. Development of dry fermented sausages rich in docosahexaenoic acid with oil from the microalga *Schizochytrium* sp.: influence on nutritional properties, sensorial quality and oxidation stability. **Food Chemistry Journal**, v.104, p.1087–96, 2007.

VARGAS, M.; RODRÍGUEZ, H.; MORENO, J.; OLIVARES, H.; DEL CAMPO, J.; RIVAS, J.; GUERRERO, M. Biochemical composition and fatty acid content of filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria. **Journal of Phycology**, v. 34, p. 812–817, 1998.

WANG, B.; LI, Y.; WU, N.; LAN, C. CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.79, p.707-718, 2008.

XIN, L.; HONG-YING, HU.; KE, G.; YING, SU. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, v.101, p. 5494–5500, 2010.



XU, L.; WEATHERS, P.; XIONG, X.; XUE-RONG, X.; CHUN-ZHAO, L. Review: "Microalgal bioreactors: Challenges and opportunities". **Engineering in Life Sciences**, v. 9, n.3, p. 178-189, 2009.

YUN Y.S.; LEE S.B.; PARK J.M.; LEE C.I.; YANG, J.W. Carbon dioxide fixation by algal cultivation using wastewater nutrients. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 69, n.4, p.451-5, 1997.

ZAMALLOA, C.; VULSTEKE, E.; ALBRECHT, J.; VERSTRAETE, W. **Bioresource Technology**, v.102, p.1149-1158, 2011.

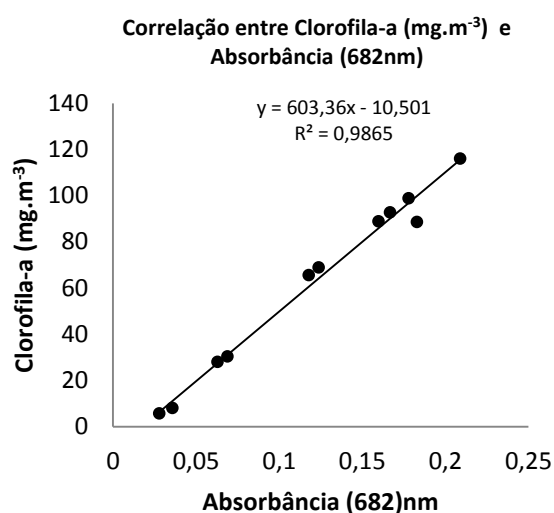
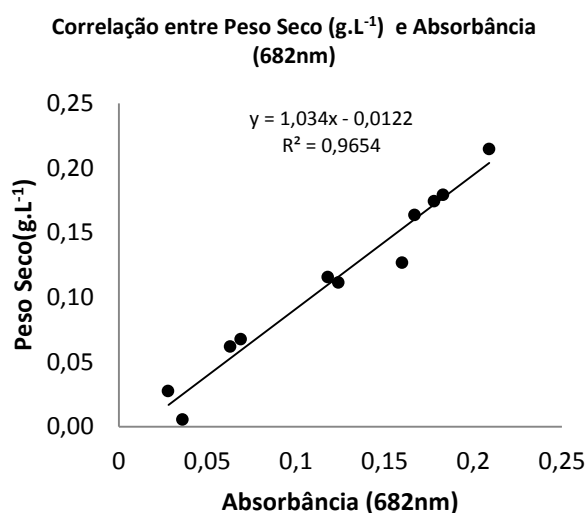
ZARDO, I. **Análise de viabilidade econômica da produção de biodiesel a partir de microalgas**. Trabalho de diplomação em Engenharia Química. Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2011.

## APÊNDICE

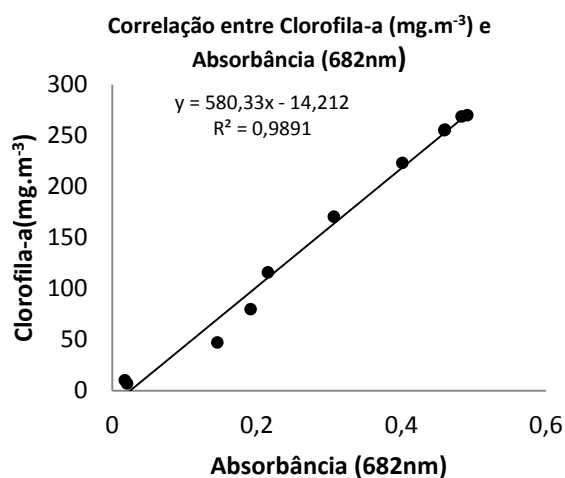
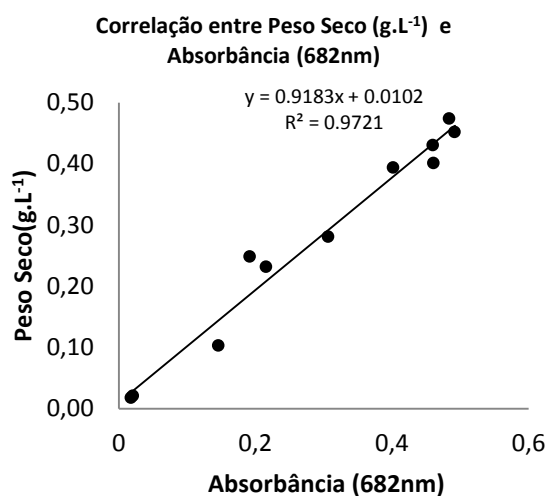
Curvas de correlação linear entre absorvância (682nm) clorofila-a ( $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) e peso seco ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) para o sistema aberto e fechado de cultivo.

### APÊNDICE A: SISTEMA ABERTO DE CULTIVO (CAIXAS)

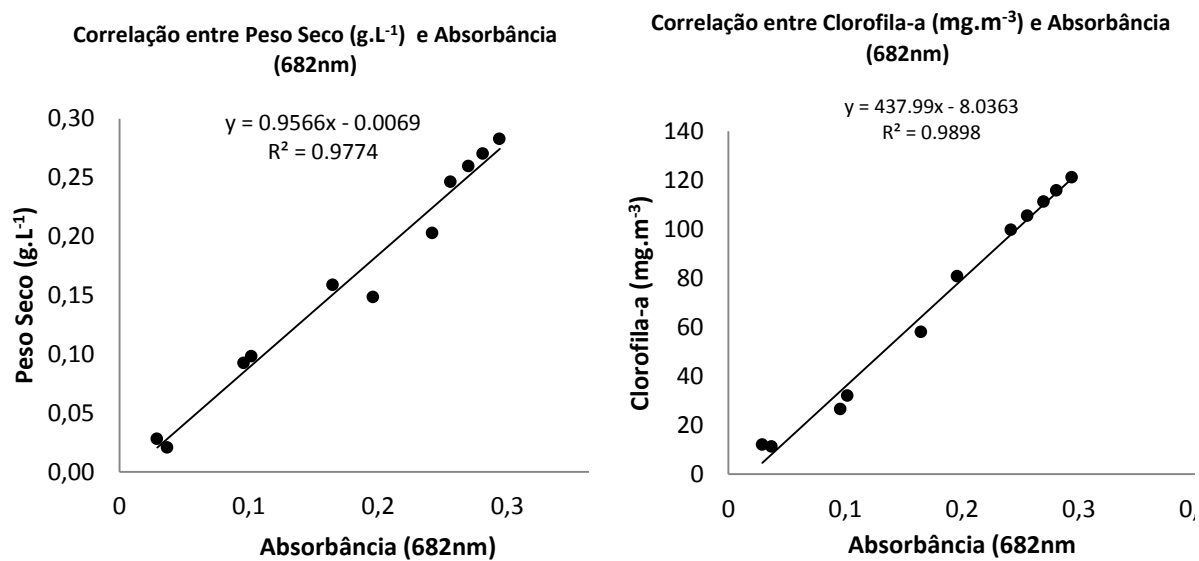
Mescla Devon's + fumaça + água



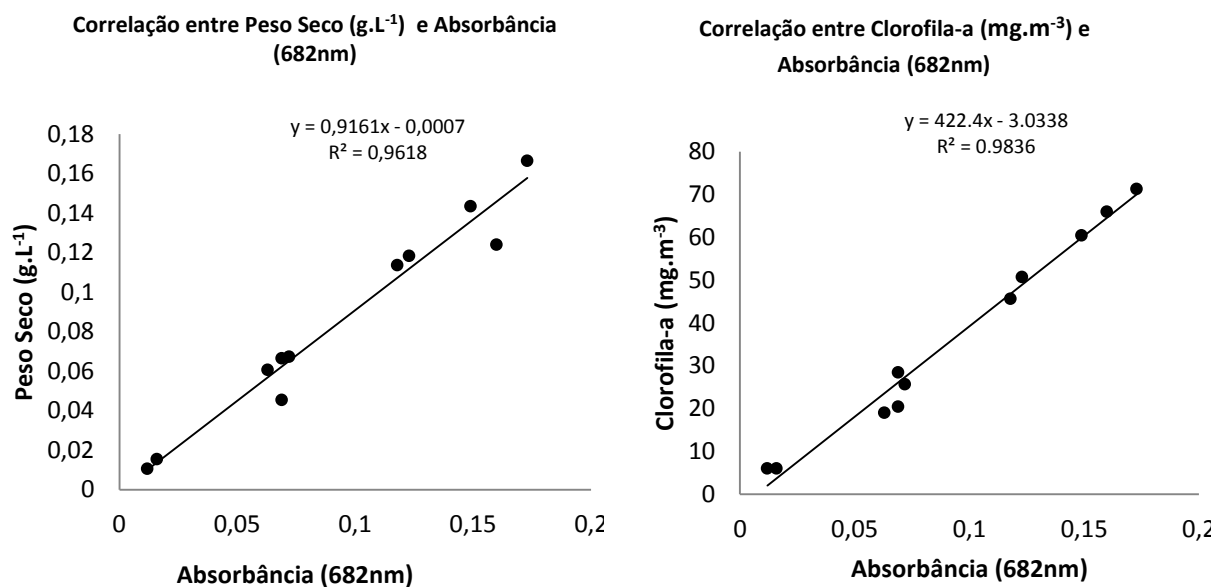
Mescla Devon's + fumaça + Meio de Cultura CHU



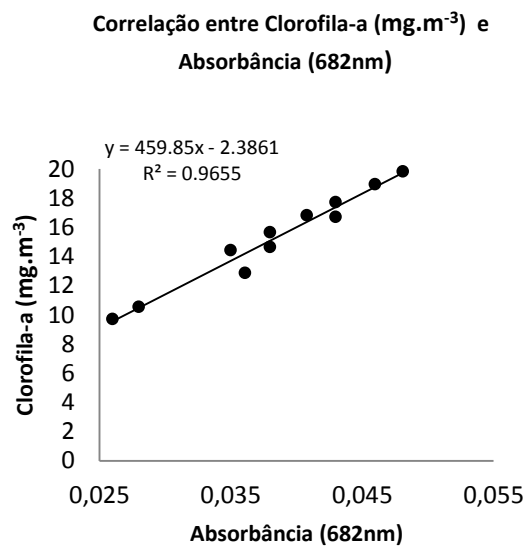
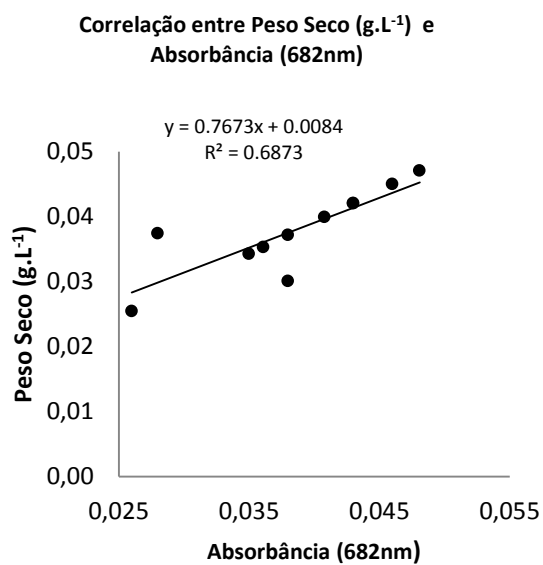
Microalga *Desmodesmus subspicatus*+ fumaça + Meio de Cultura CHU



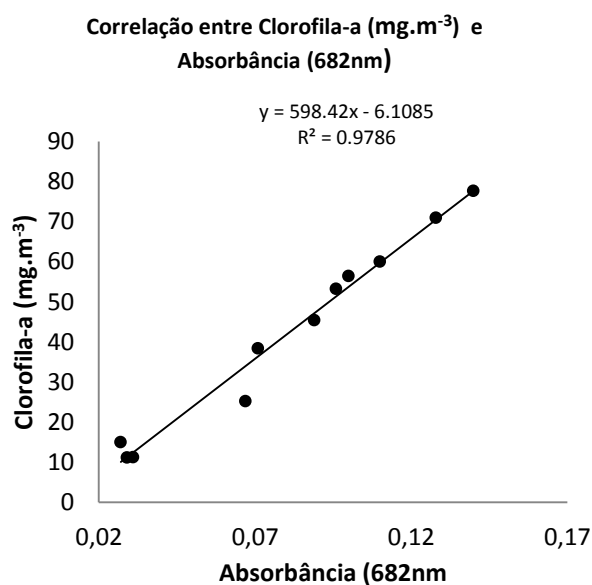
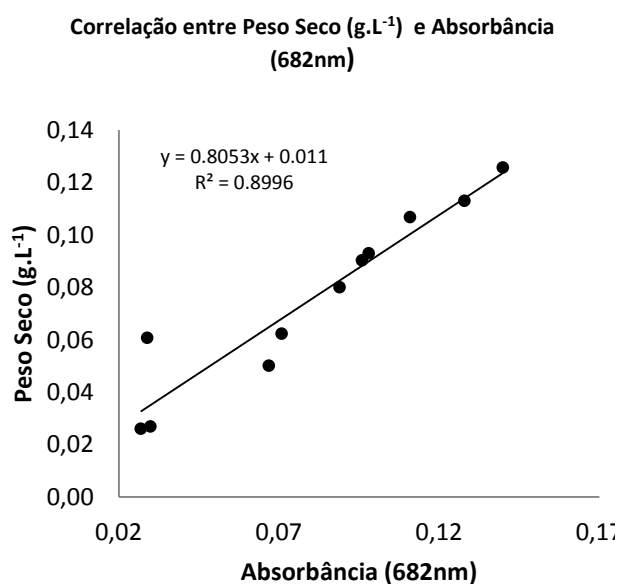
Microalga *Desmodesmus subspicatus*+ fumaça



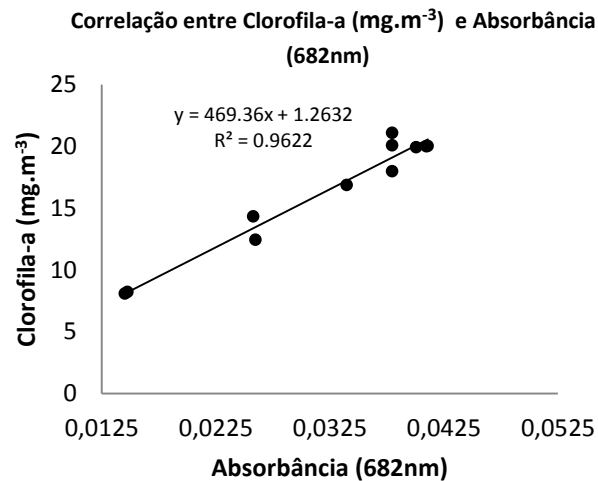
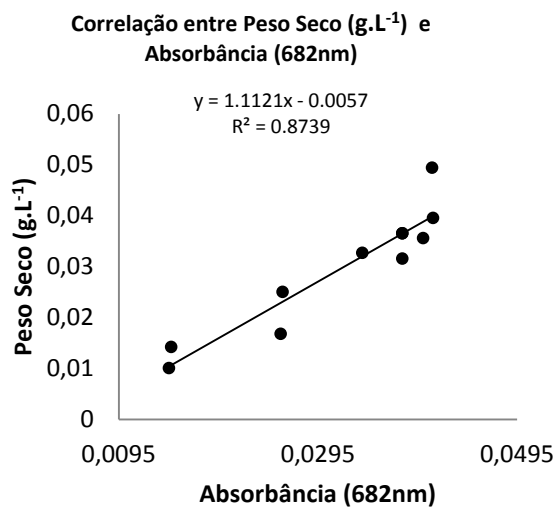
Microalga *Desmodesmus subspicatus*+ Aeração+ Água



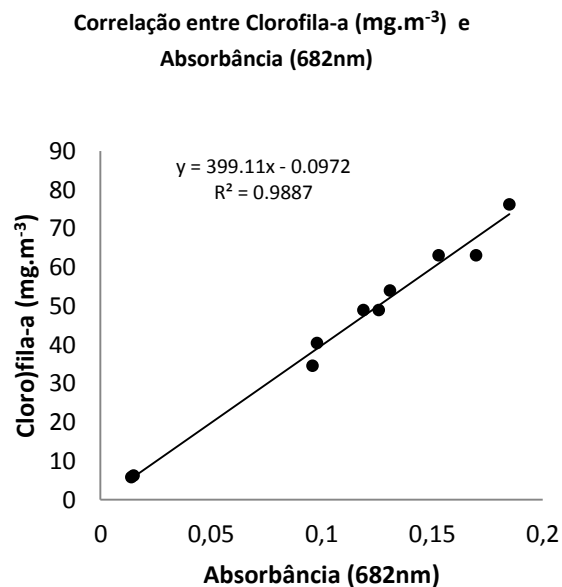
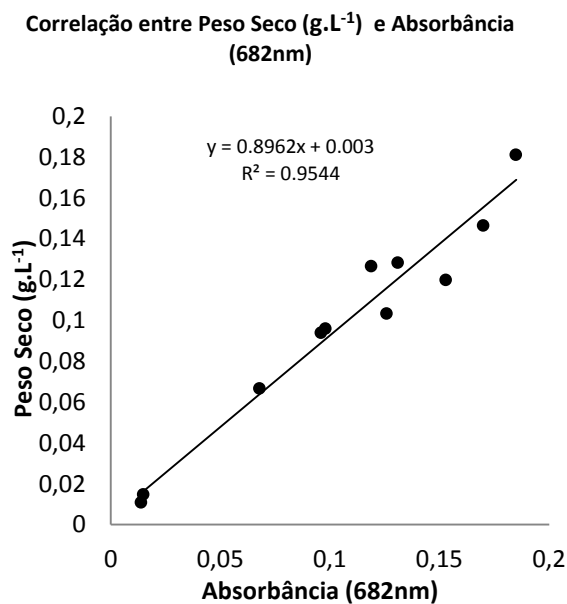
Mescla Devon's + Aeração+ Meio de cultura CHU



Mescla Devon's +Aeração + Meio de Cultura CHU

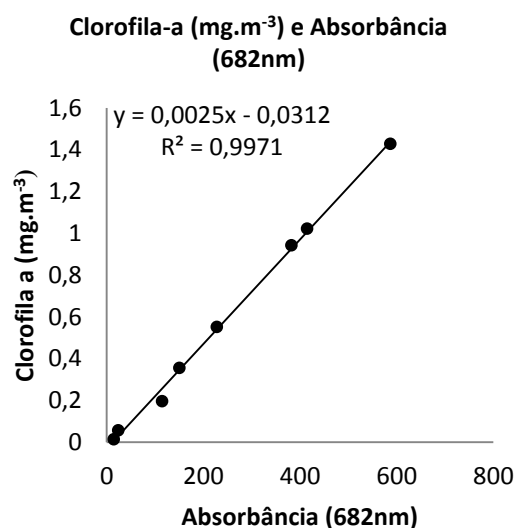
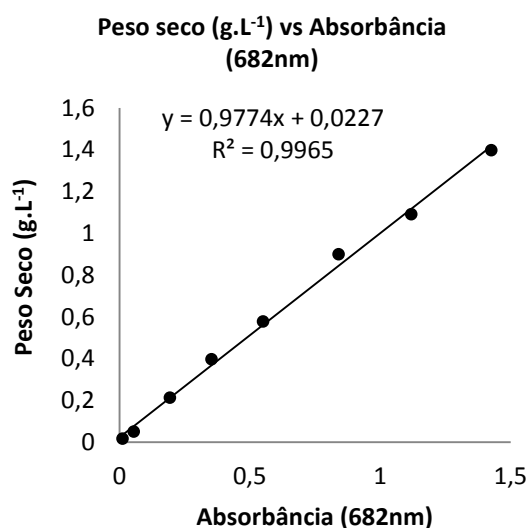


Microalga *Desmodesmus subspicatus*+ Aeração + Meio de cultura CHU



## APÊNDICE B: SISTEMA FECHADO DE CULTIVO (FOTOBIOREATOR- TIPO PAINEL)

Microalga *Desmodesmus subspicatus* + Meio de cultura CHU + Fumaça



Mescla Devon's+ Meio de cultura CHU + Fumaça

