



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL  
CURSO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL**

**TAMIRES DE QUEIROZ VIEIRA**

**USO DE RESÍDUOS LÍQUIDOS NO CULTIVO DA MICROALGA *Chlorella* sp COM  
POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS**

**CAMPINA GRANDE – PB  
2013**

**TAMIRES DE QUEIROZ VIEIRA**

**USO DE RESÍDUOS LÍQUIDOS NO CULTIVO DA MICROALGA *Chlorella* sp  
COM  
POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado a Coordenação do Curso de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Sanitária e Ambiental.

**Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Weruska Brasileiro Ferreira**

**CAMPINA GRANDE – PB  
2013**

V658u Vieira, Tamires de Queiroz.

Uso de resíduos líquidos no cultivo da microalga *Chlorella sp* com potencial para produção de biocombustíveis [manuscrito] / Tamires de Queiroz Vieira. – 2013.

**61 f. : il. color.**

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências e Tecnologias, 2013.

“Orientação: Profa. Dra. Weruska Brasileiro Ferreira, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental”.

1. Biocombustível. 2. Energia renovável. 3. Vinhaça. I. Título.

21. ed. CDD 662.88

**TAMIRES DE QUEIROZ VIEIRA**

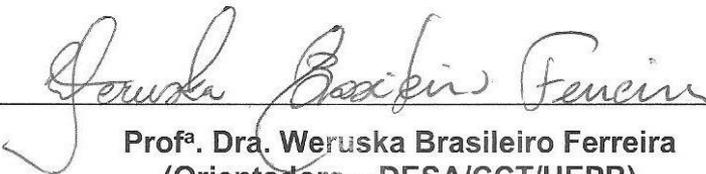
**USO DE RESÍDUOS LÍQUIDOS NO CULTIVO DA MICROALGA *Chlorella* sp COM  
POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS**

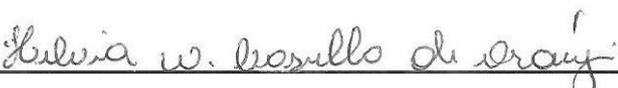
Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado a Coordenação do Curso de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Sanitária e Ambiental.

Aprovado em: 29 / 08 / 2013

Nota: 9,5 ( NOVE e MEIO )

**Examinadores:**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof<sup>a</sup>. Dra. Weruska Brasileiro Ferreira**  
(Orientadora – DESA/CCT/UEPB)

  
\_\_\_\_\_  
**Prof<sup>a</sup>. Dra. Hélvia Walewska Casullo de Araújo**  
(DQ/CCT/UEPB)

  
\_\_\_\_\_  
**Prof<sup>a</sup>. Dra. Neyliane Costa de Souza**  
(DESA/CCT/UEPB)

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por nunca ter me abandonado em toda a minha caminhada. Mesmo quando não somos fiéis, ele permanece fiel.

Aos meus pais, Vandilmo e Fátima, obrigada por serem a minha referência de tantas maneiras e estarem sempre presentes na minha vida de uma forma indispensável.

As minhas irmãs, Simone e Jéssica, que de forma especial e carinhosa me deram força e coragem, torceram e vibraram comigo. Obrigada pelas palavras de incentivo, amo vocês!

A minha avó, Dona Sinhá, por ter me acolhido carinhosamente em sua casa durante toda essa jornada, sempre se preocupando com a minha alimentação ou com meus horários.

As minhas amigas e futuras companheiras de profissão, Isaura e Jaqueline, durante esses cinco anos, choramos e sorrimos muitas vezes, compartilhamos sonhos, conselhos e ensinamentos. Obrigada por se importarem comigo, pelas conversas e por deixarem minhas tardes e algumas manhãs mais interessantes. Torço muito por vocês, minhas amigas/irmãs.

A todos os meus amigos que me apoiaram, me corrigiram, me aturaram e que me fizeram saber que, antes de tudo, sem eles não teria graça alguma. Obrigada, vocês que aliviaram minhas horas difíceis, me alimentando de certezas, força e alegria.

Aos amigos de laboratório, Tássio, Lana, Olga, Yohana, Débora e Renan, pela amizade e auxílio na execução deste trabalho e pela paciência durante todos os dias no laboratório.

A professora Weruska Brasileiro, minha querida orientadora, pela convivência harmoniosa, pelas trocas de conhecimento e experiências que foram tão importantes na minha vida acadêmica/pessoal e que contribuíram para o meu novo olhar profissional. Quero expressar o meu reconhecimento e admiração pela sua competência profissional e minha gratidão pela sua amizade.

***“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.***

(Albert Einstein)

VIEIRA, Tamires de Queiroz. **Uso de resíduos líquidos no cultivo de microalgas com potencial para produção de biocombustíveis.** Campina Grande, UEPB, 2013, 61 p. (Monografia para Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental).

## RESUMO

O mundo vive hoje uma dupla crise mundial devido ao uso excessivo de combustíveis fósseis e seus efeitos danosos ao meio ambiente. Com isso, é imprescindível e urgente obter uma fonte energética renovável, e as microalgas é a opção mais atrativa, pois dá um destino adequado para as águas residuárias, atuando como uma excelente fonte para a produção de biocombustíveis. No entanto, as microalgas para seu desenvolvimento necessitam de nutrientes adequados, provenientes da preparação de um meio sintético, ou de outros meios modificados, como o uso de águas residuárias domésticas. Este trabalho estudou o comportamento celular da microalga *Chlorella* sp em cultivos mixotróficos, através da adição de resíduos líquidos ao meio de cultura *Bold's Basal Medium*, visando o suprimento da cadeia produtiva de biocombustíveis, através do uso das microalgas. A primeira etapa do trabalho consistiu na adição de glicerina ao meio em diferentes proporções (2%, 4% e 10%), verificou-se que os resultados não foram satisfatórios para o desenvolvimento da célula, inviabilizando o uso do resíduo em questão para o cultivo de *Chlorella* sp visando a obtenção de lipídios ou outros insumos proveniente da célula em estudo. A segunda etapa realizada consistiu na suplementação da vinhaça ao meio em diferentes proporções (10%, 15%, 20% e 25%), esse estudo obteve resultados satisfatórios porque a vinhaça apresentava características para o desenvolvimento da microalga em estudo e houve também condições de obter o cultivo mixotrófico com a vinhaça devido à presença de sua carga orgânica e alta produção celular. A proporção de vinhaça que obteve melhor crescimento foi com a suplementação de 10%, onde se verificou uma excelente adaptação das células a nova composição do meio de cultivo. Com a adição de vinhaça a porcentagens maiores que 10% ao meio de cultivo, verificou-se uma dificuldade no crescimento das células, devido ao excesso de material suspenso presente na vinhaça. Logo, para os resultados obtidos para a segunda etapa, pode-se dizer que é uma técnica viável, pois dará um destino adequado para o resíduo líquido oriundo das indústrias sucroalcooleiras por meio do cultivo de microalgas com potencialidade de produção biocombustíveis, gerando desta forma uma nova fonte de produção de bioetanol e biodiesel.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biocombustíveis; Microalga; Vinhaça; Glicerina.

VIEIRA, Tamires de Queiroz. **Use of liquid waste in the cultivation of microalgae with potential for biofuel production.** Campina Grande, UEPB, 2013, 61 p. (Monograph for Graduate Environmental and Sanitary Engineering).

### ABSTRACT

The World today lives a double global slump owing to the excessive use of fossil fuel and their harmful effects to the environment. Thereat, is essential and urgent obtain a renewable source, and the microalgae are the option more attractive, because it gives a suitable destination for the waters biofuels. However, microalgae need of proper nutrients for your own development from preparation of a synthetic medium or other medium modified like the use of domestic wastewater. This work studied the cellular behavior of the microalgae *Chlorella* sp mixotrophic crops, through the addition of liquid waste to the culture medium Bold's Basal Medium, aiming the supply for chain productive of biofuel, through the use of microalgae. The first work stage of the work consisted in adding of glycerin to the medium in different proportions (2%, 4% e 10%), was checked that the results weren't satisfactory for the cell's development, invalidating use of the waste in question for cultivate of *Chlorella* sp aiming the obtaining lipids or others in sumes from the in study cell. The second step performed consisted in supplementation of vinasse to the medium in different proportions (10%, 15%, 20% e 25%), this study obtained satisfactory results because the vinasse presents characteristics for the development of the microalgae in study and there was also conditions to obtain the mixotrophic culture with vinasse owing to the presence of your organic load and high production cell. The proportion of vinasse that obtained best growth was with supplementation of 10%, where was checked an excellent adaptation of the cells for the new composition of the culture medium. With the addition of vinasse of the percentages higher 10% to the culture medium, was checked a difficulty in cells growth, due to excess of the suspended material present in the vinasse. Therefore, for the results obtained for the second step, one can say that it is a viable technique because it will give a suitable destination for waste liquid derived from sugar and alcohol industries through cultivation of microalgae with potential for biofuel production, thus generating new source of bioethanol and biodiesel.

**KEYWORDS:** Biofuels; Microalgae; Vinasse; Glycerin.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Representação esquemática de taxa de crescimento de algas em cultura (linha sólida) e a concentração de nutrientes (linha tracejada) em função de um período de tempo .....	34
<b>Figura 2 -</b>	Fitomicrografia da microalga <i>Chlorella</i> sp em ampliação de 400x...	41
<b>Figura 3 -</b>	Aclimatação dos cultivos .....	43
<b>Figura 4 -</b>	Curva de Crescimento da <i>Chlorella</i> sp em cultivo BBM sem adição de resíduos líquidos .....	46
<b>Figura 5 -</b>	Curva de Crescimento da <i>Chlorella</i> sp em cultivo BBM com adição 2% de glicerina .....	48
<b>Figura 6 -</b>	Curva de Crescimento da <i>Chlorella</i> sp em cultivo BBM com adição 4% de glicerina .....	49
<b>Figura 7 -</b>	Curva de Crescimento da <i>Chlorella</i> sp em cultivo BBM com adição 10% de glicerina .....	50
<b>Figura 8 -</b>	Curva de Crescimento da <i>Chlorella</i> sp em cultivo BBM com adição 10% de vinhaça .....	51
<b>Figura 9 -</b>	Curva de crescimento da <i>Chlorella</i> sp com adição de 15% de vinhaça .....	52
<b>Figura 10 -</b>	Curva de crescimento da <i>Chlorella</i> sp com adição de 20% de vinhaça .....	52
<b>Figura 11 -</b>	Curva de crescimento da <i>Chlorella</i> sp com adição de 25% de vinhaça.....	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b> -	Comparação das algas com diferentes culturas na produção de biocombustível .....	23
<b>Tabela 02</b> -	Conteúdo em óleo de algumas microalgas.....	24
<b>Tabela 03</b> -	Produtividade de biomassa e lipídica de diversas espécies de microalgas .....	24

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ATP** - Trifostato de Adenosina;

**BBM** - *Bold's Basal Medium*;

**CCAP**- Centro de Cultura de Algas e Protozoários de Cambridge;

**CCT** – Centro de Ciências e Tecnologia;

**CO<sub>2</sub>** – Dióxido de Carbono;

**CO<sub>3</sub><sup>-</sup>** - Carbonato;

**HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>** – Bicarbonato;

**H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** – Ácido Carbônico;

**HPO<sub>4</sub><sup>3-</sup>**- Ortofosfato;

**K** – Potássio;

**K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>**– Fosfato dipotássico;

**O<sub>2</sub>** – Oxigênio;

**MBM** - Meio Bristol's Modificado;

**Mg** - Magnésio

**N** – Nitrogênio;

**NH<sub>3</sub>** – Amônia;

**NH<sub>4</sub><sup>+</sup>**- Amônio;

**NO<sup>2</sup>** – Nitrito;

**NO<sup>3</sup>**– Nitrato;

**P** – Fósforo;

**PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>** – Íon fosfato;

**ppm** – Partes por milhão;

**S** – Enxofre;

**UEPB** – Universidade Estadual da Paraíba;

**UFF** – Universidade Federal Fluminense;

**UFSC** - Universidade Federal de Santa Catarina;

**USA** – Estados Unidos da América.

## LISTA DE SÍMBOLOS

**%** – Percentagem;

**µm** – micrometro;

**°C** – grau Celsius;

**cel** – célula;

**cm** – centímetro;

**g** – grama;

**h** – hora;

**ha** – hectare;

**kg** – quilograma;

**L** – litro;

**m** – metro;

**mg** – miligrama;

**mL** – mililitro;

**pH** – potencial hidrogeniônico;

**W** – watts.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
2.1 Objetivo geral .....	16
2.2 Objetivos específicos .....	16
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
3.1 Desafio energético mundial .....	17
3.1.1 <i>Biocombustíveis de primeira geração</i> .....	19
3.1.2 <i>Biocombustíveis de segunda geração</i> .....	20
3.1.3 <i>Biocombustíveis de terceira geração</i> .....	21
3.2 Microalgas .....	25
3.2.1 <i>Histórico</i> .....	25
3.2.2 <i>Chlorella sp</i> .....	27
3.2.3 <i>Principais fatores relacionados ao cultivo de microalgas</i> .....	27
3.2.3.1 <i>Luminosidade dos cultivos</i> .....	28
3.2.3.2 <i>Temperatura</i> .....	29
3.2.3.3 <i>Agitação e aeração nos cultivos</i> .....	30
3.2.3.4 <i>Condições de pH</i> .....	30
3.2.4 <i>Meios de cultura e fontes nutricionais</i> .....	31
3.2.4.1 <i>Preparo de meio para cultivo</i> .....	31
3.2.5 <i>Tipos de cultivo</i> .....	32
3.2.6 <i>Crescimento das microalgas</i> .....	33
3.2.7 <i>Sistema de produção de microalgas</i> .....	34
3.2.8 <i>Uso de microalgas no tratamento de águas residuárias</i> .....	36
3.2.8.1 <i>Uso de microalgas no tratamento da vinhaça</i> .....	37
3.2.8.2 <i>Uso de microalgas no tratamento da glicerina</i> .....	39
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>41</b>
4.1 <i>Microalga</i> .....	41
4.2 <i>Preparo de vidrarias</i> .....	41
4.3 <i>Meio de cultura</i> .....	41
4.4 <i>Resíduos líquidos como meio de cultivo</i> .....	42
4.5 <i>Aclimação dos cultivos</i> .....	42
4.6 <i>Estudos do Crescimento Celular da Chlorella sp</i> .....	43
4.6.1 <i>Determinação da densidade celular</i> .....	43
4.6.2 <i>Tempo de cultivo</i> .....	44
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>45</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>55</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O mundo com o uso excessivo dos combustíveis fósseis pelas indústrias e principalmente pelo setor de transporte faz com que se viva uma dupla crise mundial que é a escassez das fontes de combustíveis fósseis e a degradação ambiental.

Desta forma, seja pelos efeitos negativos causados ao meio ambiente ou esgotamento das reservas de combustíveis fósseis, é imprescindível e urgente à procura de fontes energéticas alternativas renováveis, biodegradáveis, de produção limpa e não tóxicas e que sejam de custo competitivo com as atuais fontes de energia existente. Dentro desse prisma, destacam-se os biocombustíveis, como fontes de energia renováveis e biodegradáveis, onde possuem inúmeras vantagens ambientais, como a redução das emissões de poluentes, principalmente os gases de efeito estufa responsáveis pelo superaquecimento global.

Atualmente o país que vem se destacando mundialmente na produção de energia limpa e renovável é o Brasil que possui em sua matriz energética 45% de energia renovável, enquanto no mundo este valor não ultrapassa a 14% (BRASIL, 2010).

É importante ressaltar que, os estados de Alagoas, Pernambuco e Paraíba representam 73% da produção de etanol da região Norte- Nordeste, sendo o estado da Paraíba o segundo maior produtor do Nordeste, que representa 24% do PIB anual da agricultura do Estado. No entanto, existe uma limitação de crescimento no setor dentro do estado da Paraíba em razão da área física não permitir uma extensão em virtude dos seguintes fatores: dificuldade topográfica, clima, períodos prolongados de seca e baixa fertilidade do solo (PAIXÃO e FONSECA, 2011).

O biocombustível que vem se destacando no cenário mundial atualmente é representado em sua maioria pelos derivados de culturas terrestres, tais como: soja, milho, cana-de-açúcar. No entanto, vem a cada dia sendo pressionado pelo mercado de alimentos devido à enorme área de terras agricultáveis necessárias para sua produção, além de contribuir também com a escassez de água potável e para a destruição das florestas no mundo.

No entanto, dentro da realidade e da necessidade que o mundo vive em obter uma fonte de energia renovável, a opção de obter biodiesel por meio das microalgas torna-se a opção mais atrativa na medida em que se aliam algumas situações

problemáticas oriundas das necessidades atuais, como destino adequado para as águas residuais, ocupação de áreas impróprias para cultivo e produção de alimentos.

Além do mais, o biodiesel e bioetanol não é a única fonte de energia renovável derivados das microalgas outras fontes energéticas podem ser obtidas como: o metano ou biogás produzido pela digestão anaeróbica da biomassa, biohidrogênio produzido pela lignina celulósica através da fermentação (BOROWITZAKA, 1999; MALCATA, 2011).

A microalga em estudo, a *Chlorella* sp., tem uma imensa importância econômica, não só na produção para aplicação na alimentação humana. Mas, também na geração de bioenergia, tornando-se uma alternativa como fonte de energia renovável (PHUKAN *et al.*, 2011).

O cultivo autotrófico é o mais utilizado no cultivo de microalgas, principalmente quando a produção é em larga escala. Mas, várias espécies podem tanto ser cultivadas em processos autotróficos, heterotróficos e mixotróficos.

Uma das fontes de carbono mais adequada para produção de biodiesel por meio mixotrófico é o glicerol. O glicerol pode ser obtido como subproduto da reação de transesterificação para obtenção do biodiesel. O acúmulo de lipídios é maior quando utiliza o glicerol que as outras fontes de carbono como a glicose por exemplo.

Em várias unidades sucroalcooleiras, a vinhaça está sendo largamente utilizada como fertilizante. No entanto, esse uso, não deve ser indiscriminado, pois pode impactar o meio ambiente, causando efeitos como a salinização do solo e a poluição de aquíferos (PRADO, 2007).

Assim sendo, com o intuito de avaliar a potencialidade da produção de biocombustível através das microalgas, este trabalho estudou a otimização do cultivo da microalga *Chlorella* sp. juntamente com o uso de águas residuárias, dando assim um uso adequado dos rejeitos e evitando assim possíveis processos de contaminação do solo e dos corpos d'água, bem como fornecer uma nova fonte de geração de biocombustíveis líquidos incrementando a geração de energia nas indústrias de biocombustíveis de primeira geração e segunda geração, em especial na região Nordeste que já possui sua matriz industrial consolidada na produção de etanol, com a forte opção de tornar as indústrias sucroalcooleira uma unidade de biorrefinaria devido ao processamento de várias biomassas na geração de energia com possibilidades de

alcançar as metas de produção e consumo de biocombustíveis, em função das limitações das fontes atualmente empregadas para geração de etanol de primeira geração.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Minimizar os impactos ambientais através do uso dos resíduos líquidos, como a glicerina e vinhaça, no cultivo da microalga *Chlorella* sp em fotobioreatores visando a viabilidade da produção de biocombustíveis.

### 2.2 Objetivos específicos

- Adaptar e cultivar a cepa *Chlorella* sp em meio de cultura tradicional, avaliando o seu desenvolvimento através da curva de crescimento;
- Selecionar e adaptar as cepas de *Chlorella* sp ao cultivo mixotrófico através do uso da glicerina, em meio de cultura tradicional e em diferentes proporções, para identificar as condições de maior desenvolvimento celular através das curvas de crescimento celular;
- Avaliar o crescimento através da elaboração de curvas de crescimento da microalga *Chlorella* sp em meio cultura suplementado com o resíduos da indústria sucroalcooleira (vinhaça);
- Identificar quais os resíduos líquidos em estudo podem ter viabilidade para a produção de biodiesel e bioetanol.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Desafio energético mundial

Os combustíveis fósseis são constituídos pelo carvão, petróleo e o gás natural que foram originados devido à decomposição de milhões de centenas de anos da biomassa morta soterrada. Esses combustíveis aumentaram sua real exploração com a revolução industrial. Assim, neste período os combustíveis fósseis tiveram um papel fundamental no desenvolvimento e no crescimento econômico uma vez que as exigências e as necessidades humanas em termos de satisfação básica e de fornecimento de bens de serviço dependiam fortemente dos combustíveis fósseis. Inicialmente a fonte mais explorada era o carvão e em seguida o uso da madeira foi aos poucos substituindo e tornando o combustível mais comumente utilizado.

No entanto, com o advento do motor de combustão interna iniciou-se um enorme crescimento na utilização de combustíveis líquidos derivados do petróleo que se tornou a maior fonte de energia utilizada até hoje. A melhoria das condições de vida permitiu um grande avanço da civilização isso ocorreu em cima de um crescimento exponencial de consumo energético. No ano de 2000 a população consumiu cinco vezes mais combustíveis que em 1950 e 13 vezes mais que 1900 (TAVARES, 2009).

Assim, todo o crescimento econômico ocorrido nos últimos dois séculos foi devido principalmente à exploração do petróleo como combustível. No entanto, o nível de vida da humanidade consistiu sem dúvida um crescimento sem planejamento e de forma insustentável, onde se questionou se este mundo moderno desenvolvido pode manter esse consumo e se as consequências ambientais desastrosas terão soluções. Assim, hoje o mundo enfrenta um duplo problema: a crise energética e a degradação ambiental provocada pelos produtos oriundos da combustão dos combustíveis fósseis.

Dentre os problemas ambientais trazidos pelo o uso intensivo dos combustíveis fósseis merecem destaque o aquecimento global e alterações climáticas, a poluição (do ar, da água e da terra) e os efeitos adversos para a saúde humana. Mas, os principais danos ambientais são causados pelo uso final dos combustíveis nos processos de aquecimento, na produção de eletricidade e na geração de força motriz das instalações industriais e dos transportes (VEZIROGLU e SAHIN, 2008).

O uso intensivo dos combustíveis fósseis leva à emissão de diversos gases ( $\text{CO}_x$ ,  $\text{SO}_x$ ,  $\text{NO}_x$ , CH) e compostos poluentes (fuligem, cinzas, alcatrão e outros compostos orgânicos) que causam efeito catastrófico a saúde humana, nos animais, nas florestas

entre outros.

A concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> vem aumentando a um ritmo acelerado após a revolução industrial. As atividades humanas estão produzindo mais carbono que o próprio ecossistema pode absorver. Dessa forma, a concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> passou de 280ppm na era pré- industrial para o valor de 380ppm que ocorre atualmente (AGARWAL, 2007; HANSEN *et al.*, 2010).

O CO<sub>2</sub> emitido durante a queima dos combustíveis fósseis é o principal responsável pelo efeito estufa que contribui para absorção e aprisionamento dos raios infravermelhos na atmosfera levando ao aumento da temperatura da terra, e assim acabam provocando o degelo das calotas polares, o aumento do nível dos oceanos e as alterações climáticas que causam as inundações, longas secas, furacões entre outros desastres ambientais.

Assim, a eminente escassez das reservas dos combustíveis fósseis e os problemas ambientais causados por estas fontes de energia que impedem de preservar o meio ambiente para o desenvolvimento das gerações futuras, força urgentemente o desenvolvimento e o uso de fontes de alternativas de energias renováveis, dentro desse prisma tem-se a energia solar, eólica, hidroelétrica, geotérmica, hidrogênio e biocombustíveis, para manter o desenvolvimento global.

Dessa forma, deve-se priorizar o desenvolvimento das energias renováveis para que se tenham condições de substituir as energias fósseis oriundas de fontes fósseis nos quatro principais setores como: produção da eletricidade, aquecimento, transportes e abastecimento energético nas zonas rurais, contudo, a substituição total não acontecerá enquanto houver energia fóssil a preços relativamente acessíveis, isso impede que ocorram maiores investimentos nas fontes de energias renováveis. No entanto, apesar de todas as dificuldades, o mundo vem aumentando a capacidade de consumo de energias renováveis, que apresenta um aumento por ano de 15-30% ao ano desde 2000. Entre esses aumentos destacam-se o crescimento na produção de energia fotovoltaica (60%), eólica (28%) e dos biocombustíveis (40%) (TAVARES, 2009).

De todas as alternativas renováveis, o hidrogênio e os biocombustíveis são as que apresentam maiores potenciais de substituir os combustíveis fósseis e atender aos desafios do desenvolvimento moderno, buscando a segurança energética com a mitigação e redução dos gases nocivos ao meio ambiente com a promoção do desenvolvimento de forma sustentável, garantindo assim o bem estar das futuras gerações (GIELEN e UNANDER, 2005; HUBER *et al.*, 2006).

O hidrogênio produzido de fontes renováveis para fins energéticos é considerado uma tecnologia limpa por não produzir gases com efeitos adversos ao meio ambiente e o mesmo possui uma eficiência energética extremamente alta. No entanto, existem alguns empecilhos ao desenvolvimento da produção de hidrogênio como combustível, que consiste na infraestrutura complexa necessária para geração de hidrogênio, além da dúvida sobre armazenagem e os elevados custos de produção. Desta forma, para atender a demanda crescente por combustíveis assegurando o crescimento e garantindo a viabilidade econômica e ambiental diante desta crise de combustíveis fósseis a solução são os biocombustíveis.

Os biocombustíveis são combustíveis que são produzidos a partir de fontes naturais, a biomassa. A biomassa que pode ser convertida por meio de processos mecânicos, termoquímicos e biológicos dando origem a vários tipos de biocombustíveis como, por exemplo, etanol, metanol, biodiesel, metano e hidrogênio.

Dentro deste prisma, a biomassa torna-se a mais promissora das fontes renováveis de energia na medida em que está disponível naturalmente, podendo ser produzida em grandes quantidades e atender em todos os setores que possuem demanda energética. Ressaltando ainda que, que a biomassa é um recurso inteiramente renovável e que permite o desenvolvimento de novas oportunidades como à diversificação das fontes de abastecimento de combustível e a redução da dependência dos combustíveis fósseis (TAVARES, 2009).

Para atender a demanda energética principalmente dos meios de transportes têm-se os biocombustíveis bioetanol e o biodiesel que substituem respectivamente a gasolina e o diesel. Estes são considerados biocombustíveis de primeira geração. São produzidos a partir de culturas terrestres que competem com a produção de alimentos.

### **3.1.1 Biocombustíveis de primeira geração**

Os biocombustíveis de primeira geração dominam atualmente o mercado dos biocombustíveis com uma produção anual de 50.000 milhões de litro (NAIK et. al., 2010). Estes são principalmente derivados de culturas alimentares ricas em sacarose (beterraba e cana-de-açúcar), amido (batata, milho e trigo) e/ou óleos vegetais (girassol, soja e colza), utiliza-se de tecnologias simples que já são dominadas e implementadas nas indústrias por meio dos processos de hidrólise/fermentação e prensagem/transesterificação (PAULO, 2011).

A produção de biocombustível de primeira geração é marcada por fortes preocupações. A preocupação mais comum é que à medida que aumenta a demanda juntamente com a capacidade de produção, aumenta a competição com a agricultura por terras aráveis para a plantação de culturas para fins alimentares. Esta pressão pode ter consequências ao nível do preço dos bens alimentares e comprometer a biodiversidade e, numa situação mais extrema, pode ocorrer até a escassez de alimentos (NAIK, et al., 2010).

Assim, para se tornarem uma alternativa viável, os biocombustíveis devem garantir ganho energético, benefícios ambientais (sequestro de CO<sub>2</sub> e redução de emissões), competitividade econômica com potencialidade para produção em grandes quantidades, mas sem comprometer a produção de bens alimentares (HILL et al., 2009).

### **3.1.2 Biocombustíveis de segunda geração**

A segunda geração de biocombustíveis difere da primeira, na medida em que propõe outras fontes de matéria-prima, que consiste de um tipo de biomassa que não compete com a produção de alimentos, são basicamente resíduos lignocelulósicos dos tipos vegetal que correspondem a mais de 50% da biomassa produzida mundialmente, sendo por isso uma alternativa de baixo custo que, não concorrendo com a produção de alimentos, com potencial para produção de biocombustíveis, com menor emissão de gases de efeito estufa (ESCOBAR, et al., 2009).

A bioconversão de biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis para produção de bioetanol de segunda geração ou etanol lignocelulósico tem sido considerado como uma alternativa promissora para incrementar a produção de etanol necessária para atender à demanda mundial. O processo emprega matéria-prima natural que pode ser encontrada no bagaço da cana-de-açúcar, madeiras, serragens, palhas, cascas que são geralmente desperdiçadas ou utilizadas de maneira pouco nobre (BUCKERIDGE, SANTOS, SOUZA, 2010). No entanto, o aproveitamento destes rejeitos pode elevar consideravelmente a produção de bioetanol, sem aumentar a área plantada e sem comprometer a produção de alimentos.

No processo de obtenção de etanol lignocelulósico, o objetivo é desconstruir a parede celular para usar os polissacarídeos como fonte de açúcares fermentáveis. A biomassa lignocelulósica apresenta na sua constituição celulose (40-50%), hemicelulose (25-35%) e lignina (15-20%). Assim, a estrutura da parede celular da biomassa é

bastante complexa e durante a desconstrução, é necessário preservar intactos os monossacarídeos que serão usados para fermentação (BUCKERIDGE, SANTOS, SOUZA, 2010). Isso torna o processo de bioconversão delicado, necessitando que o processo seja dividido em basicamente três etapas: 1- pré-tratamento, que irá desagrupar o complexo carboidrato-lignina rompendo a estrutura celulósica que é altamente ordenada; 2- hidrólise: que consiste na quebra das moléculas de cadeias longas em açúcares fermentáveis por meio de enzimas ou ácidos; 3- a fermentação que irá converter os açúcares em etanol.

Apesar de todos esses processos funcionais sejam necessários, são difíceis de padronização e de baixa eficiência em especial a etapa de pré-tratamento, isto promovem ainda elevados custos, o que faz com que a produção de bioetanol de segunda geração ainda não esteja implementada em escala industrial (HARUN *et al.*, 2010).

### **3.1.3 Biocombustíveis de terceira geração**

Na tentativa de buscar alternativas para obter energia mais “limpa” a custos competitivos, um forte entusiasmo tem surgido em torno do potencial oferecido pelas algas como fonte de energia.

As microalgas surgem atualmente, como à única matéria-prima sustentável capaz de assegurar a produção de biocombustíveis de acordo Chisti (2007). A produção de biocombustíveis a partir de microalgas terá um menor impacto ambiental, não competindo por espaço com as culturas alimentares ao contrário dos biocombustíveis produzidos a partir de outras matérias primas (MIRANDA, 2011).

Microalgas podem oferecer vários tipos de biocombustíveis renováveis. Estes incluem o metano ou biogás produzido pela digestão anaeróbica da biomassa, o biodiesel derivado de óleo de microalgas, biohidrogênio produzido pela lignina celulósica por meio da fermentação, bioetanol e biobutanol obtido do açúcar da biomassa por meio de fermentação (BOROWITZKA, 1999; MALCATA, 2011). A ideia da utilização de microalgas como fonte de combustível não é nova, mas agora está sendo levada a sério por causa do aumento do preço do petróleo e, mais significativamente, a preocupação emergente sobre o aquecimento global que está associado com a queima de combustíveis fósseis. Pesquisas recentes têm demonstrado que a biomassa de microalgas parece ser a fonte promissora de

biodiesel renovável que é capaz de satisfazer a demanda global por combustíveis para uso em transportes. As microalgas como fonte de produção de biodiesel têm a vantagem de não comprometer a produção de alimentos, forragens e outros produtos derivados de culturas.

A biotecnologia das microalgas tem se desenvolvido devido às diferentes aplicações comerciais, por ser organismos fotossintéticos que produzem a clorofila pode ser usada para fins alimentícios e cosméticos. Elas também são utilizadas pelas indústrias farmacêuticas, pois, algumas espécies de microalgas produzem os compostos bioativos como os antioxidantes, antibióticos e toxinas. Por outro lado, as microalgas são produzidas para uso como nutrientes suplementar para consumo humano, devido sua biomassa conter teores elevados de proteínas, vitaminas e polissacarídeos. Algumas espécies de microalgas contêm níveis elevados de lipídios que podem ser extraídos para produção de biodiesel. Assim, em cerca de 30 anos, a indústria da biotecnologia de microalgas vem se intensificando significativamente (HARUN et al., 2010; LOURENÇO, 2006; SHELEF; SOEDER, 1980).

O cultivo de microalgas apresenta uma característica importante em relação às outras espécies vegetais que é a de possuírem elevadas taxas de crescimento e em meios de culturas relativamente simples, duplicando sua biomassa em 24 horas (CHISTI, 2007a; SOUZA, 2008). Um componente fundamental para o seu crescimento consiste em um eficiente sistema de fotossíntese, o que requer iluminação, fator vantajoso no Brasil principalmente na região Nordeste que apresenta alta insolação durante a maior parte do ano.

As vantagens do cultivo de microalgas em relação às plantas superiores como fonte de produção de biocombustíveis são numerosas, tais como:

1. As microalgas podem sintetizar e acumular grandes quantidades de lipídios neutros e óleo [20-50% de peso seco e crescer a taxas elevadas (por exemplo 1-3 duplicações / dia).
2. A produção de óleo por área de culturas de microalgas pode exceder consideravelmente o rendimento das melhores oleaginosas.
3. As microalgas podem ser cultivadas em água salgada / salobra / salgada costeiras em terras não aráveis, e não competir por recursos com a agricultura convencional.
4. Microalgas toleraram terras marginais (por exemplo, árido deserto, e terras semiáridas) que não são apropriadas para a agricultura convencional.

5. Microalgas podem utilizar nitrogênio e fósforo a partir de uma variedade de fontes de águas residuais (por exemplo, escoamento agrícola, operações concentradas de alimentação animais e efluentes industriais e municipais), oferecendo o benefício adicional de biorremediação de águas residuárias.
6. As microalgas promovem o sequestro de CO<sub>2</sub>, gases emitidos por usinas termoelétricas por meio do uso de combustível fóssil e outras fontes, reduzindo assim as emissões de gases de efeito estufa maior. 1 kg de biomassa de algas exige cerca de 1,8 kg de CO<sub>2</sub> (RODOLFI, 2009).
7. Microalgas produzem diversas substâncias de alto valor agregados, por exemplo, biopolímeros, proteínas, polissacarídeos, pigmentos de alimentos para animais e fertilizantes e seu cultivo não precisa de herbicidas e pesticidas.
8. As microalgas crescem em recipientes apropriados (fotobioreatores) durante todo o ano, com maior produtividade de biomassa anual com base na área.
9. As microalgas requerem muito menos água que as plantas terrestres, pois, para produzir 1L de óleo as microalgas requerem apenas 1,5L contra 10.000L das plantas, (MALCATA, 2011).

A comparação de algumas fontes de óleo vegetal é indicada na Tabela01 que apresenta, as microalgas como sendo a única fonte de biodiesel, que tem potencial para substituir completamente o combustível fóssil.

**Tabela 01** - Comparação das algas com diferentes culturas na produção de biocombustível

<b>Tipos</b>	<b>Galões de óleo por hectare por ano</b>
<b>Algas</b>	5000 – 20.000
<b>Palma</b>	635
<b>Coco</b>	287
<b>Canola</b>	127
<b>Amedoim</b>	113
<b>Milho</b>	39

Fonte: Khan *et al.* (2009)

Rodolfi *et al.* (2009), verificou que o teor de óleo em microalgas pode exceder 80% do peso da biomassa seca e que os níveis de óleo de 20-50% são bastante comuns (Tabela 02).

**Tabela 02-** Conteúdo em óleo de algumas microalgas

Microalga	Conteúdo de óleo(% peso seco)
<i>Chlorella sp.</i>	28–32
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20–30
<i>Schizochytrium sp.</i>	50–77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15–23

Fonte: Rodolfi *et al.* (2009)

A produção de biocombustíveis a partir de microalgas baseia-se primeiramente na produção de biomassa com elevadas produtividades. No caso do uso para a produção de biodiesel, necessita-se ainda que a biomassa apresente elevados percentuais de lipídios.

As dificuldades relacionadas a uma eficiente produção de biodiesel a partir de microalgas consistem em encontrar uma cepa com capacidade de produzir altos teores de lipídios e uma taxa de crescimento elevada em um sistema de cultivo de baixo custo (como por exemplo, fotobioreator) que seja o mais apropriado para a cepa utilizada. Além disso, um método de extração do óleo economicamente viável deve ser desenvolvido (ALGACULTURE, 2008).

Analisando a Tabela 03 verifica-se que as microalgas que apresentam maior produtividade lipídica juntamente com a maior produtividade de biomassa (crescimento) é a *Chlorella sp.*, *Chlorella vulgaris* e *Chlorella sorokiniana*. Sendo assim, estas espécies podem ser bastante promissoras para produção de biocombustível.

**Tabela 03 -** Produtividade de biomassa e lipídica de diversas espécies de microalgas

Espécies de microalgas	Produtividade de Biomassa(g.L <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	Conteúdo lipídico (%biomassa)	Produtividade lipídica (mg.L <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )
<i>Skeletonoma sp.</i>	0,09	31,8	27,3
<i>Chlorella sp.</i>	0,23	18,7	42,1
<i>Chlorella sorokiniana</i>	0,23	19,3	44,7
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,17	19,2	32,6
<i>Chlorococum sp</i>	0,28	19,3	53,7

Fonte: Rodolfi *et al.* (2009)

Determinadas espécies de microalgas tem habilidade de produzir altos níveis de carboidratos às vezes superiores à produção de lipídios. Essas espécies são ideais para produção de bioetanol por meio da extração dos carboidratos que são fermentados produzindo o etanol, estudos mostram que podem atingir uma produção entre 46.760-

140.290 L/ha somente a partir das microalgas (VAN HANH *et al.*, 2012).

Harun *et al.*, (2010) verificaram que as microalgas secas após a extração de lipídios tem uma produção de etanol de 60% versus aqueles que permanecem intactos como células secas, isto indica que as microalgas podem ser utilizadas tanto para produção de bioetanol como biodiesel podendo assim viabilizar economicamente a produção de biocombustíveis líquidos a partir das microalgas (VAN HANH *et al.*, 2012).

Bioetanol das algas tem um potencial significativo de ser produzido devido a baixa ou nula concentração de lignina e hemicelulose que estão sempre presentes nas plantas superiores. Sabe-se que os açúcares presentes nas algas são mais fáceis de serem fermentados. No entanto, a utilização dos açúcares das algas para produção bioetanol será viável economicamente se os custos de separação da biomassa forem baixos, bem como o pré-tratamento deve ser acessível e eficiente durante a hidrólise dos monômeros dos açúcares constituintes nas algas (VAN HANH *et al.*, 2012).

## **3.2 Microalgas**

As microalgas representam os microrganismos fotossintéticos procarióticos (cianobactérias) antigamente chamadas de algas azul-esverdeadas, e eucarióticos (algas verdadeiras). São geralmente unicelulares, gram-negativos, coloridos devido à presença dos pigmentos fotossintéticos, e vivem, em sua maioria, em ambientes aquáticos (OLAIZOLA, 2003; TOMASELLI, 1997). Sua importância na natureza refere-se principalmente à elevada participação no balanço global da fotossíntese, contribuindo com grande parcela da produção primária do planeta. No mar, cerca de 90% da fotossíntese é realizada pelas diversas microalgas que constituem o fitoplâncton (LOURENÇO, 2006). Surgiram a mais de 3 milhões de anos e formaram a atual atmosfera, e desde então regulam a biosfera do planeta retirando CO<sub>2</sub> e produzindo O<sub>2</sub> (ROMANO *et al.*, 2000)

### **3.2.1 Histórico**

A cultura com algas teve início em 1919, com a introdução de *Chlorella* sp verificando-se que certas algas podiam duplicar-se com muita velocidade e que sua matéria seca podia conter 50% de proteína crua (BORZANI *et al.*, 2001). Os

primeiros testes de produção em grande escala foram realizados na Alemanha em 1942, mas o grande interesse no assunto instalou-se apenas nos anos 50 e progrediu rapidamente. Durante a segunda guerra mundial a *Chlorella* sp também foi investigada por pesquisadores alemães devido ao potencial em duplicar sua biomassa algumas vezes por dia em laboratório com iluminação adequada, sendo que a mesma proporcionaria uma estocagem de fontes de alimentos, principalmente de proteínas (BORGHETTI; BORGHETTI J.R; ROSA FILHO,2004).

O cultivo de microalgas com produção em larga escala foi iniciada em 1960 no Japão por Nikon Chlorella com a cultura de *Chlorella* sp. Em 1970 a *Arthrospira platensis* foi cultivada em larga escala no Lake Texcoco, México e em 1977 na Tailândia. Por volta de 1980, 46 indústrias produziam cerca de uma tonelada de *Chlorella* por mês na Ásia. As microalgas têm um interesse comercial muito grande em razão dos seus bioprodutos com potencial nutricional de alto valor comercial, como por exemplo, a astaxantina pigmento produzido por determinadas espécies de microalgas utilizadas como antioxidante e como corantes de alimentos que custa em torno de US\$3milhões por tonelada (WILLAMS; LAURENS, 2010)

Nos últimos 30 anos a biotecnologia microalgal tem se desenvolvido e diversificado significativamente, por ser organismos fotossintéticos que produzem a clorofila, ela pode ser usada para fins alimentícios e cosméticos. São utilizadas pelas indústrias farmacêuticas, pois, algumas espécies de microalgas produzem os compostos bioativos como os antioxidantes, antibióticos e toxinas. Por outro lado, as microalgas são produzidas para uso como nutrientes suplementar para consumo humano, devido sua biomassa conter teores elevados de proteínas, vitaminas e polissacarídeos. Algumas espécies de microalgas contêm níveis elevados de lipídios que podem ser extraídos para produção de biodiesel.

No Brasil, pesquisas com microalgas são relativamente recentes e têm enfocado, principalmente, o aspecto de crescimento sob diversas condições, como meios decultivo, e outros parâmetros como nutrientes, temperatura, salinidade e luz (COSTA, *et al.*, 2001; SIPAÚBA *et al.*, 1999; OLIVEIRA, 1995; DERNER, 1995).

O valor nutricional das microalgas depende, principalmente, da sua composição bioquímica. Embora exista uma grande diferença nas composições das microalgas em função da classe e a espécie que se está trabalhando, as proteínas representam o maior constituinte orgânico, seguido usualmente de carboidratos e então pelos lipídios (COUTTEAU, 1996). Quando cultivadas em meios adequados,

certas espécies de microalgas podem duplicar a sua biomassa diariamente, produzindo matéria seca com teor protéico superior a 50% e alcançando produtividades de 30-50 g.m<sup>-2</sup>.d<sup>-1</sup> em peso seco (GOLDMAN, 1980). A manipulação das condições ambientais e os diferentes estágios de crescimento podem alterar a composição bioquímica das microalgas (BROWN *et al.*, 1989)

### **3.2.2 *Chlorella* sp**

A *Chlorella* é uma microalga unicelular microscópica, eucariótica, esférica e com diâmetro variando entre 5-10 µm, encontrada em tanques e lagos, com alta capacidade de realizar fotossíntese (COSTA *et al.*, 2006). Para Morais (2006), a *Chlorella* sp. pertence a divisão Chlorophyta e ordem Chlorococcales.

A microalga *Chlorella* possui 53% de proteínas, 23% de carboidratos, 9% de lipídios e 5% de minerais (HENRIKSON, 1994). Ela contém ainda mais de 2% de clorofila, o que lhe permite rápido crescimento, pois assim como as plantas superiores, seu metabolismo principal é a fotossíntese, onde a fonte principal de energia é a luz solar (VONSHAK, 1997). *Chlorella* também é rica em vitaminas do complexo B, principalmente a B12, vital na formação e regeneração das células sanguíneas que juntamente com o ferro fazem desta microalga um produto indicado no tratamento e prevenção de anemia.

A *Chlorella* sp. é uma rica fonte de nutrientes concentrados que são melhores aproveitados pelo organismo quando suas células, que são protegidas por uma parede celular, são desintegradas durante o processo de secagem, possibilitando que seus nutrientes sejam amplamente absorvidos pelo metabolismo (HENRIKSON, 1994 apudMORAIS, 2006). Os valores nutricionais da *Chlorella* sp. podem apresentar variações dependendo do modo de cultivo, quantidade de energia solar, estação climática e outros fatores.

### **3.2.3 Principais fatores relacionados ao cultivo de microalgas**

A composição bioquímica da biomassa das microalgas não é determinada somente pela função da natureza de cada espécie algal. Ela depende de determinados fatores, como a intensidade de luz, temperatura, pH, nutrientes e

agitação (MIAO; WU, 2004).

Pesquisas relacionadas à interação entre intensidade luminosa, temperatura, agitação e concentração de nutrientes podem contribuir para a otimização do cultivo de microalgas, pois o crescimento desse micro-organismo deriva de diversas reações bioquímicas e biológicas. Quando se trata de meio de cultura sintético, o alto custo dos nutrientes pode ser um fator limitante para a produção. Entretanto, no caso de cultivos em meios de cultura alternativos, os fatores limitantes para a produção de biomassa restringem-se à luz, temperatura e agitação da cultura (DUARTE, 2001).

A fotossíntese realizada pelas microalgas consiste no fato dela ser afetada pela limitação de nutrientes (KOLBER; ZENH; FALKOWSKI, 1988; GREENE; GEIDER; FALKOWSKI, 1991). Assim, é possível afirmar que a velocidade de crescimento e a produtividade estão diretamente relacionadas às exigências nutricionais, ao pH, à agitação, à temperatura e à luz (intensidade e duração da irradiação luminosa) (JOHN; FLYNN, 2000; CARLOZZI; SACCHI, 2001; BABEL; KAYOMBO *et al.*, 2002; TUKAJ *et al.*, 2003).

### 3.2.3.1 Luminosidade dos cultivos

A luz é fundamental para o crescimento microalgal, em especial as microalgas fotoautotróficas. A quantidade de energia luminosa recebida pelas células irá repercutir na quantidade de carbono fixado, atuando assim como a principal fonte de energia no processo de produção de biomassa e na taxa de crescimento das culturas microalgais (LACAZ-RUIZ, 1996; DERNER, 2006). A luminosidade induz a atividade enzimática, influenciando a síntese de proteína (RUYTERS, 1984; UMINO, 1991).

A quantidade de oxigênio no meio está diretamente relacionada à atividade fotossintética (LEE; LOW, 1993). Pesquisadores demonstraram que a atividade fotossintética da *Chlorella* spé tão eficiente quanto às das plantas.

Determinados organismos mantidos em temperaturas fisiológicas podem ser protegidos por alguns pigmentos, como os carotenóides. No entanto, mesmo contendo carotenóides, algumas células, quando submetidas a foto-oxidação e à baixas temperaturas, não sobrevivem. Indicando que algumas enzimas reguladoras

estão envolvidas nesse mecanismo de proteção das células (ABELIOVICH; SCHILO, 1972).

Apesar disto, observa-se que, sob alta intensidade de luz, ocorre uma proteção da clorofila *a* em relação à foto-oxidação, por meio dos carotenóides. Entretanto, quando a intensidade da luz é menor, eles passam a agir como pigmentos acessórios, ou seja, captam a energia luminosa e a transferem para moléculas de clorofila (OLAIZOLA, 2003; DUERR, 1990).

Células que não possuem carotenóides apresentaram sensibilidade à foto-oxidação, assim os níveis de pigmentos intracelulares estão envolvidos na absorção da irradiação de luz (ABELIOVICH; SHILO, 1972; FOX, 1983).

Kotzabasis *et al.* (1999) cultivaram *Chlorella* sp. usando câmara de iluminação contínua com 13000 lux fertilizada com 0,25 g.L<sup>-1</sup> de meio e diferentes concentrações de metanol (de 0,05 a 5%) como fonte de carbono para otimizar o cultivo desta microalga. A função do metanol como fonte alternativa de carbono para o cultivo de microalgas causou impacto positivo na qualidade de produção de biomassa e no meio ambiente.

Muitos sistemas de cultivo de microalgas são planejados para utilizar a luz natural. A principal vantagem deste método é o decréscimo no custo de produção, no entanto, inconvenientes como a variação do fotoperíodo, da intensidade luminosa e, também, variações ambientais fazem com que os cultivos que utilizam luz natural não sejam estáveis (POLI *et al.*, 2004).

### 3.2.3.2 Temperatura

A temperatura afeta a composição, as taxas metabólicas e o crescimento celular das microalgas. No entanto, a resposta à temperatura de crescimento varia de espécie para espécie, sem nenhuma relação generalizada para todas as espécies (RAVEN, 1990).

Quando as células de *Chlorella* sp são cultivadas em temperatura entre 25 e 35°C, o teor de proteína diminui e o de carboidratos aumenta (OGBONNA; TANAKA, 1996).

### 3.2.3.3 Agitação e aeração nos cultivos

O processo de agitação do meio de cultivo microalgal é um parâmetro essencial, pois permite a homogeneização das células, melhora a transferência dos gases, impede a estratificação térmica, auxilia na distribuição homogênea dos nutrientes. A agitação da cultura, em meio líquido, mantém as células em suspensão, evitando que algumas células fiquem depositadas no fundo, enquanto outras que permanecem na superfície recebam luz em excesso (BECKER; VENKATARMAN, 1981). Além disso, a agitação evita a foto-oxidação por meio da eliminação do oxigênio supersaturado no meio (RICHMOND *et al.*, 1990).

A aeração é um processo mecânico, por meio do qual se aumenta o nível de oxigênio dissolvido em um meio de cultivo. Fast e Boyd (1992) afirmam que aeração mecânica se faz necessárias, principalmente, nas seguintes condições: durante a noite, devido à alta taxa de respiração das microalgas; quando as microalgas estão com alguma limitação de desenvolvimento (enfermas ou velhas), o que origina uma menor produção de oxigênio e um alto risco de morte repentina de toda a biomassa; durante a falta ou carência de luz, pois com pouca radiação (solar ou artificial), diminui substancialmente a produção de oxigênio que pode inibir o processo de fotossíntese.

Assim, a agitação da cultura torna-se muito importante, pois pode otimizar todos os fatores essenciais relacionados à produção de biomassa de microalgas (SOARES, 2010; PEQUENO, 2010).

### 3.2.3.4 Condições de pH

O controle do pH é essencial para que os componentes do meio de cultura possam ser efetivamente absorvidos, afetando diretamente a disponibilidade de vários elementos químicos. O pH é fundamentalmente influenciado pelas proporções entre as formas de carbono dissolvidas no meio de cultivo, interferindo na disponibilidade de CO<sub>2</sub> que afeta diretamente no crescimento das microalgas (LOURENÇO, 2006). A variação de pH no cultivo de microalgas ocorre devido ao consumo de substratos, solubilização e consumo do dióxido de carbono, e à degradação de metabólicos produzidos (GRIMA *et al.*, 1999)

O melhor pH para o cultivo de diversas algas varia de neutro a alcalino. Para

microalgas verdes o pH ótimo está na faixa de 4,0 a 8,5. Já valores de pH iguais ou superiores a 9,5 induzem a precipitação das células de *Chlorella vulgaris* no cultivo, por meio da agregação celular, reduzindo a produção de biomassa e aumentando o diâmetro celular (MALIS-ARAD *et al.*, 1980).

### **3.2.4 Meios de cultura e fontes nutricionais**

O investimento em reagentes químicos para elaboração do meio de cultura é um dos maiores problemas no cultivo de microalgas (SIPAÚBA-TAVARES, 1995). Segundo Cozza (1999), o custo estimado do substrato para o cultivo de microorganismos, costuma representar de 40 a 60% do custo total. Dentre os meios de culturas alternativos utilizados para a produção de biomassa de *Chlorella sp.*, destacam-se: esgoto doméstico (PIPES; GOTAAS, 1960), efluentes de biodigestores (RODULFO; MARMOL; EMRALINO, 1980), lodo digerido (WONG; LAY, 1980), despejos industriais purificados (JUSSIAC; DUSZOTA; MYCIELSKI, 1984), vinhaça de cana-de-açúcar (OLIVEIRA, 1988), águas residuais da produção de azeite de oliva (SÁNCHEZ *et al.*, 2001) e resíduos da suinocultura (RODRIGUES, 2000; TRAVIESO *et al.*, 2006).

No cultivo de *Chlorella sp.*, para cada 100 partes de peso de carbono, em geral são necessários: N-15%; P-5%; Mg-2,5%; K-1,8%; S-1,6%. O carbono inorgânico é fundamental para o processo de fotossíntese, sendo a fonte relacionada ao pH, ou seja, em pH abaixo de 5,0 apenas o CO<sub>2</sub> é consumido pela microalga, entre 7 e 9 o bicarbonato passa a ser importante e, acima de 9,5 o destaque passa a ser para o carbonato. O dióxido de carbono é a fonte de carbono normalmente utilizada, porém, acima de 10% ocorre uma inibição do crescimento algal.

#### **3.2.4.1 Preparo de meio para cultivo**

As condições de cultivo influenciam na composição das algas, sendo importante seu estudo a fim de que sejam obtidos os produtos para os quais o cultivo tem finalidade em quantidades máximas. O crescimento de *Chlorella sp.* é estimulado em meio suplementado e para o preparo e manutenção do inoculo, é mais recomendado a

utilização do meio MBM - Meio Bristol's Modificado (WATANABE, 1960), um meio padrão para o cultivo desta Chlorophyta.

### 3.2.5 Tipos de cultivo

Conforme a fonte de carbono empregada, os cultivos de microalgas podem ser classificados em três tipos:

- a) Heterotrófico: o fornecimento de carbono é realizado pela introdução de compostos orgânicos apropriados ao meio de cultura (glicose, glicerol, entre outros);
- b) Mixotrófico: o carbono é disponibilizado tanto por meio de compostos orgânicos quanto pelo CO<sub>2</sub> atmosférico (CO<sub>2</sub> inorgânico);
- c) Autotrófico: a única fonte de carbono disponibilizada é o CO<sub>2</sub> inorgânico. Neste caso, o carbono inorgânico pode estar na forma de CO<sub>2</sub>, ácido carbônico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ou carbonato (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>). A maioria das espécies das microalgas são fotoautotrófica, ou seja, por meio da fotossíntese obtém-se energia da luz para fixar o carbono a partir do CO<sub>2</sub>.

O cultivo autotrófico é o mais utilizado no cultivo de microalgas, principalmente quando a produção é em larga escala. Mas, várias espécies podem tanto ser cultivadas em processos autotróficos como em heterotróficos. As microalgas podem assimilar diversos compostos orgânicos no cultivo heterotrófico (como: glicose, glicerol, acetato, frutose, lactose e outros), evitando a forte dependência da luz e aumentando a produtividade da biomassa. A *Chlorella protothecoides* obteve um aumento de 40% no conteúdo de lipídio quando passou do cultivo autotrófico para o heterotrófico. Assim, o cultivo heterotrófico promove um rápido crescimento e um maior acúmulo de lipídios também pode ser obtido. Este processo heterotrófico pode ser efetuado em águas residuárias que contém as fontes de carbono orgânico reduzindo os custos com nutrientes para produção em grande escala (MALCATA, 2011). De acordo com Huang *et al.* (2010), o cultivo heterotrófico apresenta várias vantagens frente ao cultivo autotrófico, que pode ser a independência da luz, melhor controle do cultivo, diminuição do custo na separação devido ao aumento da densidade celular.

O processo heterotrófico promove um alto grau de crescimento, isso favorece

uma redução nos custos para realizar a separação da biomassa em razão do aumento da densidade celular no meio do cultivo (BRENNAM; OWENDE, 2010). No entanto, o cultivo heterotrófico tem algumas limitações: o número de espécies de microalgas que se desenvolvem em meio heterotrófico é bastante limitado; aumento dos custos com adição de substrato orgânico; mais probabilidade de contaminação e competição com outros micro-organismos; inibição do crescimento com excesso de substrato orgânico (BASHAN *et al.*, 2011).

Uma das fontes de carbono mais adequada para produção de biodiesel por meio heterotrófico é o glicerol. O glicerol pode ser obtido como subproduto da reação de transesterificação para obtenção do biodiesel. O acúmulo de lipídios é maior quando utiliza o glicerol que as outras fontes de carbono como a glicose por exemplo.

Assim, percebe que é muito promissor e pode deixar a produção de microalgas para geração de biodiesel competitiva com as outras fontes de biodiesel renovável ou não quando se efetua o cultivo com a presença de uma fonte de carbono.

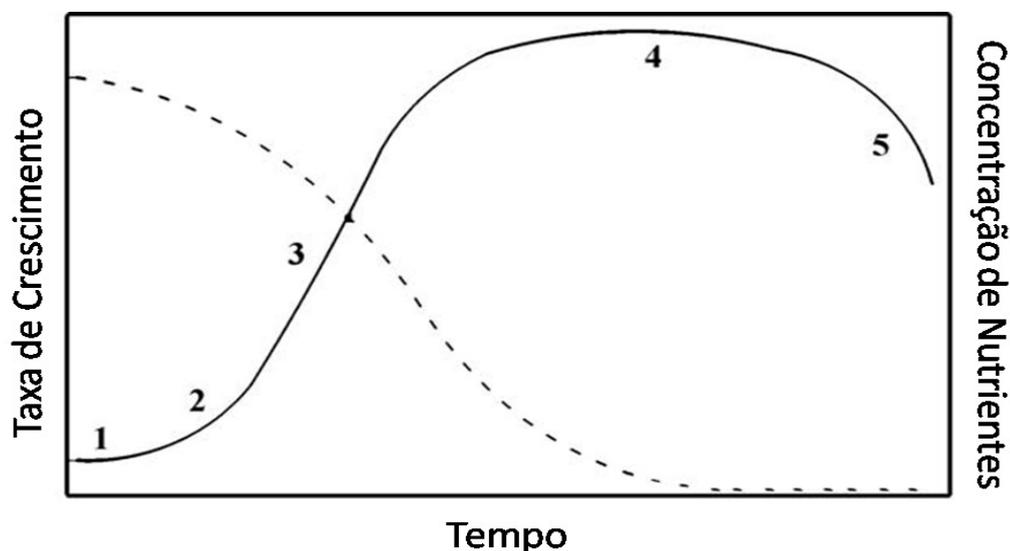
### **3.2.6 Crescimento das microalgas**

Em condições climáticas adequadas e nutrientes suficientes, as microalgas podem crescer rapidamente. Comumente elas se duplicam dentro de 24h ou menos durante a fase de crescimento exponencial elas podem complementar um ciclo de vida dentro de 2 a 4 horas, como mostra a Figura 01, de acordo com as seguintes fases:

- a) Fase de adaptação: ocorre após a inoculação das células, neste período não ocorre crescimento, apenas adaptação ao meio.
- b) Fase exponencial: caracterizada pelo crescimento logarítmico, nesta fase as células se duplicam em intervalos de tempo regulares e a velocidade crescimento atinge ponto máximo;
- c) Fase de diminuição do crescimento relativo: nesta fase acontece uma redução na taxa de crescimento celular, devido à redução de nutrientes e da intensidade luminosa devido ao aumento da densidade celular no meio de cultivo;

- d) Fase estacionária: caracterizada pela manutenção da densidade celular, a taxa de crescimento está na mesma proporção que a taxa de mortalidade, ela pode ser caracterizada por pequenos incrementos celular e decréscimos da biomassa algal;
- e) Fase de declínio: a fase de morte celular que ocorre em razão do esgotamento de nutrientes e ao autossombreamento, impossibilitando o crescimento e favorecendo a morte celular (DERNER *et al.*, 2006; PEQUENO, 2010).

Figura 01 - Representação esquemática de taxa de crescimento de algas em cultura (linha sólida) e a concentração de nutrientes (linha tracejada) em função de um período de tempo.



Fonte: Mata *et al.* (2010)

### 3.2.7 Sistema de produção de microalgas

As microalgas podem ser cultivadas em um grande número de sistemas. Para pequenas escalas ou de laboratório, o cultivo pode ser feito em pequenos fotobioreatores com iluminação interna, ou tanques de água. Para o cultivo de escalas maiores as microalgas podem crescer tanto em sistemas de culturas abertos, nos chamados tanques de recirculação (*Raceway*), quanto em sistemas fechados, nos fotobioreatores.

As lagoas abertas têm uma variedade de formas e tamanhos, mas o projeto mais comumente utilizado é a lagoa da pista. É um circuito fechado retangular com o canal de recirculação. Eles costumam operar em águas com profundidade de 15-20

cm. Os canais *Raceway* são construídos em concreto ou terra compactada, pode ser de diferentes comprimentos e diâmetros e, geralmente, forrado com plástico branco. Os sistemas de cultivo aberto normalmente são mais fáceis de construir tem funcionamento mais simples e são duráveis. Contudo, os tanques usam mais energia elétrica para homogeneizar os nutrientes e evitar a sedimentação das células, favorecendo que as mesmas recebam maior incidência solar necessária para seu crescimento.

A produção de biomassa em tanques abertos é feita em contínuo processo de propagação (SALINAS *et al.*, 1986). O ideal é que os tanques sejam rasos com até 30 cm de profundidade, feitos de plástico, concreto ou fibra de vidro.

Percebe-se que os custos de implantação e operação são bem menores quando comparados com os fotobioreatores. Apesar de seu baixo custo, as lagoas *Raceway* têm uma baixa produtividade comparada com os fotobioreatores. A principal desvantagem dos sistemas abertos é que por serem abertos à atmosfera, elas perdem água por evaporação a uma taxa similar a terra e as culturas, além da perda de CO<sub>2</sub> para atmosfera, a flutuação da temperatura durante o dia ou mesmo nos períodos sazonal e também são suscetíveis à contaminação por espécies indesejáveis (CHISTI, 2007a; HARUN *et al.*, 2010).

Na prática, lagoas abertas são normalmente reportadas a ser dominada por 2 à 6 espécies com uma gama de processos evolutivos, tem a vantagem de ter rápido crescimento, tolerância a altos níveis de oxigênio dissolvido (SCHENK *et al.*, 2008). Como desvantagem tem a questão da contaminação por outras espécies, como bactérias e outras microalgas e o fator da diluição provocado pelas chuvas e a evaporação, que pode favorecer a contaminação, exigindo desta forma técnicas rápidas de restabelecer o meio de cultura.

Nos tanque abertos, com intuito de reduzir mais os custos de produção das microalgas, faz-se a reciclagem contínua do meio de cultura que também pode favorecer a contaminação decorrente do acúmulo de matéria orgânica causado pela morte e decomposição das algas produzidas, além de alguns metabólitos produzidos durante o desenvolvimento das microalgas que podem representar alguma toxicidade.

Fotobioreatores são tipos diferentes de tanques, ou sistemas fechados, nos quais as microalgas são cultivadas em uma série de tubos transparentes, responsável por coletar a luz solar para realização da fotossíntese (CHISTI, 2007b). Nos fotobioreatores por manter o controle melhor de vários parâmetros, evita a

contaminação sendo possível ter apenas o cultivo de uma única espécie, por períodos prolongados de culturas contínuas, em razão desse maior controle operacional permite que os fotobioreatores tenham uma alta produtividade de células e é um dos mais satisfatórios sistemas para culturas ao ar livre, sendo a maioria construída com tubos de vidro ou plástico. Os tubos formam o sistema coletor de luz solar, no interior dos quais uma solução de microalgas é circulada. Os tubos são orientados de forma a maximizar a captação de luz solar, no sentido norte-sul, e têm 0,10m ou menos de diâmetro, sendo esse diâmetro limitado para que a luz penetre profundamente na cultura, assegurando uma elevada produtividade do fotobioreator. Além disso, os tubos estão dispostos verticalmente a fim de aumentar a área para capturar a luz (CHISTI, 2007b)

Dependendo do tipo de fotobioreatores eles apresentam várias vantagens frente às lagoas abertas como: oferecer melhor controle nas condições do cultivo e dos parâmetros que interferem no crescimento (pH, temperatura, mistura, CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>); previne a evaporação; menor perda de CO<sub>2</sub>; maior concentração de células; alta produtividade volumétrica; menor impacto ambiental; evita a contaminação ou minimiza a invasão de micro-organismos (MATA, 2010).

Por outro lado, os fotobioreatores têm sérias desvantagens como: superaquecimento; incrustações biológicas; acúmulo de oxigênio; dificuldade em mudança de escala; alto custo de construção e operação (MATA, 2010).

Cultivos de *Chlorella* sp., *Spirulina* sp. e *Dunaliella* sp., são viáveis em sistemas abertos por crescerem em ambientes altamente seletivos, tornando possível permanecerem relativamente livres de contaminação por outras algas e protozoários. Assim, *Chlorella* sp. cresce bem em meios contendo um meio rico em nutrientes - principalmente nitratos, *Spirulina* sp. requer alto pH e elevadas concentrações de bicarbonato e *Dunaliella* salina cresce em elevada salinidade (COLLA *et al.*, 2002).

### **3.2.8 Uso de microalgas no tratamento de águas residuárias**

A importância de introduzir o cultivo de microalgas no tratamento de águas residuárias é que as microalgas na sua nutrição necessitam de compostos orgânicos assim favorece o tratamento das águas com a redução dos compostos de nitrogênio e fósforos. Logo, a remoção desses nutrientes nas águas residuárias, evita-se a

eutrofização dos corpos aquáticos (MATA *et al.*, 2010).

As águas residuárias agroindustriais geralmente são ricas em nitrogênio, fósforo e carbono orgânico, o que pode sugerir como meio para o cultivo das microalgas. Dentro os vários gêneros de microalgas, *Chlorella* e *Scenedesmus* têm sido as mais frequentemente estudadas na remoção de nutrientes de águas residuárias (BONINI, 2012).

A primeira menção do uso de cultivo de microalgas para tratamento de águas residuárias e a colheita do lodo algal para produção de biogás por meio da digestão anaeróbica foi feito por Oswald e Gotaas (1957).

Aslan e Kapdan (2006), utilizando a *Chlorella vulgaris* para remoção de nitrogênio e fósforo obteve uma eficiência de remoção de 72% para nitrogênio e 28% para fósforo (de 3 a 8mg.L<sup>-1</sup> NH<sup>4+</sup> e 1,5-3,5 mg.L<sup>-1</sup> PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>). Outras culturas de microalgas vêm sendo utilizadas para remoção de nutrientes além da *Chlorella sp.*, como espécies de *Scenedesmus sp* e *Spirulina sp.* Outras espécies estão em estudos para avaliar a eficiência de remoção principalmente de nitrogênio e fósforo como *Nannochloris*, *Botryococcus braunii* e *Promidium bohneri* (OLGUÍN *et al.*, 2003; DUMAS *et al.*, 1998; LALIBERTE *et al.*, 1997).

Kim *et al.*, (2010), avaliando a capacidade de *Chlorella vulgaris* em remover nitrogênio, na forma do íon amônio, de um efluente de uma planta de tratamento em Cincinnati, Ohio, USA, verificaram remoções de até metade da concentração de nitrogênio em 48 horas.

Feng *et al.*, (2011), analisando a produção de lipídios por *Chlorella vulgaris* em água residuária sintética verificaram que, ao mesmo tempo em que foi possível obter produtividade lipídica de 147mg (L.d)<sup>-1</sup>, houve uma redução de 86% da demanda química de oxigênio, 97% de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e 96% de fosfato total, obtendo melhores resultados durante a fase exponencial, com alta densidade celular das microalgas em estudos.

### 3.2.8.1 Uso de microalgas no tratamento da vinhaça

O Brasil é o maior produtor mundial de etanol de cana-de-açúcar, chegando a produzir na safra de 2011/2012 um volume de 22,9 bilhões de litros (CONAB, 2012). No processo de produção de etanol podem ser utilizados mostos de melaço, caldo ou misto. O mosto é submetido á fermentação por meio de leveduras que

comumente utiliza-se o gênero *Saccharomyces*, obtendo-se o vinho. Em seguida é feito a separação da levedura e o vinho é encaminhado ao processo de destilação para obtenção de etanol. Durante a operação da destilação, a corrente de fundo da coluna recebe o nome de vinhaça.

Uma das consequências da alta produção do álcool é a produção de grande volume de vinhaça, resíduo líquido altamente poluente devido à presença de alta demanda bioquímica de oxigênio, chegando a consumir de 12.000 a 20.000mg de oxigênio por litros de substâncias biodegradáveis. Além da alta carga orgânica, a vinhaça é rica em potássio, cálcio, magnésio e sódio, com a presença em maior concentração do potássio. Quantitativamente a vinhaça também merece preocupação devida sua alta produção na geração de etanol, uma vez que é produzida na proporção de 10 – 14 litros para cada litro de etanol produzido, pelos processos convencionais de fermentação utilizados no Brasil (UNICA, 2011).

Após proibição do despejo de vinhaça diretamente nos cursos d' água (decreto Lei 3030/1967), este resíduo passou a ser aplicadas nas denominadas “áreas de sacrifício”, locais próximos às destilarias que se tornavam praticamente inutilizáveis para a agricultura, principalmente pelo efeito de salinidade do solo (BONINI, 2012).

A aplicação de vinhaça no solo fornece uma série de benefícios de natureza química, física e biológica, como aumento da disponibilidade de alguns elementos, aumento da capacidade de troca catiônica, pH e teor de matéria orgânica, propiciando melhoria no estado de agregação no solo e aumentando a capacidade de infiltração de água. No entanto, deve-se ser bastante criterioso no uso da vinhaça como fertirrigação, pois, seu uso em excesso ou por tempo prolongado pode provocar efeitos nocivos a solo principalmente devido ao aumento excessivo do potássio e sódio no solo e queda na produtividade da cultura (BEBÉ et. al., 2009, BONINI, 2012).

Alguns estudos apresentaram viabilidade no uso da vinhaça para o cultivo de microalgas, como foi o caso da pesquisa realizada por Oliveira e Cáceres (1986) que utilizaram a vinhaça diluída como meio de cultura para o desenvolvimento de oito espécies de microalgas. O estudo consistia em comparar por 30 dias o crescimento das microalgas em meio contendo apenas a vinhaça e em meio sintético, dentre as espécies analisadas estavam a *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus bijugatus* que apresentaram melhor desenvolvimento celular na solução de vinhaça do que no

meio sintético. Para as demais espécies o desenvolvimento em solução de vinhaça foi semelhante ou levemente inferior quando comparado com o crescimento em meio sintético.

Oliveira (1988) dando continuidade aos estudos efetuou uma avaliação dos parâmetros para adequar o uso da vinhaça no cultivo heterotrófico ou mixotrófico da *Chlorella vulgaris*, mantendo as condições ideais ( $1\text{g.L}^{-1}$  de vinhaça,  $800\mu\text{M}$  de uréia,  $10^5$  células.  $\text{mL}^{-1}$  e pH 7) o autor verificou crescimento mixotrófico equivalente ao cultivo fotossintético, além do acúmulo de carboidratos pelas células em condições heterotróficas.

Assim sendo, o cultivo de microalgas, especialmente em resíduos líquidos ricos em nutrientes, constitui uma possibilidade promissora de obtenção de compostos com potencialidade para geração de energia, ao mesmo tempo em que favorece uma forma de combate à poluição dos recursos hídricos.

### 3.2.8.2 *Uso de microalgas no tratamento da glicerina*

O crescimento da produção de biodiesel no Brasil promove um aumento no volume de glicerina disponível no mercado, pois a cada 1000 toneladas de biodiesel produzidas, se geram 100 toneladas de glicerina. Esse resíduo traz consigo impurezas oriundas do processo de produção que dificultam os tratamentos necessários para purificação, tornando-os muitas vezes economicamente inviáveis, podendo assim causar sérios prejuízos caso liberado no meio ambiente.

A glicerina bruta não pode ser utilizada por indústrias que requerem um composto mais puro como, por exemplo, a alimentícia, a farmacêutica e a de cosméticos, e novos usos para ele devem ser viabilizados.

Por serem extremamente comuns e abundantes na natureza, muitas pesquisas vem sendo desenvolvidas a fim de descobrir novas aplicações para a glicerina, visto que o mercado tradicional desse subproduto (indústria de medicamentos, cosméticos e alimentícios) encontra dificuldade em absorver todo o excedente oriundo da síntese do biodiesel. Uma solução está no uso de estratégias biotecnológicas para o reaproveitamento da glicerina com objetivo de gerar produtos de maior valor agregado (RIVALDI *et al.*, 2008).

Vários microrganismos são capazes de utilizar o glicerol como fonte de carbono. Por isso, um dos destinos possíveis para o material resultante da indústria

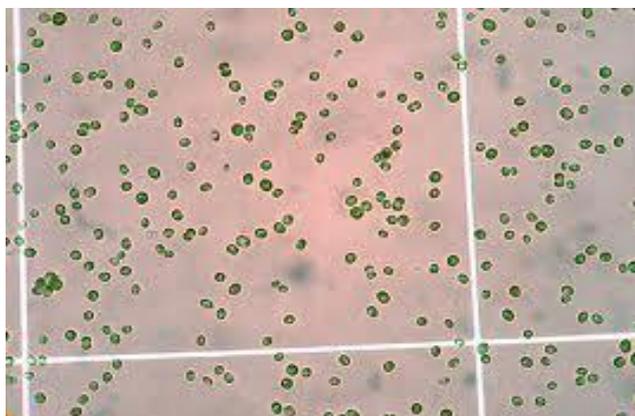
do biodiesel é seu uso na composição de meios de cultura para crescimento de microrganismos em processos biotecnológicos que levem à produção de moléculas de interesse econômico. Vários compostos químicos de relevância comercial como, etanol, pigmentos, biosurfactante, biopolímeros podem ser produzidos por microrganismos crescidos em glicerol bruto.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Microalga

Para este estudo foi utilizado cepas da espécie de microalga *Chlorella* sp existentes no Laboratório de Saneamento da UEPB, que foram fornecidas pelo Laboratório de Biotecnologia Alimentar da Universidade Federal de Santa Catarina e pelo Laboratório de Biologia Marinha da Universidade Federal Fluminense. A Figura 2 mostra a fitomicrografia das cepas de *Chlorella* sp utilizadas em todo o estudo.

Figura 2 – **Fotomicrografia** da microalga *Chlorella* sp em ampliação de 400x.



Fonte: OLIVEIRA (1995)

### 4.2 Preparo de vidrarias

Todo o material utilizado para o cultivo da *Chlorella* sp foi lavado previamente com água e sabão, em seguida enxaguado com água destilada, seco em estufa e autoclavado a 121°C por 15 minutos. Os frascos utilizados nos cultivos foram vedados com algodão, recobertos com papel para a esterilização e novamente levados à estufa para secagem completa. Após a esterilização dos frascos já preparados iniciou-se o inóculo com a *Chlorella* sp.

### 4.3 Meio de cultura

O crescimento da *Chlorella* sp é estimulado em meio suplementado, portanto para o cultivo e manutenção do inóculo, foi utilizado o meio sintético *Bold's Basal*

*Medium*(BBM), recomendado pelo Centro de Cultura de Algas e Protozoários de Cambridge (CCAP).

A partir das culturas mantidas em meio sólido em tubos de ensaios, foram desenvolvidas novas culturas em *Bold's Basal Medium*(BBM). Os repiques das culturas algais foram feitos e após obter um volume de 500mL de cultivo na fase exponencial, foi realizado um novo inóculo para cultivar a glicerina e BBM ou vinhaça e BBM, em diferentes proporções, dividindo o experimento em duas etapas.

#### **4.4 Resíduos líquidos como meio de cultivo**

Foi utilizada para o primeiro estudo a glicerina comercial, com o intuito de simular o resíduo líquido oriundo da reação de transesterificação para obtenção de biodiesel, já o resíduo líquido coletado para o segundo estudo, foi derivado do processo de destilação fracionada do caldo da cana-de-açúcar fermentado para a produção do etanol, os quais foram disponibilizados pela Usina São João, situada em Santa Rita - PB.

Devido à necessidade de grandes volumes de vinhaça para realização dos ensaios e a dificuldade de sua obtenção no período entre safra, optou-se por fazer seu acondicionamento em um frasco plástico de 2,5 litros, os quais foram estocados na geladeira, onde permaneceu por todo o tempo do experimento.

#### **4.5 Aclimação dos cultivos**

A primeira etapa do experimento consistiu adicionando a glicerina no meio de cultura BBM, em uma proporção de 2%. Após os resultados preliminares com o primeiro experimento, adaptou-se a microalga em um meio contendo 4% e 10% deste resíduo durante um tempo de cultivo de 3 dias.

Na segunda fase laboratorial, iniciou-se o cultivo mixotrófico com a adição da vinhaça em proporções de 10%, 15%, 20% e 25% de forma a permitir uma sólida aclimação.

Uma vez que a microalga em estudo foi tirada do seu habitat natural e submetida a uma condição de estresse (cultivo), houve a necessidade de uma aclimação às condições em laboratório. Por se tratar de cultivos mixotróficos, as condições físicas mantidas nas duas fases foram: temperatura de  $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ , agitação

por meio de aeração constante realizada por injeção de ar comprimido e iluminação proveniente de lâmpadas fluorescentes de 40W. A Figura 3 mostra as condições de aclimatação adotadas.

Figura 3 – Aclimatação dos cultivos



As diferentes concentrações de glicerina e vinhaça foram adotadas objetivando verificar em qual destas o crescimento algal teria melhor resultado como alternativa para um eventual tratamento e destinação destes resíduos e também como fonte de matéria orgânica para o crescimento da *Chlorella* sp.

#### **4.6 Estudos do Crescimento Celular da *Chlorella* sp**

O crescimento microalgal foi estimado pelo emprego de determinados parâmetros, como a densidade celular e o tempo de cultivo.

##### **4.6.1 Determinação da densidade celular**

Foram utilizados vários *Erlenmeyers* contendo o BBM, *Chlorella* sp e o resíduo líquido em diferentes proporções. Logo, foram coletados alíquotas das amostras, onde foram colocados em tubos de ensaio e levados para leitura na câmara de Neubauer, usando-seo microscópio.

A densidade celular da biomassa cultivada em laboratório é determinada diariamente através da microscopia óptica com aumento de 400x por contagem de

células em câmara de Neubauer e expressa em número de células por mililitro de cultivo (células.mL<sup>-1</sup>) de acordo com o protocolo de Vega e Voltolina (2007).

Esse procedimento foi repetido após 24 horas da inoculação e, para uma melhor compreensão do crescimento da *Chlorella* sp, a contagem diariamente das células foi realizada em triplicata para cada amostra.

Com isso, foram elaborados gráficos que representam as curvas de crescimento da espécie em estudo, nos quais, plotou-se no eixo da ordenada o número de células.mL<sup>-1</sup> e no eixo da abscissa o tempo de cultivo em dia.

#### **4.6.2 Tempo de cultivo**

O tempo de cultivo foi definido como o número de dias passados desde o início da inoculação que corresponde ao início da fase lag, período em que as células estão se adaptando ao meio, até atingir a fase estacionária, na qual é alcançado o número máximo da densidade celular. O tempo de cultivo foi expresso em dias.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

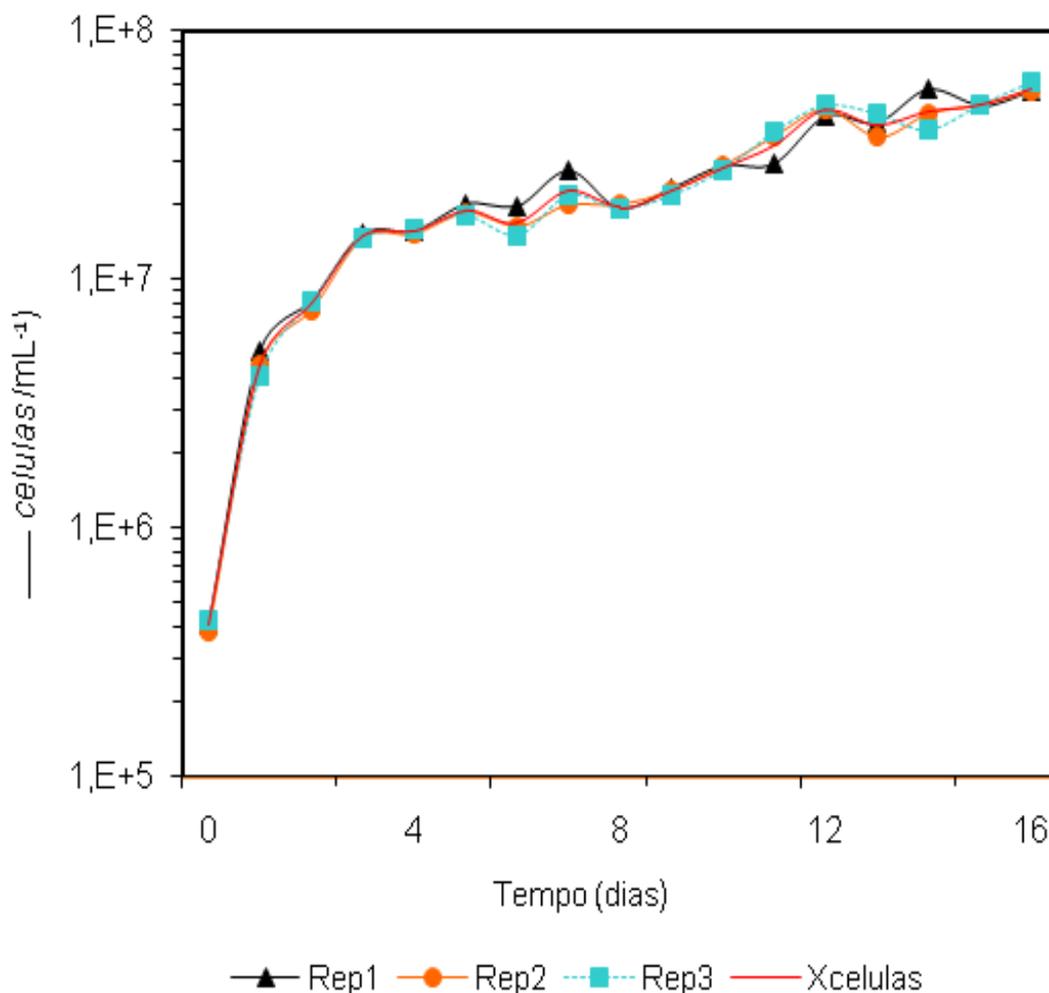
Este estudo centrou-se no aproveitamento de resíduos líquidos de elevado impacto ambiental, oriundos da obtenção de biocombustíveis, para o desenvolvimento da microalga *Chlorella* sp com potencial para produção de bioetanol e biodiesel cultivadas em fotobioreatores em escala laboratorial. Foi analisado o comportamento do crescimento da microalga por meio de dois tipos de resíduos líquidos, o primeiro estudo foi com a suplementação da glicerina comercial ao meio de cultura, a fim de simular o resíduo líquido oriundo da reação de transesterificação para obtenção de biodiesel, e o segundo estudo baseou-se no cultivo com adição da vinhaça proveniente da produção de etanol.

O crescimento das microalgas *Chlorella* sp foi determinado pelo incremento diário da densidade celular em função das diferentes formulações do meio de cultura modificado com adição da vinhaça em diferentes proporções. Para cada experimento foram plotados quatro curvas, pois diariamente se realizava a contagem de células em triplicada, a quarta curva corresponde às médias geométricas dos três resultados obtidos diariamente com a contagem de células para cada amostra.

No estudo apresentado na Figura 4 foi realizado o cultivo sem adição de resíduos, apenas foi utilizado para o desenvolvimento das microalgas o meio de cultura BBM utilizando *Erlenmeyers* de 1000mL como fotobioreatores, mantendo as aclimações ideais conforme descrito no procedimento experimental.

Observando o comportamento temporal do crescimento da *Chlorella* sp durante um cultivo com duração de 16 dias como ilustrado na Figura 4, foi verificado que o cultivo iniciou-se a fase estacionária quando atingiu a população  $10^7$  cel.mL<sup>-1</sup> que correspondeu a um tempo de cultivo de 8 dias, já que o número de células não apresentou elevado acréscimo a partir desse ponto, chegando ao fim do cultivo com um número máximo de células de  $5,9 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup>.

Figura 4 – Curva de Crescimento da *Chlorella* sp em cultivo BBM sem adição de resíduos líquidos



Santos *et al*, (2010), estudaram o crescimento da *Chlorella vulgaris* em meio de cultura Conway modificado com fotoperíodo de 12 horas em fotobioreatores de vidro de 250mL com intensidade luminosa de 4000lux, obtiveram a densidade máxima celular no oitavo dia cultivo de  $2,5 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup>, analisando a Figura 04 observa-se que no oitavo dia do experimento foi obtido o número de células de  $2,0 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup> equivalente ao obtido por Santos et al,(2010). Porém, estes autores alcançaram resultados melhores quando trabalharam com fotoperíodo integral atingindo o número máximo de células no nono dia de cultivo com um valor de  $9,43 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup>. Valor este superior a todos os valores que foram obtidos durante o presente estudo. Porém, a justificativa para não utilizar o fotoperíodo integral neste trabalho se deve ao fato que tinha que simular as mesmas condições ambientais do

campo, uma vez que o intuito era efetuar o cultivo a céu aberto, impossibilitando assim impor um fotoperíodo integral.

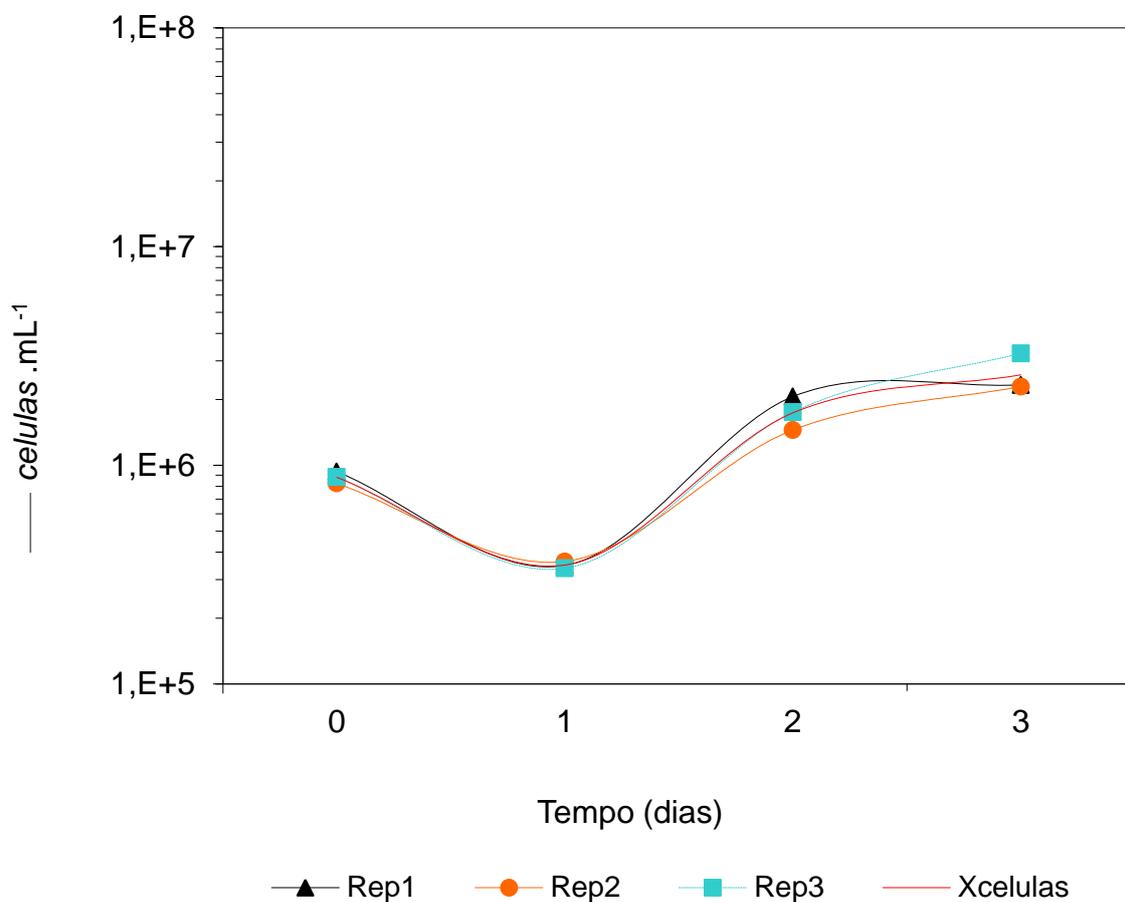
Os próximos estudos mostram o crescimento do cultivo com adição de glicerina ao meio de cultura promovendo dessa forma um cultivo mixotrófico devido adição de uma fonte orgânica visando dar um destino adequado aos resíduos líquidos, bem como favorecer as reações metabólicas que favorecem o acúmulo de lipídios, pois, de acordo com os estudos de Miao e Wu (2006) que estudaram a *Chlorella photothecoides* e verificaram que o conteúdo de lipídios pode ultrapassar a 55% quando se realiza o cultivo heterotrófico, isso significa um aumento de 4 vezes mais que no cultivo autotrófico que atinge apenas 15% de lipídios em condições similares. Assim conclui-se que a adição de uma fonte orgânica pode não só aumentar a produção da biomassa como também o acúmulo de lipídios nas células.

Brennam e Owende (2010) compararam o cultivo autotrófico em fotobioreatores fechados com o cultivo mixotrófico, às taxas de crescimento são maiores que o cultivo em lagoas abertas. No entanto, são menores que o cultivo heterotrófico.

Chojnacka e Noworyta (2004), comparando o crescimento da *Spirulina* sp, em meios de cultivos autotróficos, mixotrófico e heterotróficos, encontraram que no cultivo mixotrófico reduz a foto-inibição e obtém melhores taxas de crescimento tanto com relação ao cultivo autotrófico como heterotrófico.

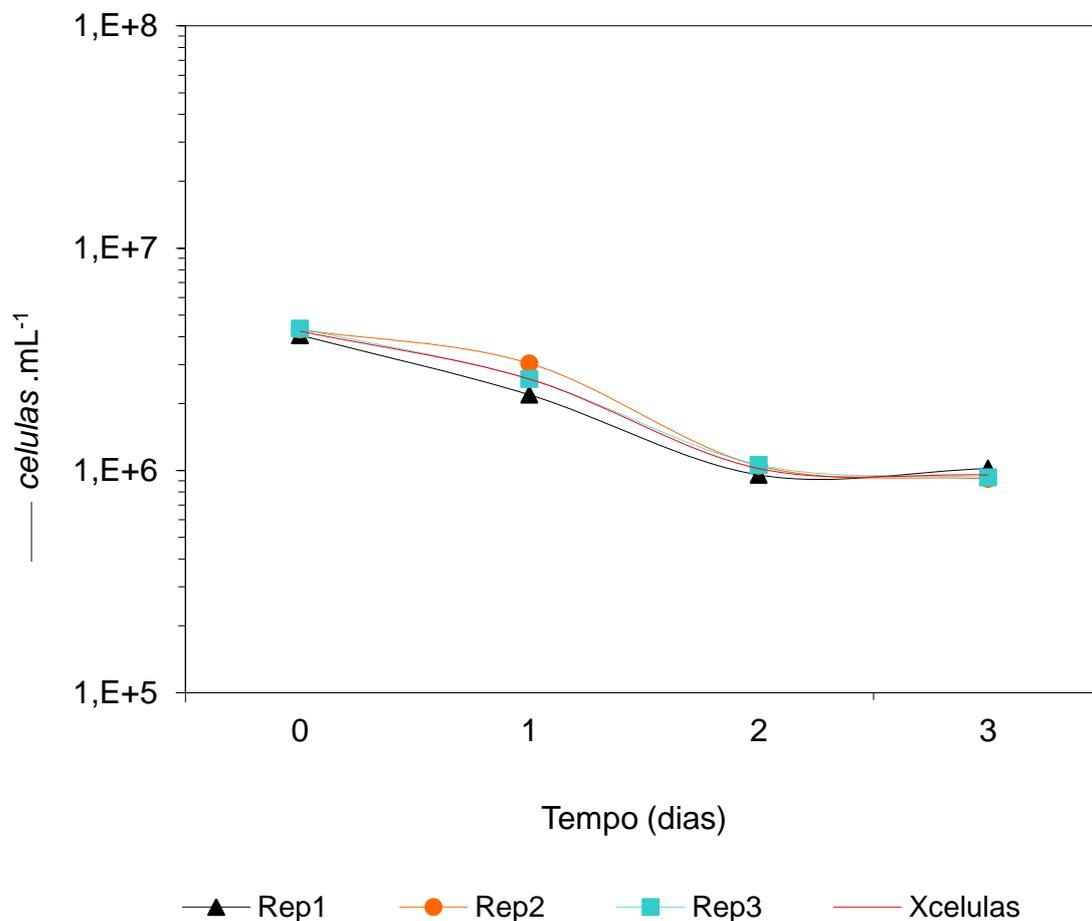
A Figura 5 apresenta o cultivo com adição de 2% de glicerina ao meio de cultura básico de desenvolvimento da *Chlorella* sp, foi observado que houve uma adaptação das células ao novo meio de cultivo, no entanto a taxa de crescimento foi relativamente baixa pois, o número máximo de células obtido foi de  $2,7 \times 10^6$  cel.mL<sup>-1</sup>, conforme pode ser verificado na Figura 5, o que mostra que a espécie em estudo não apresentou crescimento satisfatório para viabilizar a produção de biodiesel, pois, é necessário que ocorra uma alta taxa de crescimento acompanhada com o aumento do conteúdo de lipídios.

Figura 5 - Curva de Crescimento da *Chlorella* sp em cultivo BBM com adição 2% de glicerina.



A Figura 6 apresenta o cultivo da *Chlorella* sp com adição de 4%, as células em estudo não apresentaram taxa de crescimento pois, houve uma fase lag de apenas um dia seguindo para a fase de declínio conforme pode ser observado na Figura 6, pois, o cultivo foi iniciado com uma concentração celular de  $4,2 \times 10^6$  cel.mL<sup>-1</sup> finalizando com um número de células de  $9,5 \times 10^5$  cel.mL<sup>-1</sup>, isto comprova os resultados obtidos no estudo com adição de 2% de glicerina que foi a dificuldade de crescimento da célula com adição da glicerina.

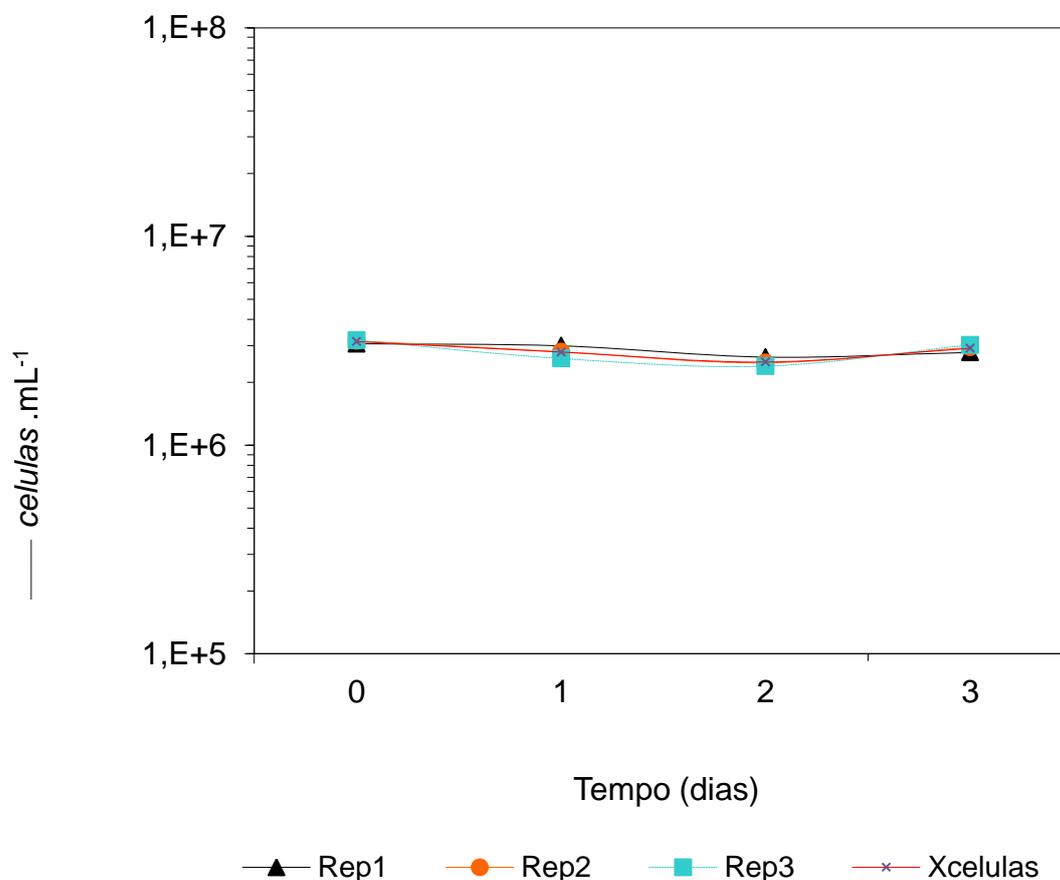
Figura 6 - Curva de Crescimento da *Chlorella* sp em cultivo BBM com adição 4% de glicerina.



A Figura 7 apresenta o estudo com adição de 10% de glicerina ao cultivo com BBM, onde foi verificado nesse estudo que as células não passaram da fase lag, não conseguindo obter crescimento como verificado na Figura 7, o cultivo praticamente não teve incremento de células, pois, foi iniciado com o número de células de  $3,1 \times 10^6$  cel.mL<sup>-1</sup> e finalizou com  $3,4 \times 10^6$  cel.mL<sup>-1</sup>.

Desta forma, conclui-se que o cultivo com adição de glicerina para a espécie de *Chlorella* em estudo não apresentou resultados satisfatórios para o desenvolvimento da célula, inviabilizando o uso do resíduo em questão para o cultivo de *Chlorella* sp visando a obtenção de lipídios ou outros insumos proveniente da célula em estudo.

Figura 7 - Curva de Crescimento da *Chlorella* sp em cultivo BBM com adição 10% de glicerina.

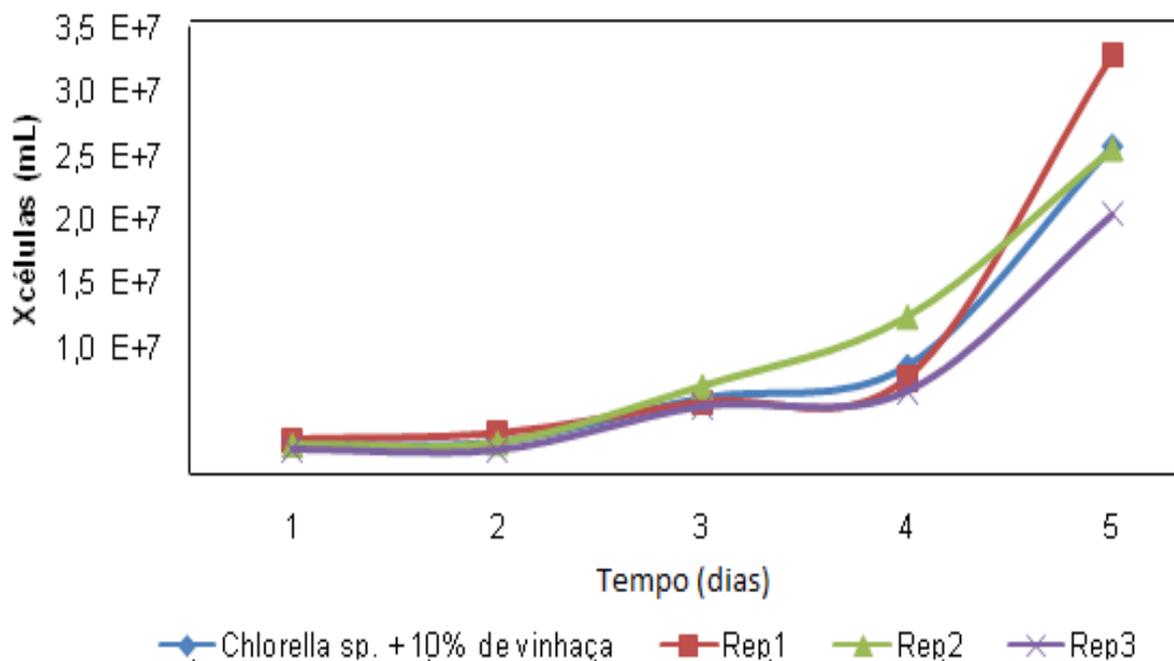


O segundo estudo realizado foi através da adição do resíduo líquido, a vinhaça. Vale ressaltar, que o Estado da Paraíba atualmente é o terceiro produtor do Nordeste de etanol a partir da cana-de-açúcar, gerando dessa forma uma elevada produção de vinhaça e por ser um efluente com alto poder poluente, seu poder poluidor é cerca de cem vezes maior que o do esgoto doméstico, devido alta concentração de matéria orgânica, possuindo uma demanda química de oxigênio de 40.000 a 70.000mg/L, baixo pH, elevada corrosividade, é considerada altamente nociva à fauna, flora, microfauna e microflora das águas doces, além de afugentar a fauna marinha quevem às costas brasileiras para procriação (Freire & Cortez, 2000). Por estes motivos, procurou-se desenvolver as microalgas utilizando a vinhaça como suplementação ao meio de cultura.

A Figura 8 apresenta a curva de crescimento da *Chlorella* sp com adição de 10% de vinhaça ao meio de cultura básico, verificando uma excelente adaptação das células a nova composição do meio de cultivo, além de uma ótima taxa de

crescimento, atingindo um número máximo de células de  $2,57 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup> em um tempo de cultivo de 5 dias.

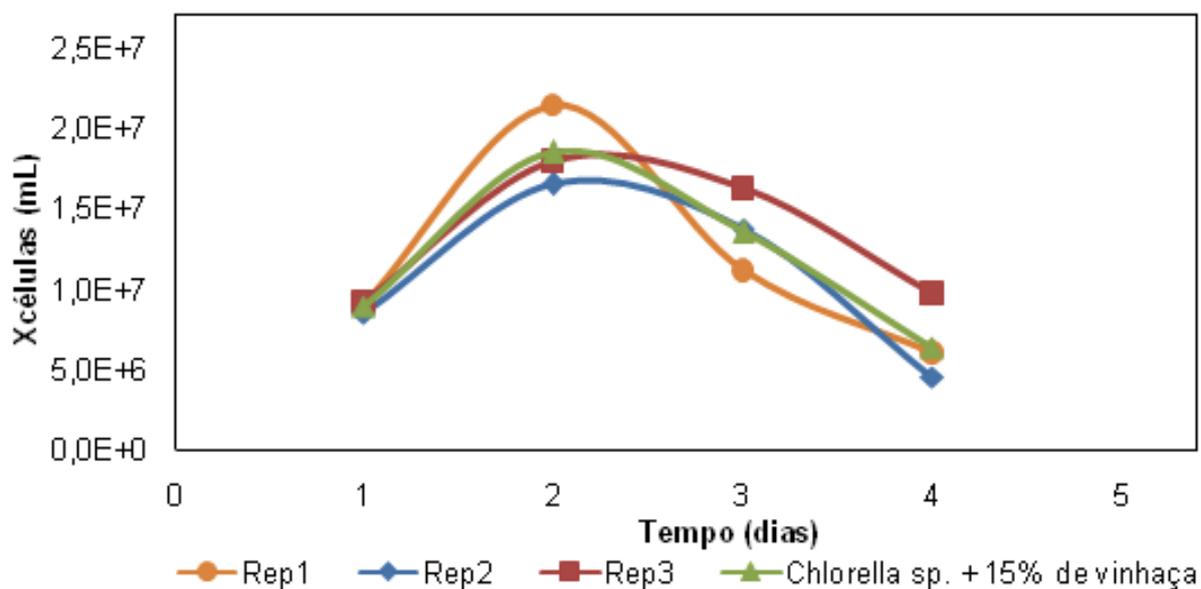
Figura 8 – Curva de crescimento da *Chlorella* sp com adição de 10% de vinhaça.



Na Figura 9, para o acréscimo de 15% de vinhaça ao meio de cultura, verificou-se que a cepa em estudo não apresentou um ótimo desenvolvimento celular, pois houve um declínio do número de células após o terceiro dia de cultivo. No entanto, verifica-se que no segundo dia de cultivo obteve-se um número elevado de células atingindo  $1,85 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup>.

O rápido declínio das células pode ter ocorrido devido principalmente à elevada presença de sólidos em suspensões na vinhaça que foi suplementada neste estudo, o que favoreceu a formação de grumos promovendo a aderência e sedimentação das microalgas, apesar da agitação. Além do mais, esta resposta pode estar também associada a compostos complexos de difícil assimilação pela alga, presentes na vinhaça como compostos fenólicos.

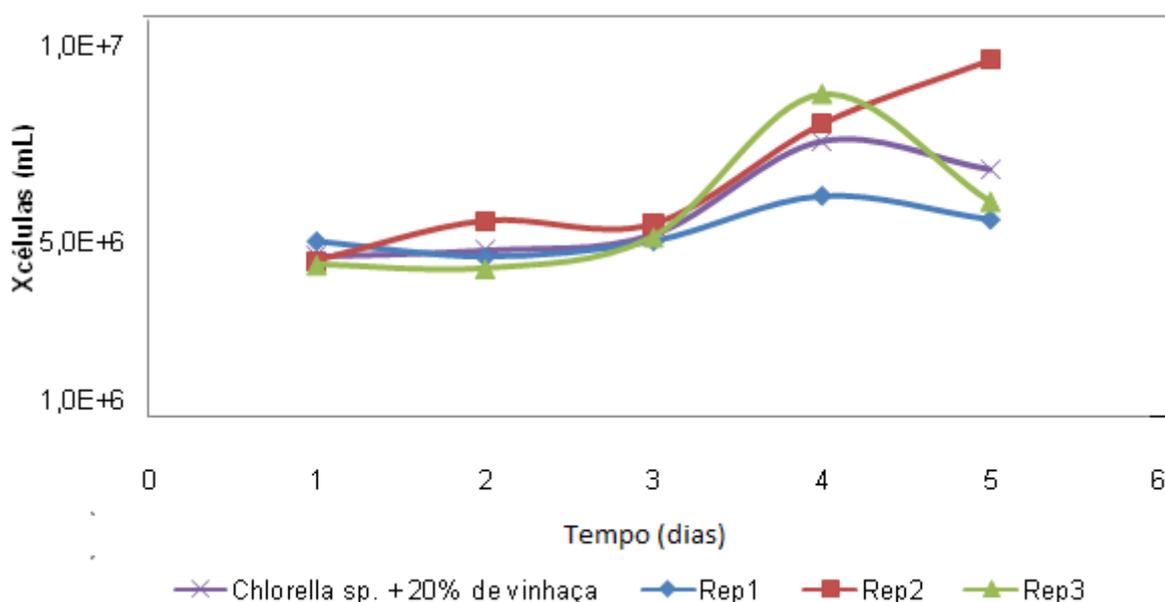
Figura 9 – Curva de crescimento da *Chlorella* sp com adição de 15% de vinhaça.



Para o estudo apresentado na Figura 10, com o acréscimo de 20% de vinhaça, tem-se uma dificuldade na adaptação celular e um crescimento lento das microalgas em estudo, com um declínio no número de células no quinto dia de contagem, obtendo um número máximo de células com 4 dias de cultivo de  $6,95 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ .

Figura 10 – Curva de crescimento da *Chlorella* sp com adição de 20% de vinhaça.

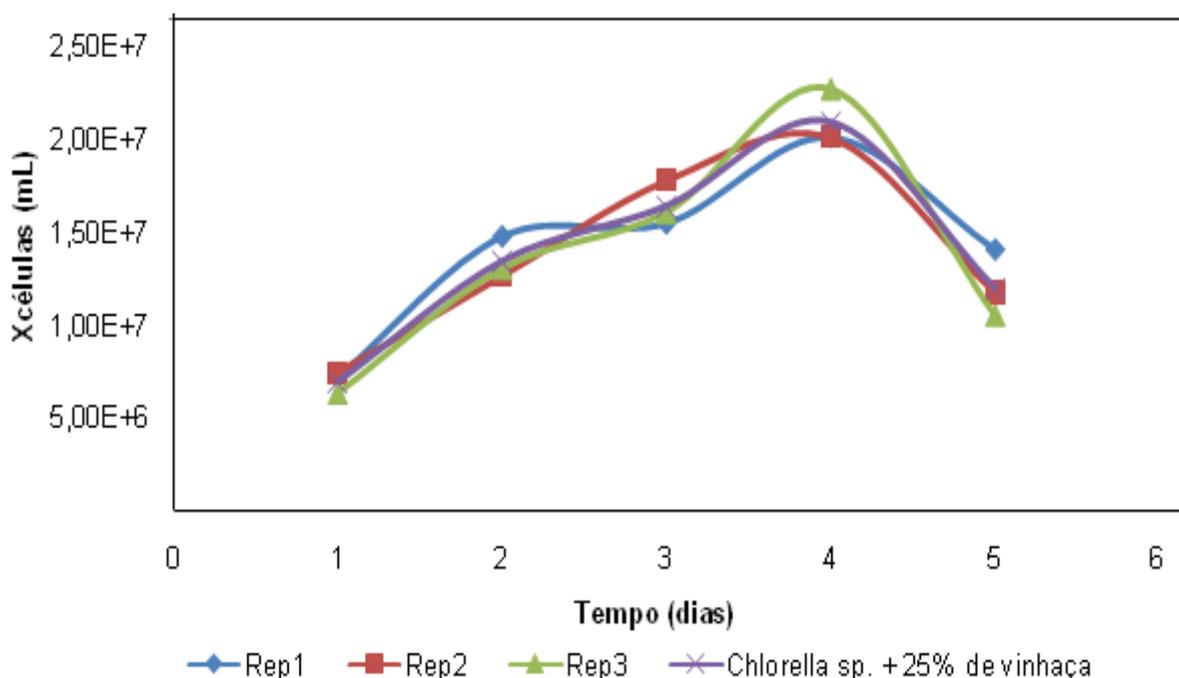
A Figura 11 apresenta a curva de crescimento onde foi efetuado o cultivo com



adição de 25% de vinhaça ao meio de cultura em *Erlenmeyer* de 1000mL, observa-

se que o número máximo de células atingidas foi de  $2,08 \times 10^7 \text{ cel.mL}^{-1}$  e que a partir do segundo dia de cultivo foi atingido a população de  $10^7 \text{ cel.mL}^{-1}$ , obtendo uma rápida fase log, já a partir do quinto dia houve um declínio no número de células, chegando a uma população de  $1,20 \times 10^7 \text{ cel.mL}^{-1}$ .

Figura 11 – Curva de crescimento da *Chlorella* sp com adição de 25% de vinhaça.



Desta forma, conclui-se que a vinhaça apresenta características para o desenvolvimento das microalgas em estudo e que houve condições de obter o cultivo mixotrófico com a vinhaça devido à presença de sua carga orgânica e alta produção celular. No entanto, foi verificado neste estudo que a fase exponencial é obtida muito rapidamente e isto pode ser devido à presença de compostos que inibem o crescimento da mesma, assim sugere-se para trabalhos posteriores que seja feito um pré-tratamento na vinhaça, principalmente no que consiste na remoção dos sólidos em suspensão que favorecem o encrudescimento da célula, evitando que a mesma mantenha uma adequada nutrição, pois as substâncias em suspensão evitam que as microalgas mantenham em contato com os nutrientes, impedindo do cultivo.

## 6 CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos durante o estudo, pôde-se constatar que microalga *Chlorella* sp apresenta um ótimo crescimento celular quando utiliza-se o efluente da indústria sucroalcooleira (vinhaça) como fonte de nutriente. Trata-se, portanto, de uma técnica viável, pois dará um destino adequado para esse resíduo líquido gerado no processo de obtenção do etanol e fornecer uma nova fonte de biocombustível.

A proporção de vinhaça que obteve melhor crescimento foi com a suplementação de 10%, onde se verificou uma excelente adaptação das células a nova composição do meio de cultivo. Verificou-se também que o excesso de material em suspensão presente na vinhaça pode ter prejudicado no crescimento celular quando utilizou proporções maiores de 10% ao meio de cultivo, ressaltando assim a importância de efetuar um pré-tratamento da vinhaça, para que não dificulte o crescimento das células ao ser adicionado o resíduo líquido como meio de cultura.

Com o uso da vinhaça obteve-se elevadas taxas de crescimento que corrobora para a produção de biodiesel, pois, para a viabilidade de geração de biocombustíveis, deve-se ter associado alta taxa de crescimento acompanhadas com concentrações elevadas de lipídios ou carboidratos.

Desta forma, conclui-se que o desenvolvimento em cultivo mixotrófico das microalgas através da suplementação do meio de cultura com os resíduos oriundos das indústrias sucroalcooleiras torna-se viável, podendo com isso favorecer a produção de outra fonte energia renovável, incrementando assim o potencial de geração de energia nas próprias usinas de etanol.

O cultivo mixotrófico por meio da adição de glicerina como meio de cultura da *Chlorella* sp não apresentou crescimento favorável mesmo em baixas proporções inviabilizando o desenvolvimento celular e conseqüentemente a produção de biodiesel a partir das microalgas.

## REFERÊNCIAS

- ABELIOVICH, A.; SHILO, M. **Photooxidative death in blue-green algae**. Journal of Bacteriology, v.111, p.682-689, 1972.
- AGARWAL, A.K. **Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines**. Progress in Energy and Combustion Science, v.33, p.233–71, 2007.
- ALGACULTURE. In: WIKIPÉDIA: A enciclopédia livre. Wikimédia, 2006. Disponível em: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Algaculture>>. Acesso em: 21 jul. 2013.
- ASLAN, S.; KAPDAN, IK. **Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae**. Ecol. Engineer. 28: 64-70. 2006.
- BABEL, S.; TAKIZAWA, S.; OZAKI, H. Factors affecting seasonal variation of membrane filtration resistance caused by *Chlorella* algae. vol. 36, n.5, p. 1193-1202, 2002.
- BASHAN, Y. et al. **Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products**. v .45, n.1, p. 11-36, 2011.
- BECKER, E. W. **Algae mass cultivation – Production and utilization**. Process Biochemistry, v.16, n.5, p. 10-14, 1981.
- BONINI, M.A. **Cultivo heterotrófico de Aphanothece microscópica Nageli e Chlorella vulgaris em diferentes fontes de carbono e vinhaça**. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Universidade Federal de São Carlos, 2012.
- BOROWITZKA, M.A. Products from microalgae. **Infofish International**, v.5, p. 21-26, 1993.
- BRASIL. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária EMBRAPA, Informação tecnológica plano nacional de agroenergia -2006-2011, 114p, 2010.
- BRENNAM, 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.
- BROWN, M. L; ZEILER, K. G. **Aquatic biomass and carbon dioxide trapping**. Energ Convers Manage. v.34, p.1005 – 1013, 1993.
- BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D. ; SOUZA, A. P. . **As rotas para o etanol celulósico no Brasil**. In: Luís Augusto Barbosa Cortez. (Org.). Bioetanol da cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade. São Paulo: Editora Edgard Blucher, v. 17, p. 365-380, 2010.

CARLOZZI, P.; SACCHI, A. Biomass production and studies on *Rhodospseudomonas palustris* grown in an outdoor, temperature controlled, underwater tubular photobioreactor. **Journal of Biotechnology**, v.88 n. 3, p.239–249, 2001.

CHISTI, Y., Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnol**, v.26, n. 3, p. 126-131, 2007a.

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

CHOJNACKA, K.; NOWORYTA, A. Evaluation of *Spirulina* sp. Growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v.5, p. 34- 46, 2004.

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

COSTA J. A.; RADMANN E. M.; CERQUEIRA V. S.; SANTOS G. C.; CALHEIROS M.N. **Perfil de Ácidos Graxos das Microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* Cultivadas em Diferentes Condições**. Alim. Nutr., Araraquara. v.17, n.4, p.429-436, 2006.

COUTTEAU, P. Micro-algae. In P. Lavens, P. Sorgeloos (Ed.), *Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture* (pp. 7-48). Rome: FAO Fisheries Technical Paper, n. 361, p. 7-48, 1996.

COZZA, K.L. **Spirulina platensis em meios naturais e sintéticos: fatores nutricionais e custos experimentais Rio Grande**. 1999. 204p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos) – Fundação Universidade Federal do Rio Grande. 1999.

DERNER, R.B. et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v.36, p. 1959-1967, 2006.

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

DUMAS, A.; LALIBERTE, G.; LESSARD, P. **Biotreatment of fish farm effluents using the cyanobacterium *Phormidium bohneri***. *Aquaculture Engineering*, n. 17, p. 57-68, 1998.

ESCOBAR, J. C.; LORA, E. S.; VENTURINI, O. J.; YANEZ, E. E.; CASTILLO, E. F.; ALMAZAN, O. Biofuels: Environment, technology and food security. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, n.13, p.1275–1287, 2009.

FAST, A.; BOYD, C. Water circulation, aeration and other management practices. In: FAST, A.; LESTER, J. (Ed.). *Marine shrimp culture: principles and practices*., Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p. 457 - 495, 1992.

FENG, K; SIU, Y.L; GUAN, D; HUBACEK, K. **Analyzing drivers of regional carbon dioxide emissions for China.** *J Ind Ecol* 16(4), p. 600–611, 2012.

FOX, R. D. **Spirulina production & potencial.** Paris: Edisud, p.232, 1996.

FREIRE, W. J.; Cortez, L. A. B. **Vinhaça de cana-de-açúcar.** Guaíba: Agropecuária, 2000. 203p.

GIELEN, D., UNEDER, F. **Alternative Fuels: An Energy Technology Perspective.** *International Energy Agency.* ETO/2005/012, IEA/ETO Working Paper.

GOLDMAN, J. C. **Outdoor algal mass cultures: II. photosynthetic yield limitations.** *Algae Biomass*, [S.l.], v. 11, p. 119-135, 1980.

GREENE, R.M.; GEIDER, R.J.; FALKOWSKI, P. G.; **Effect of iron limitation on photosynthesis in a marine diatom.** *Limnology and Oceanography*, v.36, n.8, p.1772-1782, 1991.

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

HANSEN, J., SATO, M., KHARECHA, P., BEERLING, D., BERNER, R., MASSON-DELMOTTE, V., PAGANI, M., RAYMO, M., ROYER, D.L., ZACHOS, J.C., **Target Atmospheric CO<sub>2</sub>: Where Should Humanity Aim?** *The Open Atmospheric Science Journal*, v.2, p.217-231, 2010.

HARUN, R.; SINGH, M.; FORDE, M.G.; DANQUAH, K.M. **Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, p. 1037-1047, 2010.

HENRIKSON, R. **Microalga Spirulina: Superalimento del futuro.** Barcelona: Ediciones S.A. Urano, 1994;

HILL, J.; POLASKY, S.; NELSON, E.; TILMAN, D.; HUO, H.; LUDWIG, L.; NEUMANN, J.; ZHENG, H.; BONTA, D.; **Climate change and health costs of air emissions from biofuels and gasoline;** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.106, p.2077-2082, 2009.

HUANG, G. et al. **Biodiesel production by microalgal biotechnology,** *Applied Energy*, v. 87, p. 38-46, 2010.

HUBER, G. W; IBORRA, S.; CORMA, A. **Synthesis of Transportation Fuels from Biomass: Chemistry, Catalysts, and Engineering.** *American Chemical Society*, 2006.

KAYOMBO, S.; MBWETTE, T.S.A.; KATIMA, J.H.Y; JORGENSEN, S.E. **Effects of substrate concentrations on the growth of heterotrophic bacteria and algae in**

**secondary facultative ponds.** *Water Research*, July 2003, vol. 37, n<sup>o</sup>. 12, p. 2937-2943.

KHOZIN – GOLDEBERG.; COHEN, Z. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *monodus subterraneus*. **Phytochemistry**, v. 67, p.696- 701, 2006.

KIM, S; DALE, B.E. Life cycle assessment of various cropping systems utilized for producing biofuels: Bioethanol and biodiesel. *Biomass Bioenergy*, v 29, 426-39, 2005.

KOLBER, Z.; ZENH, J.; FALKOWSKI, P. G.; **Effects of growth irradiance and nitrogen limitation on photosynthetic energy conversion in photosystem II.** *Plant Physiology*, v.88, p.923-929, 1988.

KOTZABASIS, K.; HATZIATHANASIOU, A.; BENGUA-RUIGOMEZ, M.U.; KENTOURI, M.; DIVANACH, P. Methanol as alternative carbon source for quicker efficient production of the microalgae *Chlorella minutissima*: Role of the concentration and frequency of administration. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 357-362, 1999.

JOHN, E. H.; FLYNN, K. J. Modelling phosphate transport and assimilation in microalgae, how much complexity is warranted? **Ecological Modelling**, v.125, p.145–157, 2000.

JUSSIAK, M. P.; DUSZOTA, K.; MYCIELSKI, R. Intensive culture of *Chlorella vulgaris* as the second stage on biological purification of nitrogen industry wastewater. **Water Research**, v.18, p.1-7, 1984.

LACAZ-RUIZ, R. Utilização de meios de cultura a base de solução de cinzas, efluente da indústria cítrica e meios de cultura alternativos formulados através de programa específico de computação para cultivo de *Spirulina platensis* (Norst.) 1996. 133p. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1996.

LALIBERTE, G.; LESSARD, P.; SYLVESTRE, S. Effect of phosphorus addition on nutrient removal from wastewater with the cyanobacterium *Phormidium bohneri*. *Biosource Technology*, v.59, p.227-233,1997.

LEE, Y. K.; LOW, C. S. Productivity of Outdoor Algal Cultures in Unstable Weather Conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v.41, p.1003-1006, 1993.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações.** 1ed. São Paulo: Rima, p.606, 2006.

MAHASNEH, I. A. production of single cell protein from five strains of the microalga *Chlorella sp* (Chlorophyta). **Cytobios**, v.90, p.153-161, 1997.

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

MALIS-ARAD, S.; FRIEDLANDER, M.; BEN-ARIE R.; RICHMOND, A. E. Alkalinity-induced aggregation in *Chlorella vulgaris* I. Changes in cell volume and cell-wall structure. **Plant and Cell Physiology**, v.21, n.1, p.27-35, 1980.

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

MIAO, X.; WU, QY. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. **Journal of Biotechnology**, v.110, p.85-93, 2004.

MIRANDA, J.R.P.C., **Produção de bioetanol a partir da *Microalga Scenedesmus obliquus***. 2011. 219p. Dissertação (Mestrado em Energia e Bioenergia), Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2011.

MORAIS, M. G. **Fixação de dióxido de carbono e produção de ácidos graxos por microalgas**. 2006. 199p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2006.

NAIK, S.N.; GOUD, V.V.; ROUT, P.K.; DALAI, A.K.; Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, p.578-597, 2010.

OGBONNA, J. C.; TANAKA, H. Night biomass loss and changes in biochemical composition of cells during light/dark cyclic culture of *Chlorella pyrenoidosa*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.82, n.6, p.558-564, 1996.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v.20, p.459-466, 2003.

OLIVEIRA, H. T. **Utilização de vinhaça como meio de cultura para *Chlorella vulgaris***. 1988. 146 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1995.

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

OSWALD, W.J.; GOTAAS, H.B. Photosynthesis in sewage treatment. *Trans. Am. Soc. Civ. Eng.* v.122, p.73-105, 1957.

PAIXÃO, M. C. S.; FONSECA, M. B. **A produção de etanol de cana no Estado da Paraíba: alternativas de Sustentabilidade**, n. 24, p. 171-184, jul./dez. 2011. Editora UFPR.

PAULO, V.P.F. **Optimização da produção de açúcares por microalgas para a produção de bioetanol**, Dissertação (mestrado em engenharia alimentar), p116, Universidade técnica de Lisboa, Lisboa, 2011.

PEQUENO, M.A.G. **Avaliação do potencial produtivo de óleos obtidos a partir de microalgas por cromatografia gasosa**, Dissertação (mestrado em Química), UFPB, João Pessoa, PB, p. 54, 2010.

PHUKAN, M.M.; CHUTIA, S.R.; KONWAR, K.B.; KATAKI, R. Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock, **Applied Energy**, 2011.

PIPES, W. O.; GOTAAS, H. B. Utilization of organic matter by *Chlorella* grown in seawage. *Applied Microbiology*, v.8, p.163-169, 1960.

POLI, C. R.; POLI, A. T.; ANDRATTA, E.; BELTRAME, E. Aqüicultura Experiências Brasileira. Florianópolis, SC. Multitarefa Editora Ltda.

PRADO, T. G. F. **Externalidades no ciclo produtivo da cana-de-açúcar com ênfase na geração de energia elétrica**, Dissertação (Mestrado – Programa Interunidades de Pós-Graduação em Energia) p.254, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 906, 2007.

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

RIVALDI, J.D ; SARROUH, B. F. ; FIORILO, R ; SILVA, S. S. Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 37, p. 44-51, 2008.

ROCHE, A.E.; KUMER, J.B.; MERGENTHALER, J.L.; ELY, G.A.; UPLINGER, W.G.; POTTER, J.F.; JAMES, T.C.; STERRITT, L.W. A matriz Limb criogênico Etalon Spectrometer (CLAES) em UARS: Experiment Descrição e Performance, *J. Geophys. . Res.*, 98, p. 10763-10775, 1993.

RODOLFI, I.; ZITTELLI. C.G.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BIONDI, C. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low cost photobioreactor. **Biotechnol Bioeng**, v 12, p100-102, 2009.

RODRIGUES, J. B. R. **Eficiência do crescimento da microalga *Chlorella minutissima* e sua aplicação em resíduos de suinocultura – Valorização e tratamento**, 2000. 118p. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2000.

RODULFO, B. R; MARMOL, N. H. R.; EMRALINO, G. A. Production of *Chlorella* in clarified effluent from hog manure biogas digester. **Phillipp Journal Science**, v.109, p.51-58, 1980.

RUYTERS, G. **Effects of blue light on enzymes**. In: *Blue light effects in biological Systems*. Berlin, Springer-Verlag, p.283-301, 1984.

SALINAS, D. H. L.; MICHEL, J. P.; RAMINEZ, L. F.B.; MACHUCA, C. G. **Manual de metodologia y alternativas para el cultivo de microalgas** – Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Enseada Universidade Autônoma de Baja California, Faculdade de Ciências Marinhas Enseada, B. C., 1986.

SÁNCHEZ, S.; MARTÍNEZ, M. E.; ESPEJO, M. T. PACHECO, R.; ESPINOLA, F.; HODAIFA, G. Mixotrophic culture of *Chlorella pyrenoidosa* with olive-mill wastewater as the nutrient medium. **Journal of App. Phycology**, v. 13, p.443–449, 2001.

SANTOS, L.B.G.; CALAZANS, N.K.F.; MARINHO, Y.F.; SANTOS, A.P.F.; NASCIMENTO, R.DM.; VASCONCELOS, R.F.L.; MACÊDO, D.M.; GALVEZ, A.O. Influência do fotoperíodo no crescimento da *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae) visando produção de biodiesel. p.3, 2010.

SCHENK, P.M.; STEPHENS, E.; MARX, U.C.; MUSSGNUG, J.H.; POSTEN, C. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. **Bioenerg**, v 1, p-20-43, 2008.

SHELEF, G.; SOEDER, C. J **Algae Biomass: production and use**. Amsterdam: Elsevier-North Holland Biomedical, 852.p 1980

SOARES, D. **Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo**, Dissertação (mestrado em bioquímica), UFPR, Curitiba, 107 p, 2010.

SOUZA, W. Artigo originalmente publicado no Monitor Mercantil, 25/08/2008. Disponível em: <http://www.ecodebate.com.br/index.php/2008/08/28/microalgas-e-a-producao-de-biodiesel-artigo-de-wanderley-de-souza/>. Acesso em 08 jun.20013.

TAVARES, J.E.B., **Cultivo de microalgas do gênero Botryococcus visando a produção de biodiesel**. Dissertação (Mestrado em biologia celular e biotecnologia), Universidade de Lisboa, Lisboa, p. 68, 2009.

TRAVIESO, L.; BENÍTEZ, F.; SÁNCHEZ, E.; BORJA, R.; MARTÍN, A.; COLMENAREJO, M. F. Batch mixed culture of *Chlorella vulgaris* using settled and diluted piggery waste. **Ecological Engineering**, 2006. Disponível em:< <http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em : 30 jun. 2013.

TUKAJ, Z.; MATUSIAK-MIKULIN, K.; LEWANDOWSKA, J.; SZURKOWSKI, J. Changes in the pigment patterns and the photosynthetic activity during a light-induced cell cycle of the green algae *Scenedesmus armatus*. **Plant Physiology and Biochemistry**.v.41, p.337–344, 2003.

UMINO, Y.; SATOH, A.; SHIRAIWA, Y. Factors controlling induction of external carbonic anhydrase and change in  $K_{1/2}$  ( $\text{CO}_2$ ) of photosynthesis in *C. vulgaris*. **Plant and Cell Physiology**, v. 32, p.379-384, 1991.

UNICA - UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. Disponível em: <<http://www.unica.com.br>>. Acesso em: 12 jun.2013.

VAN HANH, V.;THI HONG MINH, N. Bioethanol production from marine algae biomass:prospect and troubles. **Journal of Vietnamese environment**, v.3, p.25-29, 2012.

VEZIROGLU, T.N.; SAHIN, S. 21st Century's energy: Hydrogen energy system, **Energy Conversion and Management**, v. 49, p.1820-1831, 2008.

VONSHAK, A. Spirulina: growth, physiology and biochemistry. In Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology. Vonshak, A. (Ed.), Taylor & Francis, London, 1997, p.43-65.

WILLIAMS, P.J.; LAURENS, L.M. Microalgae as biodiesel and biomass feedstocks: Review and analysis of the biochemistry, energetics and economics. **Energy &Environmental Science**, v. 3, p. 554-590, 2010.

WONG, M.H.; LAY, C.C. The comparison of soybean wastes using tea leaves and sewage sludge for growing *Chlorella pyrenoidosa*. **Environ. Pollut.** v.23,p.247-259, 1980.