



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

HELDER RODRIGUES DA SILVA

**APLICAÇÃO DE MÉTODOS PARA CONCENTRAÇÃO DA
BIOMASSA DE MICROALGAS CULTIVADAS EM MEIO
LÍQUIDO**

HELDER RODRIGUES DA SILVA

**APLICAÇÃO DE MÉTODOS PARA CONCENTRAÇÃO DA
BIOMASSA DE MICROALGAS CULTIVADAS EM MEIO
LÍQUIDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioenergia como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioenergia, Área de Concentração em Biocombustíveis.

Orientadora: Prof. Dra. Carmen Luisa Barbosa Guedes.

Coorientadora: Dra. Diva Souza Andrade.

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S586a Silva, Helder Rodrigues da.
Aplicação de métodos para concentração da biomassa de microalgas cultivadas
em meio líquido / Helder Rodrigues da Silva. – Londrina, 2013.
112 f. : il.

Orientador: Carmen Luisa Barbosa Guedes.

Coorientador: Diva Souza Andrade.

Dissertação (Mestrado em Bioenergia) – Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, 2013.
Inclui bibliografia.

1. Biodiesel – Teses. 2. Microalga – Cultivo – Teses. 3. Conversão de biomassa –
Teses. 4. Biotecnologia microbiana – Teses. I. Guedes, Carmen Luisa Barbosa.
II. Andrade, Diva Souza. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências
Exatas. Programa de Pós-Graduação em Bioenergia. IV. Universidade Estadual de
Maringá. V. Universidade Estadual de Ponta Grossa. VI. Universidade Estadual do
Centro-Oeste. VII. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. VIII. Título.

CDU 662.755

HELDER RODRIGUES DA SILVA

**APLICAÇÃO DE MÉTODOS PARA CONCENTRAÇÃO DA BIOMASSA
DE MICROALGAS CULTIVADAS EM MEIO LÍQUIDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioenergia como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioenergia, Área de Concentração em Biocombustíveis.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Carmen Luisa Barbosa Guedes
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Andre Luiz Martinez de Oliveira
UEL – Londrina – PR

Dr. Arnaldo Colozzi Filho
IAPAR – Londrina – PR

Londrina, 22 de fevereiro de 2013.

Aos meus pais, Mauricio e Maria Madalena e minha querida avó Adileta, que sempre acreditaram na concretização deste ideal e me apoiaram em todos momentos de minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pelo fortalecimento diante inúmeros obstáculos e por conceder o que há mais de valioso para mim, minha Família e Amigos.

A Universidade Estadual de Londrina - UEL, pelas oportunidades.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo.

Ao Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), pela utilização da estrutura e ao Convênio Copel/IAPAR/Fapeagro/Projeto Microalgas, pelo apoio financeiro na condução da parte experimental. A Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP, Assis-SP) pelo fornecimento do Policloreto de Alumínio - PAC. A empresa Syral Halotek (Grupo Tereos), Palmital - SP, pelo fornecimento do Amido de mandioca catiônico.

A minha orientadora Profa. Dra Carmen Luisa Barbosa Guedes, não só por sua orientação, pelos ensinamentos, dedicação, pela confiança, pelo incentivo, mas sobretudo por sua amizade.

A minha co-orientadora Dra. Diva Souza Andrade pelo aceite de co-orientação, pelos ensinamentos, paciência, pelas valiosas sugestões, pelas cobranças, dedicação, mas, sobretudo por sua amizade.

Aos professores do programa de Mestrado em Bioenergia, pelos conhecimentos, dedicação.

Aos técnicos e funcionários do Laboratório de Microbiologia do Solo-IAPAR pela colaboração.

Aos amigos do LAFLURPE - Laboratório de Fluorescência e Ressonância Paramagnética, do Laboratório de Microbiologia do Solo - IAPAR e do Projeto Microalgas - IAPAR, em modo especial a Luan Vinicius Salvador, Fernanda de Almeida Fin de Lima, Guilherme Napoleão Pertinhez, Dr. Juscélio Donizete Cardoso, Ederson Alves, Dra. Iara C. A. Gatti, Dra. Alexandra Scherer, Jonathan Fiorio, Jonathan Baumi, Antonio Candido Rosa, Grasielle Saltorelli, Rafael Bruno Guayato Nomura; pela amizade, atenção e disponibilidade em me ajudar sempre que necessário.

Aos meus pais Mauricio e Madalena e minha querida avó Adileta, pelo Amor, carinho, dedicação; pelo incentivo e apoio em todos momentos de minha vida; pelo exemplo de vida e honestidade a ser seguida e a compreensão pelas minhas ausências; pela oportunidade que me deram de buscar o conhecimento, como forma de conquistar meus sonhos e tornar-me um homem.

A minha Irmã Gisele, pelo apoio, companheirismo, conselhos oferecidos e por sempre me incentivar em meus objetivos.

A minha namorada Raquel Evangelista, pelo Amor, carinho, companhia e amizade; compreensão nas horas de estresse, conselhos e ajudas oferecidas.

A todos que tenham auxiliado de alguma forma na realização deste trabalho, para que houvesse êxito.

A todos, o meu muito Obrigado !

"Você pode encarar um erro como uma besteira a ser esquecida, ou como um resultado que aponta uma nova direção".

Steve Jobs

SILVA, Helder Rodrigues. **Aplicação de métodos para concentração da biomassa de microalgas cultivadas em meio líquido**. 2013. 112f. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

Microalgas são microrganismos fotossintetizantes e em suas células os componentes em maior proporção são pigmentos, carboidratos, proteínas e lipídeos, despertando grande interesse para a indústria biotecnológica, especialmente na produção de biocombustíveis. Uma das etapas importantes no cultivo das microalgas é a concentração e separação (colheita) da biomassa do meio líquido, que representa em torno de 20 a 30% do custo total da produção. O objetivo deste trabalho foi cultivar microalgas, e avaliar eficiência de técnicas para separação e concentração de biomassa em cultivo de microalgas e analisar o teor de lipídeos. As estirpes de microalgas avaliadas foram: *Chlorella vulgaris* (IPR-Chlv7123), *Neochloris oleoabundans* (UTEX LB1185) e *Botryococcus braunii* (UTEX 572). O ambiente de cultivo foi em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 h com temperatura controlada de $28,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$, na fase luminosa, e $22,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$, na fase escura, com densidade de fluxo de fótons da radiação fotossinteticamente ativa de aproximadamente $100 \pm 20 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, utilizando quatro lâmpadas fluorescentes tubulares (65 W cada) dispostas paralelamente na parte superior do recipiente para cultivo da microalga, e também em casa de vegetação de vidro exposto a luz solar. O meio de cultivo utilizado foi o BBM e a análise de lipídeos foi realizada pelo método de espectroscopia de fluorescência. Os experimentos para concentrar a biomassa das microalgas em cultivo foram centrifugação, floculação com amido de mandioca catiônico, floculação por indução alcalina do pH e floculação com policloreto de alumínio. O teor lipídico foi de 19,1% para *C. vulgaris*, 47,1% *N. oleoabundans* e 32,3% *B. braunii*. A eficiência da centrifugação para concentrar a biomassa foi acima de 97,7% para a *N. oleoabundans* e de 98,5% para *B. braunii*, enquanto, para a *C. vulgaris* foi alcançado 100% de eficiência. A floculação com amido de mandioca catiônico foi acima de 86% para a *N. oleoabundans*, de 71% para *C. vulgaris* e de 75% para *B. braunii*. A eficiência de floculação por indução alcalina do pH foi acima de 87% para *N. oleoabundans* e acima de 68% para *B. braunii*. A eficiência da floculação de microalgas com PAC foi acima de 78% para *N. oleoabundans*, acima de 73% para *C. vulgaris*, acima de 94% para *B. braunii*. Conclui-se que, as técnicas de floculação com amido de mandioca catiônico, policloreto de alumínio - PAC e por indução alcalina do pH, para concentração de biomassa em cultivo de microalgas foram eficientes e podem ser aplicadas nos cultivos em grande escala.

Palavras-chave: *Neochloris oleoabundans*. *Chlorella vulgaris*. *Botryococcus braunii*. Lipídeos. Colheita.

SILVA, Helder Rodrigues. **Application of methods for biomass concentration of microalgae cultivated in the liquid medium**. 2013. 112f. Dissertation (Master in Bioenergy) - State University of Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

Microalgae are photosynthetic microorganisms and their cell components are in greater proportion pigments, carbohydrate, protein and lipids, arousing great interest to the biotechnology industry, especially in the production of biofuels. One of the important steps in the cultivation of microalgae is the concentration and separation (harvest) of biomass from the liquid medium, comprising 20-30% of total production costs. The objective of this study was to cultivate different microalgae species, and evaluate effectiveness of techniques for separation and concentration of its biomass microalgae and analyze the content of lipids. The microalgae strains evaluated were: *Chlorella vulgaris* (IPR-Chlv7123), *Neochloris oleoabundans* (UTEX 1185) and *Botryococcus braunii* (UTEX 572). The culture environment was in a growth chamber with a photoperiod of 12 h at a controlled temperature of 28.0 ± 2.0 °C in the light phase, and 22.0 ± 2.0 °C during the dark phase, with photon flux density of photosynthetically active radiation was approximately $100 \pm 20 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, using four fluorescent lamps (each 65 W) placed parallel in the upper part of the container for the cultivation of microalgae and also in a greenhouse glass exposed to sunlight. The culture medium used was BBM and the lipid analysis was performed by the method of fluorescence spectroscopy. The experiments to concentrate the microalgal biomass in cultivation were centrifugation, flocculation with cationic cassava starch, flocculation induction by alkaline pH and flocculation with poly aluminium chloride (PAC). The lipid content was 19.1% for *C. vulgaris*, 47.1% *N. oleoabundans* and 32.3% *B. braunii*. The efficiency of the centrifugation to concentrate the biomass was up to 97.7% *N. oleoabundans* and 98.5% for *B. braunii* while to *C. vulgaris* a 100% efficiency was reached. Flocculation with cationic cassava starch was above 86% for *N. oleoabundans*, 71% for *C. vulgaris* and 75% for *B. braunii*. The flocculation efficiency of induction of the alkaline pH is above 87% for *N. oleoabundans* and above 68% for *B. braunii*. The efficiency of microalgae flocculation with PAC was above 78% for *N. oleoabundans*, above 73% for *C. vulgaris*, above 94% for *B. braunii*. In conclusion, the techniques of flocculation with cationic cassava starch, poly aluminum chloride - PAC and induction of alkaline pH, to concentrate the biomass cultivation of microalgae were effective and can be applied in large scale production.

Keywords: *Neochloris oleoabundans*. *Chlorella vulgaris*. *Botryococcus braunii*. Lipids. Harvest.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fotomicrografia óptica de células da microalga <i>C. vulgaris</i>	24
Figura 2 – Fotomicrografia óptica de células da microalga <i>N. oleoabundans</i>	25
Figura 3 – Fotomicrografia óptica de células da microalga <i>B. braunii</i>	26
Figura 4 – Estrutura química do vermelho do nilo (7-diethylamino-3,4-benzophenoxazine-2-one).....	27
Figura 5 – Lagoa em pista para cultivo de microalgas	29
Figura 6 – Diagrama esquemático do processo de colheita de microalgas em sistemas de cultivos abertos e fechados	33
Figura 7 – Processo de floculação e sedimentação utilizando floculantes	35
Figura 8 – Processo de filtração	42
Figura 9 – Equipamento para filtração.....	43
Figura 10 – Frascos utilizados nos cultivos de inóculo inicial (a) tubo de ensaio de 15 mL; (b) erlenmeyer de 500 mL e (c) frascos de 3.000 mL	46
Figura 11 – Placa de petri com meio BBM sólido.....	48
Figura 12 – (a) Frasco erlenmeyer utilizado para produção de inóculo inicial e (b) placa de petri para o cultivo em meio sólido	49
Figura 13 – Sistema de cultivo em aquário de vidro.....	50
Figura 14 – Frascos com capacidade de 2,0 L utilizados para o cultivo das estirpes de <i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB1185) e <i>C. vulgaris</i> (IPR- <i>Chlv</i> 7123)	51
Figura 15 – Cultivo da microalga <i>B. braunii</i> (UTEX 572) em saco plástico transparente	54
Figura 16 – Espectro de fluorescência da curva analítica com emissão máxima em 610nm.....	61
Figura 17 – Representação gráfica do diagrama de Pareto para os efeitos dos parâmetros analisados sobre a densidade óptica (670 nm), obtidos pela centrifugação da microalga <i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB1185).....	63

Figura 18 – Superfície de resposta para densidade óptica e número de células (x105) do sobrenadante do meio de cultivo da microalga <i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB 1185) após centrifugação de acordo com o número de rotações por minuto e tempo de centrifugação.....	64
Figura 19 – Parâmetros desejáveis para pontos ótimos de trabalho de centrifugação da microalga <i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB1185) por densidade óptica e contagem celular	65
Figura 20 – Representação gráfica do diagrama de Pareto para os efeitos dos parâmetros analisados sobre a densidade óptica (670 nm), obtidos pela centrifugação da microalga <i>C. vulgaris</i> (IPR- <i>Chlv</i> 7123)	67
Figura 21 – Superfície de resposta para densidade óptica e número de células (x105) do sobrenadante do meio de cultivo da microalga <i>C. vulgaris</i> (IPR- <i>Chlv</i> 7123) após centrifugação de acordo com o número de rotações por minuto e tempo de centrifugação	68
Figura 22 – Parâmetros desejáveis para pontos ótimos de trabalho de centrifugação da microalga <i>C. vulgaris</i> (IPR- <i>Chlv</i> 7123) por densidade óptica e contagem celular	69
Figura 23 – Representação gráfica do diagrama de Pareto para os efeitos dos parâmetros analisados sobre a densidade óptica (670 nm), obtidos pela centrifugação da microalga <i>B. braunii</i> (UTEX 572)	70
Figura 24 – Superfície de resposta para densidade óptica do meio de cultivo da microalga <i>B. braunii</i> (UTEX 572) após centrifugação de acordo com o número de rotações por minuto e tempo de centrifugação	71
Figura 25 – Parâmetros desejáveis para pontos ótimos de trabalho de centrifugação da microalga <i>B. braunii</i> (UTEX 572) por densidade óptica.....	72
Figura 26 – Taxa de floculação no meio de cultivo da microalga <i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB1185) contendo diferentes concentrações do amido de mandioca catiônico (0,01; 0,05; 0,1 e 0,3 % v/v) após 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h de adição do agente floculante	73
Figura 27 – Representação gráfica do diagrama de Pareto para os efeitos dos parâmetros analisados sobre a densidade óptica (670 nm), obtidos pela floculação da microalga <i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB1185) com amido de mandioca catiônico.....	75

Figura 28 – Superfície de resposta para densidade óptica (670 nm) da <i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB1185) em atividade de floculação nos níveis de concentração floculante e tempo de repouso	76
Figura 29 – Superfície de resposta do número de células (x10 ⁵) (cel. mL ⁻¹) <i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB1185) em atividade de floculação com diferentes níveis de amido de mandioca catiônico e tempo de repouso	78
Figura 30 – Parâmetros desejáveis para pontos ótimos de trabalho para floculação da microalga <i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB1185) com amido de mandioca catiônico por densidade óptica e contagem celular.....	78
Figura 31 – Representação gráfica do diagrama de Pareto para os efeitos dos parâmetros analisados sobre a densidade óptica (670 nm), obtidos pela floculação da microalga <i>C. vulgaris</i> (IPR-Chlv7123) com amido de mandioca catiônico	81
Figura 32 – Superfície de resposta para densidade óptica do meio de cultivo da microalga <i>C. vulgaris</i> (IPR-Chlv7123), com variação do pH, concentração em tempo de 6 h de repouso e variação de tempo e concentração em pH 6,0	82
Figura 33 – Parâmetros desejáveis para pontos ótimos de trabalho para floculação da microalga <i>C. vulgaris</i> (IPR-Chlv7123) com amido de mandioca catiônico por densidade óptica	83
Figura 34 – Representação gráfica do diagrama de Pareto para os efeitos dos parâmetros analisados sobre a densidade óptica da microalga <i>B. braunii</i> (UTEX 572) (670 nm), obtidos pela floculação com amido de mandioca catiônico	84
Figura 35 – Superfície de resposta para densidade óptica do meio de cultivo da microalga <i>B. braunii</i> (UTEX 572), no pH 8,0 com variação de tempo e concentração de amido de mandioca catiônico e a superfície de resposta no tempo 6 h de repouso com variação no pH e concentração de amido de mandioca catiônico	85

Figura 36 – Parâmetros desejáveis para pontos ótimos de trabalho para floculação da microalga <i>B. braunii</i> (UTEX 572) com amido de mandioca catiônico por densidade óptica	86
Figura 37 – Representação gráfica do diagrama de Pareto para os efeitos dos parâmetros analisados sobre a densidade óptica (670 nm), obtidos pela indução alcalina do pH da microalga <i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB1185)	87
Figura 38 – Superfície de resposta para densidade óptica (670 nm) em atividade de floculação da microalga <i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB1185) pela indução alcalina do pH e tempo de repouso	88
Figura 39 – Parâmetros desejáveis para pontos ótimos de trabalho para floculação da microalga <i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB1185) pela indução alcalina do pH por densidade óptica.....	89
Figura 40 – Representação gráfica do diagrama de Pareto para os efeitos dos parâmetros analisados sobre a densidade óptica (670 nm), obtidos pela indução alcalina do pH da microalga <i>B. braunii</i> (UTEX 572)	91
Figura 41 – Superfície de resposta para densidade óptica das amostras do sobrenadante da microalga <i>B. braunii</i> (UTEX 572) após indução do pH e tempo de repouso	92
Figura 42 – Parâmetros desejáveis para pontos ótimos de trabalho para floculação da microalga <i>B. braunii</i> (UTEX 572) por indução alcalina do pH por densidade óptica	93
Figura 43 – Representação gráfica do diagrama de Pareto para os efeitos dos parâmetros analisados sobre a densidade óptica (670 nm), obtidos pela floculação com policloreto de alumínio-PAC da microalga <i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB1185)	94
Figura 44 – Superfície de resposta para densidade óptica do meio de cultivo da microalga <i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB1185), conforme a variação de concentração de policloreto de alumínio, pH e tempo igual a 30 minutos	95

Figura 45 – Superfície de resposta para densidade óptica do meio de cultivo da microalga <i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB1185), conforme a variação de concentração de policloreto de alumínio e tempo pH 6,0	96
Figura 46 – Parâmetros desejáveis para pontos ótimos de trabalho para floculação da microalga <i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB1185) com policloreto de alumínio- PAC por densidade óptica	97
Figura 47 – Representação gráfica do diagrama de Pareto para os efeitos dos parâmetros analisados sobre a densidade óptica (670 nm), obtidos pela floculação com policloreto de alumínio-PAC da microalga <i>C. vulgaris</i> (IPR- <i>Chlv</i> 7123).....	99
Figura 48 – Superfície de resposta para densidade óptica do meio de cultivo da microalga <i>C. vulgaris</i> (IPR- <i>Chlv</i> 7123), conforme a variação de concentração de policloreto de alumínio, tempo em pH 6,0.....	100
Figura 49 – Superfície de resposta para densidade óptica do meio de cultivo da microalga <i>C. vulgaris</i> (IPR- <i>Chlv</i> 7123), conforme a variação de concentração de policloreto de alumínio, pH no tempo de 45 min	100
Figura 50 – Parâmetros desejáveis para pontos ótimos de trabalho para floculação da microalga <i>C. vulgaris</i> (IPR- <i>Chlv</i> 7123) com policloreto de alumínio- PAC por densidade óptica	101
Figura 51 – Representação gráfica do diagrama de Pareto para os efeitos dos parâmetros analisados sobre a densidade óptica (670 nm), obtidos pela floculação com policloreto de alumínio-PAC da microalga <i>B. braunii</i> (UTEX 572)	103
Figura 52 – Superfície de resposta para densidade óptica do meio de cultivo da microalga <i>B. braunii</i> (UTEX 572) após adição de policloreto de alumínio, analisando as variáveis pH e concentração no tempo de 45 min de repouso	104
Figura 53 – Superfície de resposta para densidade óptica do meio de cultivo da microalga <i>B. braunii</i> (UTEX 572) após adição de policloreto de alumínio, analisando as variáveis tempo e concentração em pH 6,0	104
Figura 54 – Parâmetros desejáveis para pontos ótimos de trabalho para floculação da microalga <i>B. braunii</i> (UTEX 572) com policloreto de alumínio- PAC por densidade óptica.....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação da produção de óleo por microalgas com cultivos de plantas oleaginosas.....	27
Tabela 2 – Composição e a concentração do meio de cultura BBM.....	46
Tabela 3 – Solução estoque de micronutrientes para o meio de cultura BBM.....	47
Tabela 4 – Solução de EDTA alcalina para meio de cultura BBM	47
Tabela 5 – Solução de ferro ácida para meio de cultura BBM	47
Tabela 6 – Teor lipídico e biomassa das microalgas avaliadas	62
Tabela 7 – Análise de variância ANOVA de acordo com a resposta D.O. da microalga <i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB 1185).....	63
Tabela 8 – Análise de variância ANOVA de acordo com a resposta D.O. da microalga <i>C. vulgaris</i> (IPR-Chlv7123)	66
Tabela 9 – Análise da variância (ANOVA) para resposta em D.O da estirpe de microalga <i>B. braunii</i> (UTEX 572).....	70
Tabela 10 – Densidade óptica (D.O. 670) no meio de cultivo da microalga <i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB1185) após adição do amido de mandioca catiônico.....	73
Tabela 11 – Análise da variância (ANOVA) para variável resposta D.O. da microalga <i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB1185)	74
Tabela 12 – Contagem de células (x10 ⁵) (cel. mL ⁻¹) no meio de cultivo da microalga <i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB1185) após adição do amido de mandioca catiônico.....	77
Tabela 13 – Medidas de pH no meio de cultivo da microalga <i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB1185) após adição do agente flocculante (amido de mandioca catiônico).....	79
Tabela 14 – Análise da variância (ANOVA) para variável resposta D.O. da microalga <i>C. vulgaris</i> (IPR-Chlv7123)	80
Tabela 15 – Análise da variância (ANOVA) para resposta em D.O da microalga <i>B. braunii</i> (UTEX 572).....	84
Tabela 16 – Análise da variância (ANOVA) para variável resposta D.O. da microalga <i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB1185)	87
Tabela 17 – Análise da variância (ANOVA) para resposta em D.O da microalga <i>B. braunii</i> (UTEX 572) no método da indução alcalina	90

Tabela 18 – Análise da variância (ANOVA) para resposta em D.O da microalga <i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB1185)	94
Tabela 19 – Análise da variância (ANOVA) para resposta em D.O da microalga <i>C. vulgaris</i> (IPR-Chlv7123)	98
Tabela 20 – Análise da variância (ANOVA) para resposta em D.O da microalga <i>B. braunii</i> (UTEX 572).....	102

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	OBJETIVO GERAL	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1	BIODIESEL	22
3.2	MICROALGAS	23
3.3	MICROALGAS E PLANTAS OLEAGINOSAS	26
3.4	SISTEMAS DE CULTIVO DE MICROALGAS	28
3.4.1	Sistemas Abertos de Cultivo	28
3.4.2	Sistemas Fechados	30
3.4.3	Sistemas Híbridos de Cultivos de Microalgas	30
3.5	FATORES DE CRESCIMENTO.....	31
3.5.1	Meio de Cultura	31
3.6	COLHEITA DAS MICROALGAS.....	32
3.6.1	Processos de Colheita por Flocculação	34
3.6.1.1	Influência dos flocculantes na qualidade da biomassa microalgas	39
3.6.2	Colheita por Centrifugação.....	41
3.6.3	Colheita por Filtração	41
4	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1	LOCAL DE REALIZAÇÃO EXPERIMENTOS	45
4.2	ESTIRPES UTILIZADAS	45
4.3	PREPARAÇÃO E TRATAMENTO DE VIDRARIAS.....	45
4.4	MEIO DE CULTIVO BBM E A PREPARAÇÃO DE PLACAS COM MEIO SÓLIDO	46
4.5	AMBIENTE DE CULTIVO	48
4.6	MANUTENÇÃO E PRODUÇÃO DE INÓCULO.....	48

4.7	SISTEMAS DE CULTIVO DE MICROALGAS PARA MAIOR PRODUÇÃO DE BIOMASSA	49
4.7.1	Sistema em Aquário	49
4.7.2	Fotobioreator em Formato Vertical e Tubular	50
4.8	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE LIPÍDEOS POR EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA.....	50
4.8.1	Cultivo das Microalgas para Análise de Lipídeos	51
4.9	PARÂMETROS ANALISADOS NOS EXPERIMENTOS DE CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL	52
4.9.1	Espectrofotometria	52
4.9.2	Contagem de Células	52
4.9.3	Determinação da Porcentagem de Eficiência da Floculação	52
4.9.4	Análise de pH	52
4.10	PROCEDIMENTO PARA SEPARAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DA BIOMASSA EM MEIO DE CULTIVO	53
4.10.1	Otimização dos Parâmetros de Centrifugação para Concentração de Biomassa de Microalgas <i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB1185), <i>C. vulgaris</i> (IPR- <i>Chlv</i> 7123) e <i>B. braunii</i> (UTEX 572).....	53
4.10.1.1	Cultivo de microalga da microalga <i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB1185) e da microalga <i>C. vulgaris</i> (IPR- <i>Chlv</i> 7123).....	53
4.10.1.2	Cultivo de microalga da <i>B. braunii</i> (UTEX 572)	53
4.10.2	Floculação com Amido de Mandioca Catiônico	54
4.10.2.1	Cultivo da microalga <i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB1185).....	55
4.10.2.2	Cultivo da microalga <i>C. vulgaris</i> (IPR- <i>Chlv</i> 7123)	56
4.10.2.3	Cultivo da microalga <i>B. braunii</i> (UTEX 572)	57
4.10.3	Experimento de Floculação por Indução Alcalina do pH	57
4.10.3.1	Cultivo de microalga <i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB1185).....	57
4.10.3.2	Cultivo de microalga <i>B. braunii</i> (UTEX 572)	58
4.10.4	Floculação com PAC - Policloreto de Alumínio	58
4.10.4.1	Cultivo da microalga <i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB1185).....	59
4.10.4.2	Cultivo da microalga <i>C. vulgaris</i> (IPR- <i>Chlv</i> 7123)	59
4.10.4.3	Cultivo da microalga <i>B. braunii</i> (UTEX 572)	60

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1	ANÁLISE DE CONCENTRAÇÃO DE LIPÍDEOS	61
5.2	CONCENTRAÇÃO DE MICROALGAS POR CENTRIFUGAÇÃO	62
5.2.1	Microalga <i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB1185).....	62
5.2.2	Microalga <i>C. vulgaris</i> (IPR- <i>Chlv</i> 7123)	65
5.2.3	Microalga <i>B. braunii</i> (UTEX 572).....	69
5.3	FLOCULAÇÃO DE MICROALGAS COM AMIDO DE MANDIOCA CATIONICO	72
5.3.1	Microalga <i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB1185).....	72
5.3.2	Microalga <i>C. vulgaris</i> (IPR- <i>Chlv</i> 7123)	80
5.3.3	Microalga <i>B. braunii</i> (UTEX 572).....	83
5.4	FLOCULAÇÃO DE MICROALGAS POR INDUÇÃO ALCALINA DO PH.....	86
5.4.1	Microalga <i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB 1185).....	86
5.4.2	Microalga <i>B. braunii</i> (UTEX 572).....	89
5.5	FLOCULAÇÃO DE MICROALGAS COM PAC - POLICLORETO DE ALUMÍNIO	93
5.5.1	Microalga <i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB1185).....	93
5.5.2	Microalga <i>C. vulgaris</i> (IPR- <i>Chlv</i> 7123)	97
5.5.3	Microalga <i>B. braunii</i> (UTEX 572).....	101
6	CONCLUSÕES	106
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

1 INTRODUÇÃO

Desde a revolução industrial, com o desenvolvimento de novas tecnologias produtivas e o alto consumo energético, houve um aumento drástico nos níveis de degradação ambiental, ocasionando problemas de diversas ordens para as populações em todo mundo.

A busca por independência energética leva países a desenvolver programas para produção de energia, muitas vezes utilizando matérias primas de uso na alimentação humana. Todavia este fato pode ocasionar aumentos de preços dos alimentos, pela diminuição de oferta para uma população cada vez maior e com um elevado consumo dos produtos alimentícios (GOLDEMBERG, 2006).

A geração de energia torna-se o combustível para alimentar os novos sistemas produtivos e o bem estar da população. Atualmente o homem explora em grandes proporções as fontes convencionais de energia, principalmente fundamentadas em fontes não renováveis, como os combustíveis fósseis, cujo esgotamento é previsível (VERTES et al., 2006; BRASIL, 2008).

O Biodiesel é uma alternativa energética que pode substituir o óleo diesel, usado em carros com motores ciclo diesel (caminhões, tratores, camionetas, automóveis etc.) e ou estacionários (geradores de energia, calor e outros) (RYAN, 2004). É uma alternativa energética limpa, renovável, que não compromete o funcionamento do motor, e a matéria prima para sua produção são fontes renováveis, como óleos vegetais e gorduras animais, que emitem menos poluentes de petróleo que o diesel para o ambiente (BRASIL, 2005).

O Brasil apresenta grandes vantagens para produção de biodiesel, pois se situa em região tropical, com altas taxas de luminosidade e temperaturas médias anuais elevadas, associadas à disponibilidade hídrica e regularidade de chuvas, que atribuem ao país elevado potencial para produção de energia através de fontes renováveis (BRASIL, 2005), incluindo as microalgas.

Justifica-se nesta proposta o cultivo de microalgas com alto teor de lipídeos visando a produção de matéria - prima que possa ser inserida na produção de biodiesel, tema este que vem sendo discutido e pesquisado mundialmente.

A colheita da biomassa das microalgas pela sua concentração diretamente do cultivo vem sendo estudada, utilizando-se de diversas técnicas como centrifugação, filtração, floculação e outras (SANDBANK et al., 1974; SHELEF

G., 1984; BILANOVIC et al., 1988; MOHN, 1988; PETRUŠEVSKI et al., 1995; OH et al., 2001; BOSMA et al., 2003; GRIMA et al., 2003; VANDAMME et al., 2010; UDUMAN et al., 2011; XU et al., 2011). Todavia, considerando que a eficiência da técnica varia conforme a espécie de microalga, justifica-se nesta proposta avaliar algumas destas técnicas para concentrar biomassa, utilizando o método de floculação em comparação com alguns métodos tradicionais, por exemplo, o de centrifugação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficiência de diferentes técnicas para concentração da biomassa celular em cultivo de microalgas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar e otimizar métodos de concentração da biomassa de microalgas.

Determinar o teor de lipídeos na biomassa das microalgas.

Analisar os resultados através do método de superfície de resposta.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIODIESEL

O biodiesel é o resultado da conversão de diferentes tipos de óleos e gorduras de origem vegetal ou animal em uma substância com viscosidade e características de combustão semelhantes às do diesel de petróleo. Isto se dá através de reação química de transesterificação entre triglicerídeos ou ácidos graxos e um álcool de pequena cadeia carbônica (geralmente, metanol ou etanol) (BRASIL, 2005).

De acordo com a Resolução n. 7, de 19/03/2008, da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), o biodiesel (B100) é um “combustível composto de alquilésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais”. Considerando também a Lei n. 11.097, de 13/01/2005, o biodiesel é definido como “um combustível para motores a combustão interna com ignição por compressão, renovável e biodegradável, derivado de óleos vegetais ou de gorduras animais, que possa substituir parcial ou totalmente o óleo diesel de origem fóssil” (BRASIL, 2008).

Atualmente, a produção de energia utilizando fontes renováveis é incentivada pelas nações, tendo a produção de biodiesel, no Brasil, recebido incentivo através do Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) que criou uma Rede de Pesquisa e Desenvolvimento denominada de PROBIODIESEL (NAE, 2005), com o objetivo de viabilizar a produção de misturas com 5% de biodiesel (B5) até 2005, passando para 10 % de biodiesel (B10) até 2010 e com 20% de éster (B20) até 2020 (NAE, 2005).

O Biodiesel é uma alternativa energética que pode substituir o óleo diesel, usado em carros com motores ciclo diesel (caminhões, tratores, camionetas, automóveis etc.), e ou estacionários (geradores de energia, calor e outros). É uma alternativa energética limpa renovável e que não compromete o funcionamento do motor (BRASIL, 2005).

O biodiesel, além de ser um combustível renovável e biodegradável se comparado ao diesel de petróleo, emite uma menor quantidade de monóxido de carbono (CO), hidrocarbonetos totais HC, material particulado (MP), e óxidos de enxofre (SOX) por ocasião de sua combustão (NAE, 2005).

O consumo de biodiesel no Brasil, em 2011, foi de 2,6 bilhões de litros, o que representa um aumento de 3,3% em relação a 2010. A principal matéria-prima utilizada em sua produção foi à soja, representando 80,6% do total de biodiesel produzido (BRASIL, 2011). Entretanto a soja é uma oleaginosa nobre, destinada ao consumo humano e animal, e sua aplicação para a produção de energia combustível pode levar a um aumento no seu preço de venda, penalizando consumidores de baixo poder aquisitivo. De acordo com este cenário, torna-se de grande importância pesquisas para obtenção de matérias primas oleaginosas para compor a cadeia de produção de biodiesel.

3.2 MICROALGAS

As microalgas são consideradas um dos organismos mais antigos da Terra, existindo há aproximadamente 3,5 bilhões de anos. Têm sido reconhecidas como os organismos que deram origem a todos os outros vegetais existentes e, possivelmente, foram as responsáveis pela produção e pelo acúmulo de O₂ na atmosfera primitiva, desempenhando, ainda hoje, papel importante na manutenção dos níveis desse gás (RAVEN, 2001). Os termos microalgas (algas com dimensões microscópicas) e macroalgas (com dimensões macroscópicas) designam organismos unicelulares e multicelulares, com hábitos planctônicos e bentônicos, porém, muito distantes entre si quanto à origem, composição química e morfologia (LOURENÇO, 2006).

Microalgas são microrganismos que apresentam clorofila e outros pigmentos fotossintéticos, mas sua caracterização implica em uma série de fatores determinantes para descrição taxonômica (HOEK, 1995).

A composição bioquímica das células de microalgas apresentam-se diversificada com relação ao conteúdo de carboidratos, proteínas, lipídeos, etc., variando de acordo com a espécie, com o meio de cultura utilizado, e com os fatores relacionados ao ambiente do cultivo (XU et al., 2006).

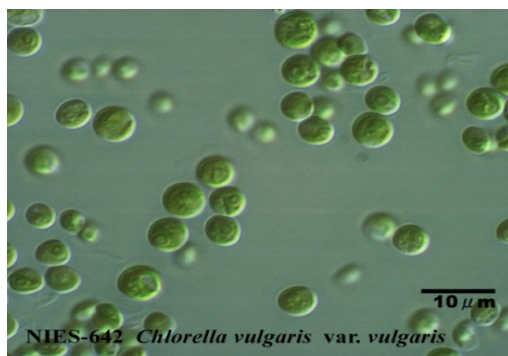
As algas e microalgas de interesse para a produção de bicompostíveis integram um gigantesco universo de micro-organismos fotoautotróficos aquáticos-terrestre ou marinhos, geneticamente subdividido em eucarióticos (unicelulares, às vezes formando agregados maiores e pluricelulares) e

também as Eubactérias e Archeobactérias (procarióticas) (CHACÓN-LEE; GONZÁLEZ-MARIÑO, 2010).

A diversidade das microalgas é grande, entretanto nesta revisão da dissertação será destacado apenas a descrição geral das espécies estudadas: *Chlorella vulgaris*, *Neochloris oleoabundans* e *Botryococcus braunii*. A *C. vulgaris* é uma espécie presente em ambientes de águas continentais (doce e salobras), gênero pertence de algas verdes unicelulares do filo: chlorophyta, gênero: *Chlorella* e espécie: *C. vulgaris* (Figura 1) (DUARTE, 2010).

Apresenta formato esférico, com tamanho de cerca de 2 a 10 μm e não apresenta flagelo. Contem pigmentos fotossintetizantes clorofila a e b em seu cloroplasto.

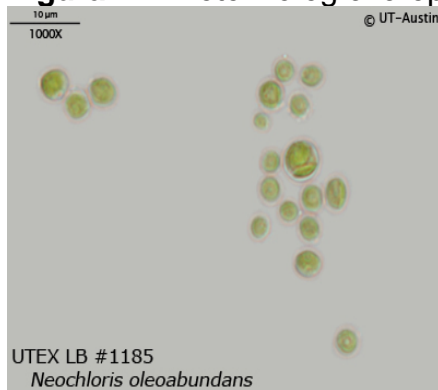
Figura 1 – Fotomicrografia óptica de células da microalga *C. vulgaris*.



Fonte: NIES. http://meddic.jp/Chlorella_vulgaris

A microalga *N. oleoabundans* pertence à classe *Chlorophyceae* e família *Chlorococcaceae* presente em ambientes de água doce, tamanho de 2 a 5 μm , em determinadas condições de cultivo apresenta um teor de lipídeos em torno de 57%, sendo uma espécie com alto potencial para produção de biodiesel (Figura 2) (GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009).

Figura 2 – Fotomicrografia óptica de células da microalga *N. oleoabundans*.



Fonte: UTEX. <http://web.biosci.utexas.edu/utex/algaeDetail.aspx?algaeID=3623>

A microalga *B. braunii* é uma espécie pertencente as algas verdes (Chlorophyceae) que cresce formando colônias irregulares com dimensões de 30 a 500 μm , constituídas por células elípticas embebidas numa matriz mucilagínosa (Figura 3).

Esta espécie de microalga apresenta o potencial de sintetizar e armazenar elevado conteúdo em hidrocarbonetos entre 30 a 70% da sua biomassa seca (SAWAYAMA et al., 1994). Apresenta vasta distribuição em corpos de água continentais e lagos de água doce ou salobra em zonas temperadas, alpinas e tropicais (WOLF, 1983; LI; QIN, 2005).

Figura 3 – Fotomicrografia óptica de células da microalga *B. braunii*.



Fonte: UTEX. <http://www.sbs.utexas.edu/utex/algaeDetail.aspx?algaeID=3050>

3.3 MICROALGAS E PLANTAS OLEAGINOSAS

As microalgas podem ser consideradas as formas mais primitivas das plantas. Embora possuam mecanismo fotossintético muito semelhante, geralmente são conversores mais eficientes de energia solar por apresentarem estrutura celular simples (CHACÓN-LEE; GONZÁLEZ-MARIÑO, 2010).

Dos organismos fotossintetizantes, as microalgas são mais eficientes no uso do CO₂ do que as plantas superiores, podendo fixar grandes quantidades de CO₂ por superfície de exposição (BROWN; ZEILER, 1993). A demais, pelo fato as células crescerem em suspensão aquosa têm mais acesso à água, CO₂ e nutrientes (GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009).

Por estas razões, as microalgas são capazes de produzir 30 vezes a quantidade de óleo por unidade de área se comparadas com plantas oleaginosas terrestres (SHEEHAN et al., 1998). São capazes de armazenar grandes quantidades de moléculas de lipídeos e hidratos de carbono que representam a matéria prima para produção de vários bicomcombustíveis.

Tabela 1 – Comparação da produção de óleo por microalgas com cultivos de plantas oleaginosas.

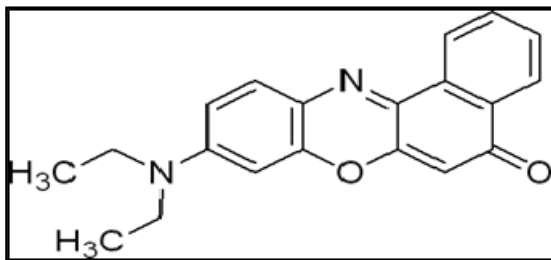
Espécies Oleaginosas	Teor de óleo (%)	Rendimento de óleo (L óleo/ha ano)	Produtividade em Biodiesel (kg biodiesel/ha ano)
Milho (<i>Zea mays L.</i>)	44	172	152
Soja (<i>Glycine max L.</i>)	18	636	562
Pinhão manso (<i>Jatropha curcas L.</i>)	28	741	656
Camelina (<i>Camelina sativa L.</i>)	42	915	809
Canola (<i>Brassica napus L.</i>)	41	974	862
Girassol (<i>Helianthus annuus L.</i>)	40	1070	946
Mamona (<i>Ricinus communis</i>)	48	1307	1156
Dendê (<i>Elaeis guineensis</i>)	36	5366	4747
Microalga (baixo teor de óleo)	30	58,700	51,927
Microalga (médio teor de óleo)	50	97,800	86,515
Microalga (alto teor de óleo)	70	136,900	121,104

Fonte: Mata et al. (2010).

Um dos métodos para determinação do teor de lipídeos em microalgas é a espectroscopia de fluorescência, a qual avalia a intensidade de

fluorescência em comprimento de onda específico para determinar o teor lipídico em microalgas (COOKSEY et al., 1987). No ensaio é utilizado o corante vermelho do Nilo (Figura 4) que é seletivo para lipídeos neutros, hidrofóbico e fluorescente. Algumas vantagens no uso desta técnica estão no tempo reduzido de análise, alta sensibilidade, uso de pequena quantidade de amostra e de solvente atóxico.

Figura 4 – Estrutura química do vermelho do nilo (7-diethylamino-3,4-benzophenoxazine-2-one).



Fonte: <http://2007.igem.org/wiki/index.php/Paris/PROTOCOLS>

Por conter substituintes polares em seus anéis aromáticos, o vermelho do nilo apresenta espectros de emissão bastantes sensíveis na identificação de lipídeos pela técnica de fluorescência e conforme o solvente utilizado, apresenta variações em seu rendimento quântico. A intensidade relativa de fluorescência do vermelho do nilo é semelhante aos solventes apolares, mas diminui cerca de 40 vezes na água (GREENSPAN; FOWLER, 1985).

3.4 SISTEMAS DE CULTIVO DE MICROALGAS

Os cultivos de microalgas, em altas densidades e volumes, começaram a ser desenvolvidos a partir de 1940, com domínio de técnicas para o isolamento e composição do meio de cultivo das microalgas. Estes experimentos foram conduzidos de forma independente em países como Estados Unidos, Alemanha e Japão. Praticamente todos os estudos desta época envolviam uma microalga bastante popular entre os pesquisadores, a *Chlorella*, por apresentar características rústicas e de fácil cultivo, sendo utilizados dois tipos básicos de sistemas: de forma aberta em lagoas e fechado em fotobiorreatores (LOURENÇO, 2006). A maioria das microalgas cultivadas comercialmente se desenvolvem em

ambientes seletivos, como alta alcalinidade, disponibilidade de nutrientes, alta salinidade (RICHMOND, 2004).

A biomassa produzida nos sistemas de cultivo aberto e fechado é destinada principalmente para uso na alimentação e na aquicultura. Vários gêneros de microalgas são assim cultivados como: *Isochrysis*, *Pavlova*, *Nannochloropsis*, *Tetraselmis*, *Chaetoceros* etc. (RICHMOND, 2004).

3.4.1 Sistemas Abertos de Cultivo

Atualmente existe uma variedade de sistemas abertos com desenhos diferentes variando em tamanho, material, tipo de construção, de agitação e inclinação. São classificados como extensas lagoas rasas sem homogeneização estática, lagoas circulares ocorrendo a presença de braço giratório, lagoa em pista misturadas com pás giratórias (Figura 5), e sistemas inclinados formando uma camada fina de espelho de meio de cultivo em forma de cascata. (BOROWITZKA, 1999).

Figura 5 – Lagoa em pista para cultivo de microalgas.



Fonte: Ciência e Cultura.
<http://cienciaecultura.bvs.br/pdf/cic/v60n2/a03v60n2.pdf>

Esta forma de cultivo de microalgas apresenta menores custos de construção e operação se comparados com sistemas fechados de fotobiorreatores. Por esta razão a maioria dos produtores optam por esta forma de cultivo, apesar de

apresentarem desvantagens quando relacionado a contaminação com outros micro-organismos no sistema (representando uma limitação).

A maioria dos sistemas abertos apresenta sistema de homogeneização - um exemplo são as pás giratórias - pois o cultivo deve ser misturado movendo as microalgas da parte inferior do tanque para parte superior, maximizando a quantidade de luz que as células recebem (RICHMOND, 2004).

Os sistemas de forma aberta operam em uma profundidade em torno de 20-30 cm, pois a energia luminosa deve abranger todo conteúdo celular disposto no cultivo. A profundidade também pode ser uma limitação, pois se a pista ou lagoa apresentar uma deficiência de homogeneização do cultivo ou hidráulica a superfície da lagoa estará exposta a maiores intensidades luminosas enquanto que a parte inferior do cultivo não vai estar exposta a mesma intensidade luminosa, causando uma disparidade no cultivo (CHISTI, 2007).

3.4.2 Sistemas Fechados

São classificados como reatores em forma de torre, placa, tubos, sacos ou tanques de forma fechada. Construídos de vidro, tubos de Teflon transparente, ou tubos de PVC transparente, são organizados em retas paralelas ou helicoidalmente enrolados ao redor de um suporte central (TORZILLO et al., 1993).

O sistema na forma de torre consiste em cilindros verticais, geralmente construído em acrílico ou fibra de vidro, muito utilizado na produção de rações para aquicultura. Um outro sistema bastante utilizado é composto por bolsas plásticas transparentes, suportadas por estrutura de metal, podendo ser apoiados ou pendurados nessa estrutura (CHISTI, 2007).

Sistemas de fotobiorreatores fechados em forma de placas podem ser construídos com materiais que variam desde tanques de vidro e acrílico, até estruturas de metal que possuem uma camada fina de sacos plásticos ou painéis alveolares com divisórias internas (QIANG et al., 1998).

A circulação do meio de cultivo é realizada por, injeção de ar por compressor. O controle de temperatura é realizado por trocadores de calor ou resfriamento evaporativo por aspersão de água sobre a superfície do reator. Geralmente a refrigeração deve acontecer durante o dia.

Alguns fotobiorreatores foram construídos em estufa, para controle de temperatura. Um dos primeiros grandes fotobiorreatores tubular tinha os tubos flutuando em uma piscina grande para controle de temperatura (RICHMOND, 2004).

Uma das vantagens citadas dos sistemas de cultivo de microalgas em fotobiorreatores do tipo "fechado" é a capacidade de eliminar contaminação. No entanto, é impossível manter um grande sistema livre de contaminação. Uma das técnicas para esterilização dos fotobiorreatores é o uso de vapor de água, sendo possível também utilizar a esterilização química (RICHMOND, 2004).

3.4.3 Sistemas Híbridos de Cultivos de Microalgas

São sistemas de cultivo utilizando a combinação de sistemas aberto e fechado, sendo que no fotobiorreator de sistema fechado cabe a produção de inóculo inicial do cultivo com alta densidade de células que será disponibilizado para um sistema aberto. Este conceito tem sido empregado para produção de astaxantina em *Haematococcus pluvialis* no Havaí, porém ainda apresentam altos custos - capital e operacional - para produção de biomassa microalgal (GROBBELAAR, 2000; OLAIZOLA, 2000).

3.5 FATORES DE CRESCIMENTO

O crescimento das microalgas está relacionado diretamente às condições de cultivo, desta forma pode-se direcionar a produção de determinados compostos em um sistema de qualquer. Dentre os fatores que podem influenciar no crescimento podemos citar: pH, luminosidade, presença de contaminantes, temperatura, aeração, presença de íons bicarbonato, fonte de nitrogênio, tipo de biorreator, idade do inóculo, concentração inicial de biomassa, densidade populacional (LOURENÇO, 2006).

O meio cultivo influencia diretamente no crescimento celular, bem como na composição bioquímica da estirpe cultivada, sendo os elementos nutritivos mais importantes o carbono, nitrogênio, fosfato, sais de magnésio, potássio e cálcio. Microelementos como manganês e cobalto e as fontes de carbono como os carboidratos ou CO₂ (RICHMOND, 2004).

A fonte de carbono que contribui para o crescimento fotossintético e autotrófico das microalgas é o dióxido de carbono. Na atmosfera terrestre existem 0,03% de CO₂, desta forma se faz necessária adição de CO₂ em alguns sistemas de cultivo (LOURENÇO, 2006).

3.5.1 Meio de Cultura

Meios de cultura são as fontes dos elementos constituintes dos organismos em cultivo, os quais são estimulados a crescer exatamente pelo oferecimento dos componentes presentes nos meios. Pode ser definido como o ambiente específico e finito que contém os nutrientes e elementos necessários para o desenvolvimento de vegetais, animais e micro-organismos em cultivo (LOURENÇO, 2006). O meio de cultivo utilizado neste trabalho foi o meio BBM (*Bold Basal Medium*) (BOLD, 1949), indicado e utilizado no cultivo de microalgas de água doce.

3.6 COLHEITA DAS MICROALGAS

No geral, os sistemas e ambientes de cultivos das microalgas são aquosos, consistindo de nutrientes e aeração com O₂ e/ou CO₂ nas proporções adequadas para cada espécie ou estirpe. Um dos aspectos importantes no cultivo em grande escala de microalgas é a concentração de células na etapa de retirada da biomassa do meio de cultura. O alto custo da colheita e secagem apresenta grandes desafios para a utilização comercial das microalgas, principalmente para os cultivos destinados à produção de biocombustíveis (BOROWITZKA, 1992; FON SING et al., 2011).

Estudos relativos ao cultivo de microalgas em larga escala concordam em um ponto: não existe um método de colheita universal para resolver todos os problemas de recuperação da biomassa. Desde o início das pesquisas sobre cultivo de microalgas em larga escala, o custo mínimo estimado para o processo de colheita é de 20% a 30% do valor total do custo da produção (GRIMA et al., 2003).

A recuperação da biomassa de microalga representa um problema importante, pois as células tem tamanho relativamente pequeno, variando entre 2 e

30 μm de diâmetro. Outro problema é a taxa de diluição da cultura, que na maioria das vezes está em torno de 0,5 kg de massa seca por m^3 de cultivo, nos cultivos abertos em escala comercial. A colheita ou a separação da fração sólida do líquido pode ser executada por centrifugação, filtração e até por sedimentação. Todos estes procedimentos podem ser precedidos por uma etapa denominada de floculação.

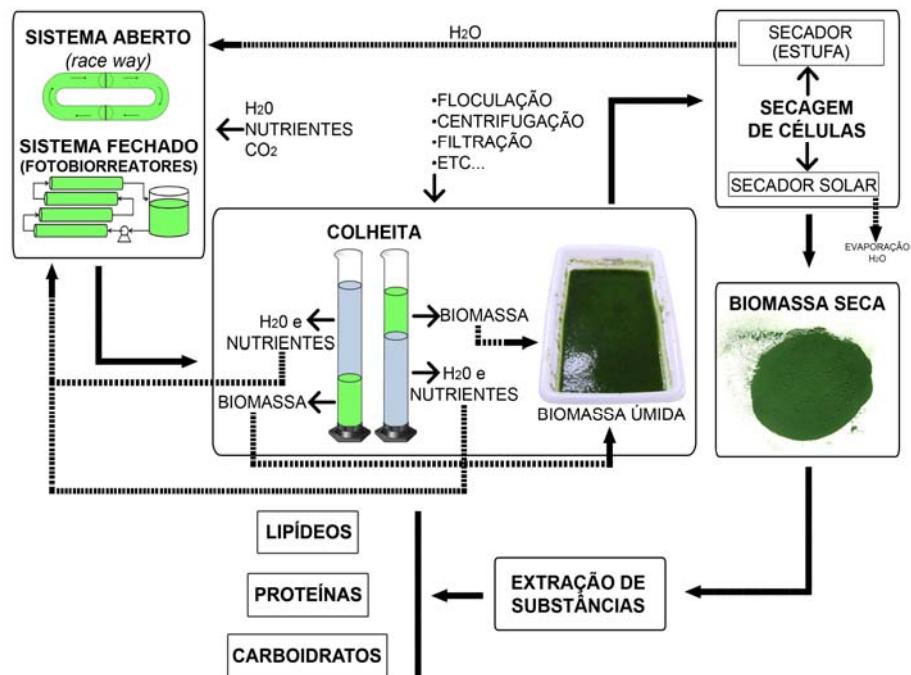
Métodos efetivos e práticos na concentração das células suspensas em meio líquido são a coagulação e floculação.

A coagulação consiste na desestabilização das partículas coloidais suspensas, realizada pela conjunção de ações físicas e reações químicas, com duração de poucos segundos. Usualmente, processos de tratamento de água utilizam sais de alumínio ou de ferro como coagulantes, já que em solução aquosa os íons metálicos de ferro e de alumínio, positivamente carregados, formam fortes ligações com átomos de oxigênio (LIBANIO, 2010; RICHTER et al., 2003).

Os agentes coagulantes podem coordenar até seis moléculas de água ao seu redor, liberando os átomos de hidrogênio e desta forma aumentando a concentração do íon H^+ e reduzindo o pH da suspensão. Este processo é denominado de hidrólise e os produtos formados constituem as espécies hidrolisadas de ferro e alumínio, que podem precipitar como hidróxidos dependendo da dosagem utilizada (LIBANIO, 2010; RICHTER et al., 2003).

Em seguida, com a aproximação e colisão das partículas desestabilizadas, ocorre a formação de flocos os quais podem ser removidos por sedimentação, flotação ou filtração. Assim, a coagulação em cultivos de microalgas é conhecida por relacionar-se com o pH do meio de cultivo (HORIUCHI et al., 2003).

Figura 6 – Diagrama esquemático do processo de colheita de microalgas em sistemas de cultivos abertos e fechados.



Fonte: Silva e Nomura (2012).

O conceito de colheita de biomassa da microalga compreende a separação sólido-líquido no cultivo, a fim de remover grandes volumes de água do sistema e grandes quantidades de biomassa da microalga. Este método pode envolver uma ou mais etapas física, química ou biológica (MATA et al., 2010). Considerando que ainda não existe um método de colheita de microalgas reconhecido como melhor ou mais adequado, este é um campo da pesquisa bastante ativo, com possibilidades de desenvolvimento de um sistema de colheita sustentável para a maioria das espécies de microalgas (RICHMOND, 2004). Além disso, cada sistema de produção exige um processo otimizado de colheita que considere todas as características do organismo e as etapas de processamento que seguem a colheita (GUDIN; CHAUMONT, 1991).

Os principais fatores que influenciam um processo eficiente de colheita das microalgas incluem: 1) morfologia celular, por exemplo: o formato, (células esféricas, em cadeias ou filamentos), o tamanho (geralmente entre 2 a 30 μm), peso específico, carga de superfície (geralmente negativo) (FON SING et al., 2011), 2) forma de cultivo da microalga; 3) método de colheita escolhido (filtração,

centrifugação, floculação, sedimentação, etc.); 4) o custo e eficiência do processo; 5) a aplicação final da biomassa microalgal.

3.6.1 Processos de Colheita por Floculação

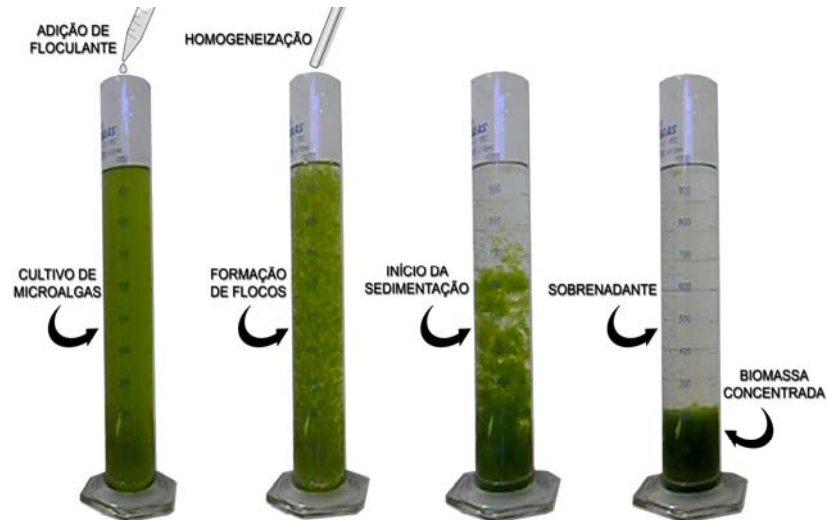
O processo de colheita geralmente é feito por sedimentação, centrifugação ou filtração, muitas vezes necessitando como primeiro passo a floculação das microalgas.

A colheita de células de microalgas diretamente por floculação é o processo mais conveniente dentre os métodos tradicionais, tais como centrifugação e filtração, pois permite o tratamento de grandes volumes de cultivo microalgal. Uma grande variedade de produtos químicos são estudados como agentes floculantes para microalgas (LEE et al., 1998).

A floculação utilizando produtos químicos é aplicada na remoção de algas em lagoas de tratamento de resíduos industriais e aplicações no tratamento de água (RICHTER, 2003; LIBÂNIO, 2010).

Os processos principalmente considerados para concentrar as microalgas são floculação seguida de flotação ou sedimentação da biomassa, e esses têm sido o tema de estudo em várias pesquisas (Figura 7) (LEE et al., 2009). A floculação consiste na remoção da capacidade das células se manterem em suspensão, ou na estimulação da agregação para formação de flocos que podem decantar ou flotar. Esta técnica é viável para recolher biomassa em qualquer sistema de cultivo aberto ou em fotobioreatores fechados, e bastante adequada em sistemas de grande porte (LOURENÇO, 2006).

Figura 7 – Processo de floculação e sedimentação utilizando floclantes.



Fonte: Silva e Nomura (2012).

A floculação espontânea pode se desenvolver em cultivos de microalgas de forma imprevisível, como resultado do processo denominado biofloculação. A biofloculação consiste na agregação natural das células, supostamente por decorrência de propriedades adesivas de carboidratos algáceos extracelulares, gerando flocos derivados de muitas células. Nos processos não controlados que acarretam na mudança de pH do meio de cultivo, a agregação das células é mais comum. Já na floculação induzida, podem ser realizadas técnicas como a eletrofloculação, eletrólise da água, e utilização de floclantes químicos ou orgânicos.

Os processos de agrupamento das células para floculação utilizando produtos químicos reduzem a carga da superfície celular e induzem ao agrupamento das células, que sedimentam e flotam. O processo de floculação com base na manipulação de pH é muito utilizado na aquicultura, onde ajuste de pH entre 11 e 12, proporcionam eficiência de floculação acima de 80% (RICHMOND, 2004).

A floculação é um processo que envolve alguns custos, como o uso de floclantes químicos, e podem esses gerar contaminação da biomassa, o que requer cuidados para evitar danos e alterações químicas significativas no produto final. Além disso, o efluente também pode ser contaminado dependendo do floclante empregado, o que pode ser uma desvantagem associada ao sistema (LOURENÇO, 2004).

Para reduzir custos, a floculação pode ser alcançada através da utilização de flocculantes orgânicos, tais como quitosana ou amidos, e flocculantes inorgânicos como sulfato de alumínio $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ cloreto férrico (FeCl_3), sulfato férrico ($\text{Fe}(\text{SO}_4)_3$) e a cal (CaO), um óxido forte produzido a partir de (CaCO_3). (VANDAMME et al., 2010; PAPAZI; KOTZABASIS, 2007; KNUCKEY et al., 2006; PAPAZI et al., 2010).

Os flocculantes a base de polímeros catiônicos bioflocculantes neutralizam as cargas negativas da superfície das células e modificam as interações eletrostáticas repulsivas, induzindo a agregação das células. As propriedades importantes de um flocculante polimérico são as seguintes: peso molecular, a densidade de carga e a configuração da sua estrutura. A concentração do agente flocculante, portanto, corresponde a uma situação onde a superfície das células em meio de cultivo é parcialmente coberto por manchas de polímeros catiônicos (RICHMOND, 2004).

Assim, células carregadas negativamente quando entram em contato com polímeros catiônicos são submetidas a uma inversão de cargas que reduz a força de repulsão entre as células. Os polímeros adsorvidos, devido ao seu tamanho, são capazes de formar uma ligação entre as células e sua união, e a floculação (RICHMOND, 2004).

Os polímeros orgânicos catiônicos podem induzir a floculação eficiente de microalgas de água doce em baixas concentrações, entre 1 e 10 mg l^{-1} . Por outro lado, cultivos de microalgas de ambientes marinhos com elevada salinidade ocorre inibição da floculação com polieletrólitos, que devido a alta força iônica dos cultivos, o polímero é reduzido para suas menores dimensões, reduzindo assim a ligação entre as células de microalgas (BILANOVIC et al., 1988).

De acordo com (RICHMOND, 2004) a eficiência do processo da floculação ocorre em função de vários fatores, incluindo:

- (I) O peso molecular do Flocculante: quanto maior for o peso molecular, melhor a ligação entre células e o flocculante.
- (II) A densidade da carga do Flocculante: quanto maior for a densidade de carga, mais estendida a conformação molecular e a neutralização de cargas das células.
- (III) A concentração de Flocculante: sobredosagem pode conduzir à estabilização das células.

(IV) A concentração de células no meio de cultivo: quanto maior a concentração de células, maior a frequência de colisão e maior a taxa de floculação.

A técnica de floculação utilizada deve ser compatível com a necessidade de reciclar a água para o sistema de crescimento sem que haja necessidade de um pré-tratamento complexo da mesma.

Métodos de floculação que estão sendo explorados incluem autofloculação, no qual as células das microalgas são induzidas por elevação do pH, devido a captação de CO₂ para a fotossíntese (SHELEF et al., 1984; SUKENIK et al., 1988; YAHI et al., 1994), a biofloculação com bactérias ou outras espécies de microalgas (EISENBERG et al., 1981; OH et al., 2001; LEE, et al., 2009).

A biofloculação com micro-organismos foi descrita por (LEE et al., 2009) onde foi realizada a colheita da microalga marinha *Pleurochrysis carterae* com a utilização de micro-organismos produtores de polímeros extracelulares, estes micro-organismos foram cultivados em fonte de carbono orgânico (acetato, glicose, ou glicerina), como substrato para o crescimento in situ. Sob estresse, devido ao esgotamento de nutrientes, esses micro-organismos produzem de forma extracelular substâncias poliméricas capazes de promover a floculação. A eficiência de recuperação média é em torno de 90% e a vantagem desse método é que não causa danos à integridade das células de microalgas, fazendo com que o comportamento da floculação e sedimentação seja previsível, confiável e de baixo custo. As fontes de carbono utilizadas no crescimento dos micro-organismos produtores de polímeros, no caso de acetato e glicerol, podem ser produzidos como co-produtos da produção de biodiesel.

Métodos como electrofloculação também são utilizados para concentrar microalgas, e consistem no uso de eletrodos de ferro ou alumínio ou muitas vezes em aço inoxidável, e reativos e que são ligados diretamente a uma fonte de alimentação de energia. Estes eletrodos são colocados em frações de cultivo de microalgas, que produzem a coagulação das microalgas, pois o eletrodo libera íons de alumínio ou ferro que reagem com a água do cultivo, formando hidróxidos metálicos carregados positivamente. Por sua vez estes hidróxidos metálicos, se ligam a superfície negativa das células de microalgas e desestabilizam a suspensão microalgal por neutralização da carga, formando flocos que podem

decantar ou flotar.(SANDBANK et al., 1974; UDUMAN et al., 2011; VANDAMME et al., 2011).

De acordo com (UDUMAN et al., 2011) as vantagens deste processo estão relacionadas ao baixo custo de operação e por não utilizar produtos químicos para concentrar a biomassa, o que evita a utilização de ânions à base de cloro ou sulfato. É uma técnica segura, seletiva e muitas vezes rentável com eficiência em torno de 98 % para *Tetraselmis sp.* e *Chlorococccum sp.*, e possui como principais desvantagens a substituição regular do ânodo e a possível contaminação da biomassa pelos metais liberados no processo.

Vandamme et al. (2011) obtiveram eficiência acima de 80% de concentração de biomassa das microalgas *C. vulgaris* e *Phaeodactylum tricornutum*, sendo que a eficiência deste processo com a utilização de ânodo alumínio pode ser significativamente melhorada através da redução do pH inicial e aumentando a agitação do cultivo.

O método de eletrofloculação integrado com dispersão de ar para flotação foi desenvolvido para colheita *B. braunii*. A eficiência de recuperação de *B. braunii* atingiu 93,6% após 30 minutos utilizando eletrodo de alumínio, através de um processo de eletrofloculação sendo que a recuperação das microalgas melhorou significativamente quando o processo eletrofloculação foi integrado com ar disperso para flotação, aumentando a eficiência de recuperação de *B. braunii* para 98,9% após 14 minutos (XU et al., 2010).

De acordo com Bosma et al. (2003) é possível realizar a colheita e separação das microalgas com utilização do ultra-som. Neste processo onde os micro-organismos são continuamente bombeados dentro de uma câmara de ressonância, que consiste num transdutor e um refletor, sendo o tamanho da câmara e a frequência de operação é definida de modo que ocorra uma onda estacionária. Em funcionamento o aparelho gera campos ultrasônicos com níveis altos e baixos de energia potencial, e desta forma promove a aglomeração das células. O efeito de interação entre as células resulta da ação de uma força de atração entre as células, que as leva para pontos de encontros das ondas ultra-sônica, formando um aglomerado. Em seguida, o campo de ultra-sons é anulado e estes aglomerados maiores sedimentam rapidamente. As vantagens desta técnica de separação em comparação com os processos convencionais são: não gera cisalhamento das células, opera em forma contínua, e possui ausência de falhas mecânicas sendo

uma técnica não- incrustante e com eficiência em torno de 90% de concentração de biomassa.

A separação magnética é um método rápido e simples para concentração de microalgas utilizando Fe_3O_4 e outras partículas magnéticas (BITTON et al., 1975; XU et al., 2011).

De acordo com Xu et al. (2011), o método de separação magnética consiste na mistura de nanopartículas de Fe_3O_4 no cultivo de microalga, e após um tempo de agitação e homogeneização submete-se o cultivo a um ímã na parte inferior dos frascos, formando um campo magnético. As microalgas utilizadas por estes autores foram *B. braunii* e *Chlorella ellipsoidea*, e foram analisados os parâmetros relacionados a adsorção e concentração de nanopartículas, o pH do cultivo e a velocidade de agitação. Nestes experimentos foram utilizados cultivos de 250 mL, onde as células são carregadas junto com as nanopartículas, e ocorre a separação das microalgas em meio de cultivo. A eficiência de recuperação de ambas *B. braunii* e *C. ellipsoidea* alcançada foi acima de 98% dentro de 1 min. e o mecanismo de adsorção foi considerado como sendo principal devido à atração eletrostática entre as nanopartículas magnéticas e células de microalgas. As vantagens deste processo estão relacionadas ao baixo custo de funcionamento, a economia de energia e a fácil operação.

3.6.1.1 Influência dos Flocculantes na Qualidade da Biomassa Microalgas

O processo de colheita das culturas de microalgas é um fator de grande importância que pode influenciar no custo da produção e na qualidade dos produtos finais.

Microalgas possuem cargas negativas, que impedem a agregação e mantêm as células em suspensão. Os flocculantes agem sobre a superfície celular, neutralizando as cargas da parede celular da microalga, o que resulta na agregação e decantação de células no cultivo (BORGES et al., 2011).

A flocculação é o processo de colheita mais conveniente, pois permite a manipulação de grandes volumes de cultura das microalgas, com baixos custos de energia. Além disso, as células concentradas por flocculação estão em melhor condição física do que aquelas manipuladas por centrifugação ou filtração, pois à

manutenção da integridade celular é muito importante para a preservação dos metabólitos produzidos (KNUCKEY et al., 2006).

Floculantes inorgânicos produzidos a base de ferro e alumínio, são eficazes para floculação de microalgas, mas normalmente estes agentes proporcionam contaminação da biomassa com metais e produzem efluentes tóxicos (GRIMA et al., 2003).

Floculantes orgânicos, tais como a quitosana, são biodegradáveis e muitas vezes são utilizados em baixas concentrações (SINGH et al., 2000). No entanto, apresentam altos custos (HARITH et al., 2009).

Polímeros aniônicos se ligam às superfícies negativas. Apesar de repulsão eletrostática, ocorre a presença de íons que agem como pontes entre o polímero e as células (BOLTO; GREGORY, 2007), possibilitando a agregação.

Apesar de todas as vantagens dos floculantes, atualmente esta linha de pesquisa está em crescimento havendo poucas informações disponíveis sobre o possível efeito destes elementos sobre a quantidade e qualidade dos lipídeos extraídos das microalgas.

De acordo com (BORGES et al., 2011), floculantes aniônicos e catiônicos, à base de poliacrilamida, não interferem no porcentual lipídico da microalga *Nannochloropsis oculata* e *Thalassiosira weissflogii*. Resultado semelhante foi descrito por (LEE et al., 1998) utilizando a microalga *Botryococcus braunii*. No entanto, (BORGES et al., 2011) argumentam que a utilização destes floculantes podem ocasionar alterações na composição dos ácidos graxos.

3.6.2 Colheita por Centrifugação

A colheita de microalgas por centrifugação é uma técnica bem sucedida em escala de laboratório, quando pequenos volumes de biomassa são produzidos. É um processo simples que pode algumas vezes ser aplicado para concentração da biomassa sem adição de produtos químicos, conservando suas características originais (LOURENÇO, 2006).

A centrífuga é basicamente um tanque de sedimentação com maior força gravitacional para aumentar a taxa de sedimentação (CHISTI, 2007).

Uma das vantagens do processo de centrifugação é que tornaram esta operação uma das principais opções na separação de biomassa de microalgas

está relacionada a fácil limpeza e disponibilidade de máquinas esterilizáveis, visando manter a biomassa sem alterações em suas características pela influência de contaminantes (RICHMOND, 2004).

Porém, para cultivos em grande escala, a utilização de centrifugação necessita altos investimentos para a aquisição do equipamento, e envolve gastos de energia significativos. Além disso, esse processo pode acarretar perdas de células após a agregação das mesmas no fundo dos tubos, e depende muito da espécie cultivada, da densidade celular, da força centrífuga agregada e do volume. Em escalas comerciais, esta técnica não se torna viável pelo alto gasto de energia envolvido no funcionamento do sistema, e pela dificuldade em processar grandes volumes de cultivo. O consumo de energia para sedimentação de células por centrifugação tem sido estimado em 8 kWh m^{-3} de suspensão microalgal (GRIMA et al., 2003; VANDAMME et al., 2011).

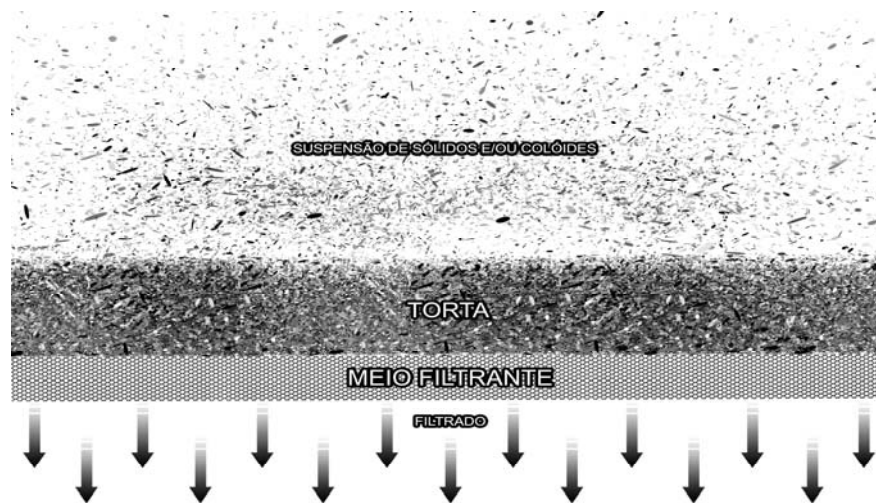
3.6.3 Colheita por Filtração

Filtração é a operação pela qual se separa um sólido de um líquido mediante um meio poroso, que retém a fração sólida e deixa passar a fração líquida. O meio filtrante pode ser composto de papel, tecido ou um sólido poroso, como cerâmica ou uma camada fina de areia, como representado na Figura 8.

A escolha da composição do filtro ou malha regular depende do uso que será dado ao material filtrado e das dimensões da espécie em cultivo. Os filtros podem apresentar diversas composições, como microfibras de vidro, acetato de estireno, celulose regenerada, etc., com diâmetros de 47 nm; 25 nm; 13 nm; etc. e tamanho dos poros $1,2 \mu\text{m}$; $0,7 \mu\text{m}$; $0,45 \mu\text{m}$; $0,22 \mu\text{m}$ etc (LOURENÇO, 2006).

O tamanho dos poros dos filtros frequentemente é um pouco maior que o diâmetro médio das partículas a serem separadas, para que desta forma não ocorra o bloqueamento dos poros por uma única partícula e aumento da resistência hidráulica rapidamente. Entretanto, se por um lado a filtração inicial utilizando filtros com poros maiores seria um pouco ineficiente, por outro lado estes poros poderiam ser bloqueados por conjuntos soltos de duas ou três partículas, o que permitiria uma fácil passagem do líquido, e desta forma após um período inicial de baixa eficiência, a filtração é efetuada pelo próprio resíduo (ou crosta de filtração) Figura 8 (BLACKADDER, 1982).

Figura 8 – Processo de filtração.



Fonte: Silva e Nomura (2012).

De acordo com (COULSON, 1965) as condições em que se realiza a filtração variam muito, em razão do equipamento escolhido e dos fatores que afetam diretamente a filtragem, dependendo esses últimos da natureza do material a ser filtrado, que pode ser:

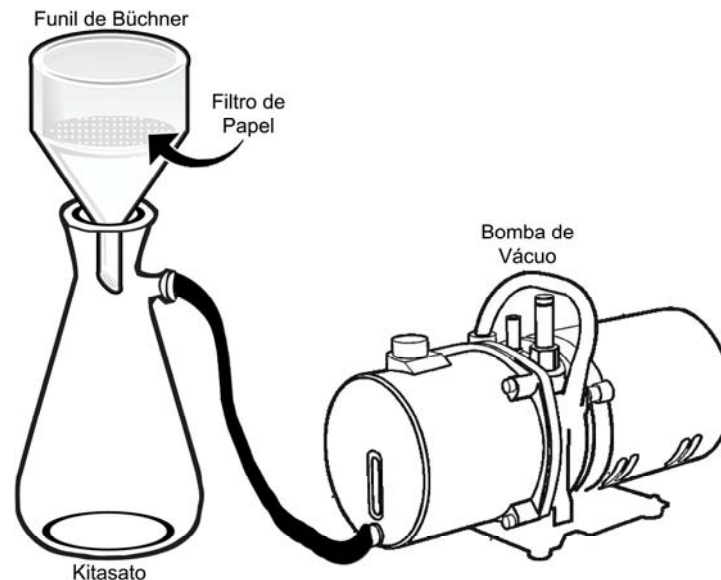
- As propriedades do fluido em particular e sua viscosidade, massa específica e propriedades corrosivas.
- A natureza do sólido; dimensão e forma das suas partículas, distribuição granulométrica e características de empilhamento.
- A concentração de sólidos em suspensão.
- A quantidade de material a movimentar e seu valor.
- Necessidade de lavagem dos sólidos filtrados.

O custo do equipamento de filtração estará intimamente relacionado com a área de filtração, e normalmente é desejável obter uma elevada velocidade global de filtração. O filtro mais apropriado para qualquer operação é aquele que engloba os requisitos de eficiência com mínimo de custo global (COULSON, 1965).

Para filtração de pequenos volumes, utiliza-se normalmente o aparelho de filtração denominado filtro de Buchner e frasco kitassato, e ou similar (Figura 9), normalmente dotados de uma parte basal cônica ou cilíndrica, onde o cultivo microalgal é colocado na parte de cima e flui por gravidade encontrando um filtro de papel, aonde ocorre a separação sólido-líquido. Como a resistência à

passagem pelo meio poroso vai aumentando no decorrer do tempo, utiliza-se um vaso Kitassato conectado a uma bomba a vácuo.

Figura 9 – Equipamento para filtração.



Fonte: Silva e Nomura (2012).

É um processo bastante eficiente e prático quando se deseja concentrar pequenos volumes de microalgas. A *Spirulina platensis* é uma das espécies de microalgas que apresenta características favoráveis a este processo, principalmente por ser filamentosa (RICHMOND, 2004). Entretanto, a maioria das microalgas destinadas à produção de biocombustíveis pertencem a gêneros (por exemplo, *Nannochloropsis* ou *Chlorella*), que apresentam características (unicelulares e de tamanho $< 4\mu\text{m}$) não adequadas para o desenvolvimento de uma filtração eficiente (MATA et al., 2010).

A filtração é uma técnica simples e que permite determinar com exatidão o volume equivalente do cultivo quando alcançado altos índices de separação da biomassa do meio de cultivo, informação útil em análises quantitativas com biomassa concentrada no filtro. Todavia, em cultivo de grande escala, a separação de grandes volumes de microalgas para posterior processamento da biomassa somente é viável se a espécie apresentar células grandes ou estrutura filamentosa, já que as células pequenas acarretam no entupimento rápido de quaisquer sistemas de filtração em grandes volumes. Os processos de microfiltração e ultrafiltração podem ser usados tanto para colheita da biomassa (Microfiltração) ou

isolamento e obtenção de produtos metabólitos (ultrafiltração), sendo uma solução alternativa para concentrar algumas espécies, não causando danos prejudiciais tanto na composição quanto nas características das células (PETRUŠEVSKI et al., 1995).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO EXPERIMENTOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fluorescência e Ressonância Paramagnética (LAFLURPE) da Universidade Estadual de Londrina-UEL, e no Laboratório de Microbiologia do solo do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR).

4.2 ESTIRPES UTILIZADAS

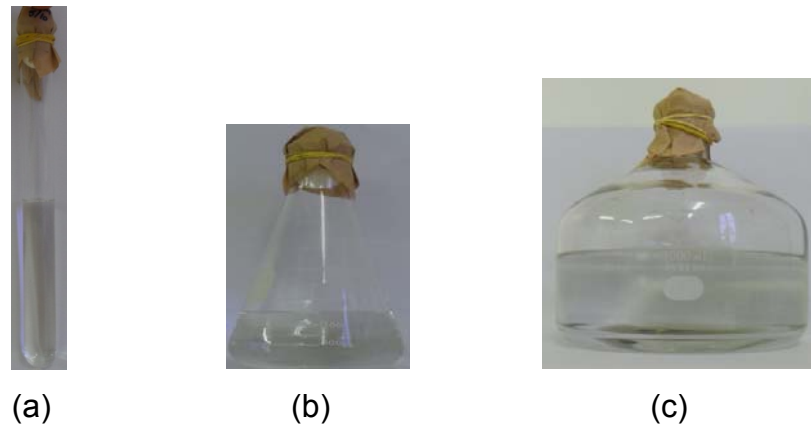
As estirpes utilizadas foram *Chlorella vulgaris* e *Neochloris oleoabundans* e *Botryococcus braunii*, ambas estirpes presentes na coleção de microalgas do IAPAR, sendo que a estirpe *C. vulgaris* (IPR-*Chlv*7123) foi adquirida da UFSCAR- Universidade Federal de São Carlos, a estirpe *N. oleoabundans* (UTEX LB 1185) e *B. braunii* (UTEX 572) foram adquiridas da Coleção de microalgas da - Universidade do Texas, EUA (<http://web.biosci.utexas.edu/utex/>).

4.3 PREPARAÇÃO E TRATAMENTO DE VIDRARIAS

Os materiais utilizados para o cultivo das microalgas *C. vulgaris* (IPR-*Chlv*7123), *N. oleoabundans* (UTEX LB1185) e *B. braunii* (UTEX572) como tubos e erlenmeyers foram previamente lavados com água e sabão, em seguida enxaguado com água destilada, seco em estufa.

Os frascos utilizados nos cultivos de inóculo inicial foram adicionados com a quantia utilizada de meio de cultivo BBM (BOLD, H.C. 1949) vedados com boneca de algodão, recobertos com papel Kraft, identificados e encaminhados para a esterilização em autoclave a 121°C por 20 minutos (Figura 10).

Figura 10 – Frascos utilizados nos cultivos de inóculo inicial (a) tubo de ensaio de 15 mL; (b) erlenmeyer de 500 mL e (c) frascos de 3.000 mL.



Fonte: Silva (2012).

4.4 MEIO DE CULTIVO BBM E A PREPARAÇÃO DE PLACAS COM MEIO SÓLIDO

O meio de cultivo utilizado neste trabalho foi o meio BBM (*Bold Basal Medium*) (BOLD, 1949), indicado e utilizado para o cultivo de microalgas de água doce. Foram preparadas soluções estoque dos nutrientes e micronutrientes, utilizados de acordo com o volume de cultivo, e pH inicial dos cultivos foi ajustado a 6.8.

Tabela 2 – Composição e a concentração do meio de cultura BBM.

Reagentes	Solução Estoque (g L ⁻¹)	Quantidade a pipetar da solução estoque (mL)	Concentração Final (g L ⁻¹)
NaNO ₃	25	10	0,25
CaCl ₂ · 2H ₂ O	2,5	10	0,025
MgSO ₄ · 7H ₂ O	7.5	10	
K ₂ HPO ₄	7,5	10	0,075
KH ₂ PO ₄	17,5	10	0,175
NaCl	2,5	10	0.025
Solução de Zn, B, Mn, Mo, Cu e Co	-	1	-
Solução de EDTA alcalina		1	
Solução de Ferro Ácido		1	
H ₂ O destilada	-	1000	

Tabela 3 – Solução estoque de micronutrientes para o meio de cultura BBM.

Micronutrientes	Solução Estoque (g L ⁻¹)
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	8,82
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	1,44
MoO ₃	0,71
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	1,57
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,45
H ₃ BO ₃	11,42

Tabela 4 – Solução de EDTA alcalina para meio de cultura BBM.

Solução de EDTA alcalina	Solução Estoque (g L ⁻¹)
EDTA	50
KOH	31

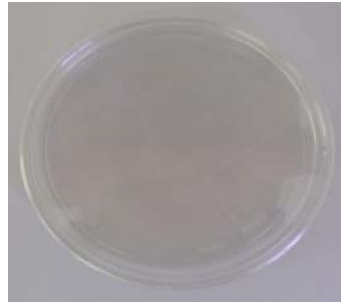
Tabela 5 – Solução de ferro ácida para meio de cultura BBM.

Solução de Ferro Ácido	Solução Estoque (g L ⁻¹)
FeSO ₄ . 7H ₂ O	4,98
H ₂ SO ₄	1 mL

Para preparação de placas de petri com meio sólido, o meio BBM foi adicionado de Ágar a 1%.

Após a esterilização, os frascos foram encaminhados à sala de fluxo laminar e vertido em placas de petri esterilizadas. O meio de cultivo sólido foi acondicionado em saco plástico e utilizado de acordo com a necessidade dos experimentos (Figura 11).

Figura 11 – Placa de petri com meio BBM sólido.



Fonte: Silva (2012).

4.5 AMBIENTE DE CULTIVO

Os experimentos, para manutenção das espécies trabalhadas e produção de inóculo inicial e maior escala de produção, foram acondicionados em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 h com temperatura controlada de $28,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$, na fase luminosa, e $22,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$, na fase escura, com intensidade de radiação de $100 \pm 20\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ com densidade de fluxo de fótons da radiação fotossinteticamente ativa (*PAR - photosynthetically active radiation*) (porômetro Licor INC modelo LI-1600) utilizando quatro lâmpadas fluorescentes tubulares (65 W cada) dispostas paralelamente na parte superior do recipiente para cultivo da microalga. E também em casa de vegetação com cobertura de vidro exposto a luz solar.

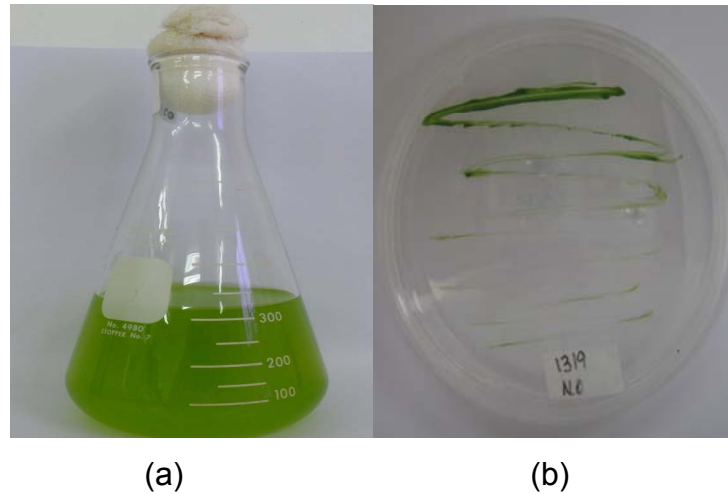
4.6 MANUTENÇÃO E PRODUÇÃO DE INÓCULO

As estirpes de microalgas *B. braunii* (UTEX 572), *N. oleoabundans* (UTEX LB 1185) e *C. vulgaris* (IPR-Chlv7123), são mantidas na coleção de microalgas do IAPAR. As microalgas *N. oleoabundans* e *C. vulgaris* também foram mantidas em placas de petri contendo meio sólido de BBM, onde as placas foram repicadas a cada 20 dias e armazenadas em câmara de crescimento.

Para produção do inóculo inicial, foi alçada uma porção de microalgas crescidas em meio sólido BBM e transferida para tubos com 50 mL de meio líquido. Uma porção maior de microalga em meio sólido foi transferida diretamente nos erlenmeyers. Este inóculo permaneceu em média 10 a 15 dias na câmara de crescimento, até que os mesmos apresentassem altas concentrações de

células, sendo em seguida inoculados nos cultivo com maiores volumes na proporção de 10% no volume final do cultivo (Figura 12).

Figura 12 – (a) Frasco erlenmeyer utilizado para produção de inóculo inicial e (b) placa de petri para o cultivo em meio sólido.



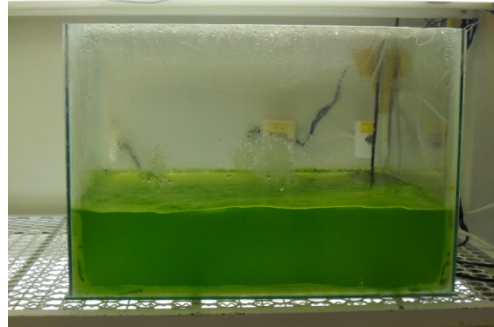
Fonte: Silva (2012).

4.7 SISTEMAS DE CULTIVO DE MICROALGAS PARA MAIOR PRODUÇÃO DE BIOMASSA

4.7.1 Sistema em Aquário

Foi utilizado o sistema de cultivo fechado, em aquários de vidro com capacidades máxima de 40L e 80 L com volume de cultivo variando de acordo com a necessidade dos experimentos. O referido sistema constou com agitação por uma bomba Boyu (submersible pump, modelo SP 1800), e foi mantido em câmara de crescimento como descrito nesta metodologia (Figura 13).

Figura 13 – Sistema de cultivo em aquário de vidro.



Fonte: Silva (2012).

4.7.2 Fotobioreator em Formato Vertical e Tubular

Foi construído um sistema para o cultivo de microalgas em fotobioreator vertical em saco plástico de fundo redondo transparente ou translúcido composto de polietileno PEBD (polietileno de baixa densidade), com materiais de baixo custo, fácil instalação e reciclável (Pedido de Patente em andamento).

4.8 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE LIPÍDEOS POR EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA

A análise de lipídeos foi realizada pelo método de espectroscopia de fluorescência utilizando corantes específicos através de método indireto.

Após o cultivo da microalga foi coletada uma amostra e fixado a densidade óptica em 0,06 em 670 nm e calculado o fator de diluição da amostra. Após fixar a densidade óptica, uma alíquota de 2,0 mL da amostra microalgal (em triplicata) foi centrifugada durante 10 min em Eppendorf a 5.000 rpm e retirou-se o sobrenadante.

Para o rompimento celular, as células sedimentadas por centrifugação foram levadas a temperatura de -80 °C em ultrafreezer por 24 h. Posteriormente, o volume da amostra foi completado para 2,0mL de acetona P.A. e adicionado o corante Nile red para análise de intensidade de fluorescência.

Foi realizada uma curva de calibração com solução de Trioleína (padrão de lipídeo neutro) com concentração de 0,5 a 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A solução do corante Nile red foi utilizada na concentração de 0,05 mg mL^{-1} utilizada na proporção

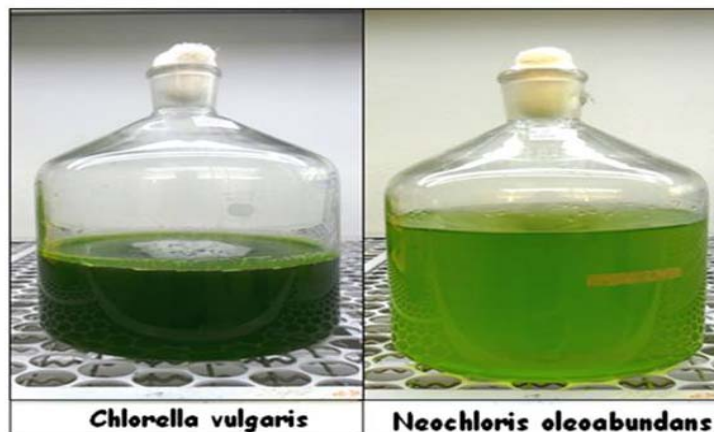
de $5,0 \mu\text{L mL}^{-1}$ de solução-padrão ou amostra. Após a adição do corante, as amostras foram mantidas em repouso por 30 minutos para a leitura.

Todas as soluções foram preparadas ao abrigo da luz. A leitura foi realizada em espectrofluorímetro SHIMADZU RF 5301PC modo emissão, comprimento de onda de excitação máxima em 537nm e de emissão máxima em 610nm.

4.8.1 Cultivo das Microalgas para Análise de Lipídeos

O cultivo das microalgas *C. vulgaris* (IPR-*Chlv*7123) e *N. oleoabundans* (UTEX LB1185) foi realizado por 14 dias em frascos de vidro transparente com capacidade de 2 litros de meio BBM (Figura 14), em câmara de crescimento. O cultivo da microalga *B. braunii* (UTEX 572) se deu em saco plástico transparente de polietileno de baixa densidade ou PEBD em casa de vegetação por 15 dias. O meio de cultivo utilizado foi o BBM com borbulhamento de ar constante e volume total de 60 L de cultivo.

Figura 14 – Frascos com capacidade de 2,0 L utilizados para o cultivo das estirpes de *N. oleoabundans* (UTEX LB1185) e *C. vulgaris* (IPR-*Chlv*7123).



Fonte: Silva (2012).

4.9 PARÂMETROS ANALISADOS NOS EXPERIMENTOS DE CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL

4.9.1 Espectrofotometria

Foi realizada análise da densidade óptica em 670 nm em espectrofotômetro UV-visível (Genesys 10UV). Para acompanhamento da concentração celular.

4.9.2 Contagem de Células

Foi realizada contagem de células em câmara de Neubauer, utilizando um microscópio óptico Nikon modelo (Eclipse E200), na objetiva de 40X (vezes), totalizando um aumento visual de 400 X.

4.9.3 Determinação da Porcentagem de Eficiência da Flocculação

A atividade de flocculação foi expressa na forma da eficiência de flocculação (%) calculado pela seguinte equação (BUELNA et al., 1990):

Eficiência da Flocculação (%) = $(1 - A/B) \times 100$, onde:

- A: DO_{670} do sobrenadante após a flocculação ou centrifugação;
- B: DO_{670} de referência (sem flocculante).

4.9.4 Análise de pH

Foi utilizado um pHmetro de marca Metrohm modelo 827 pH lab, em todas as determinações analíticas.

4.10 PROCEDIMENTO PARA SEPARAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DA BIOMASSA EM MEIO DE CULTIVO

4.10.1 Otimização dos Parâmetros de Centrifugação para Concentração de Biomassa de Microalgas *N. oleoabundans* (UTEX LB1185), *C. vulgaris* (IPR-*Chlv*7123) e *B. braunii* (UTEX 572)

4.10.1.1 Cultivo de microalga da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185) e da microalga *C. vulgaris* (IPR-*Chlv*7123)

O planejamento experimental Box-Behnken foi realizado no programa STATISTICA 7.0, constituído de 13 tratamentos com quatro repetições no ponto central para cada estirpe de microalga, com as variáveis de tempo igual a 1, 8 e 15 min e de rotação igual a 1.000, 5.500 e 10.000 rpm.

O cultivo de microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185) e da microalga *C. vulgaris* (IPR-*Chlv*7123) foi realizado durante 15 dias em meio BBM em frasco de vidro com capacidade de 3 L com 2 L de cultivo microalgal em câmara de crescimento.

No 15º dia, o meio de cultivo foi fracionado em tubos do tipo Falcon com 50 mL e levados à centrifugação em uma centrífuga refrigerada (JOUAN modelo BR4) com temperatura controlada a 25,0 °C.

Após centrifugação, foram coletadas amostras do sobrenadante e realizadas análises de densidade óptica em espectrofotômetro UV-visível (Genesys 10UV) e contagem celular em câmara de Neubauer utilizando um microscópio óptico (Nikon Eclipse E200).

4.10.1.2 Cultivo de microalga da *B. braunii* (UTEX 572)

O planejamento experimental Box-Behnken foi realizado no programa STATISTICA 7.0, constituído de 13 tratamentos com quatro repetições no ponto central, com as variáveis de tempo igual a 2; 8,5 e 15 min. e de rotação igual a 1.000, 5.500 e 10.000 rpm.

A microalga *B. braunii* (UTEX 572) foi cultivada em saco plástico transparente de polietileno de baixa densidade ou PEBD em casa de vegetação de

vidro por 14 dias. O meio de cultivo utilizado foi o BBM com borbulhamento de ar constante e volume total de 60L de cultivo (Figura 15).

Figura 15 –Cultivo da microalga *B. braunii* (UTEX 572) em saco plástico transparente



Fonte: Silva (2012).

No 14º dia, foi coletada uma alíquota de 650 mL de cultivo microalgal que foi fracionada em tubos do tipo Falcon com 50 mL e levados a uma centrífuga refrigerada (JOUAN modelo BR4) com temperatura controlada a 25,0 °C.

Após centrifugação foram coletadas amostras do meio de cultivo e realizadas análises de densidade óptica (D.O.) em espectrofotômetro UV-visível (Genesys 10UV).

4.10.2 Floculação com Amido de Mandioca Catiônico

O amido de mandioca catiônico, na forma de pó e pré-gelatinizado, denominado de Halocat 200, foi produzido e cedido pela Syral Halotek, uma empresa do Grupo Tereos. O amido modificado, utilizado como agente de floculação, apresentou as seguintes características: 14% de umidade, viscosidade de 500 a 1500 CPS e grau de substituição de 2%.

A solução estoque de amido de mandioca foi preparada em água deionizada na concentração de 2,5% m/v, e adicionado diretamente aos cultivos das

microalgas *N. oleoabundans*, *C. vulgaris* e *B. braunii* nos experimentos de floculação, em temperatura em torno de 25°C.

4.10.2.1 Cultivo da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185)

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições. Para análise no programa STATISTICA 7.0, foi utilizado o delineamento experimental Box-Behnken constituído de 13 tratamentos com quatro repetições no ponto central, com as variáveis de tempo igual a 2,4 e 6 h, concentração igual a 0; 0,05 e 0,1%v/v.

Para formação do inóculo a estirpe foi cultivada em meio BBM (BOLD, 1949), durante 12 dias, em frasco de vidro com capacidade para 3 L contendo 2 L de meio de cultivo, sem agitação, em câmara de crescimento. No 12º dia de crescimento do inóculo foi realizada a contagem celular em câmara de Neubauer e análise D.O. Para determinação da densidade de células.

A partir do inóculo, foi realizado o cultivo da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185) em aquário com capacidade para 40 L contendo 12 L de meio de cultivo, com agitação por bomba ®Boyu (*submersible pump*, modelo SP 1800) por 15 dias.

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) utilizando-se o *software* (programa estatístico) SAS (*Statistical Analysis System*, 1999, versão 9.1) e o *software* STATISTICA 7.0 para verificar qual a concentração mais adequada de amido de mandioca catiônico e do tempo de repouso para obtenção de uma floculação ótima.

O agente floculante foi adicionado sob agitação a 75 rpm em agitador rotacional (Stuart Scientific *orbital shaker* S01) durante 30 minutos. Após agitação, os frascos foram mantidos em repouso durante 6 h.

Foram coletadas alíquotas de 2,0 mL de amostra do sobrenadante após 1, 2, 3, 4, 5 e 6h de repouso.

As amostras foram levadas para análise de densidade óptica em espectrofotômetro UV-visível (Genesys 10UV) a 670 nm e contagem celular em câmara de Neubauer.

O pH foi medido no meio de cultivo no 15º dia, bem como após a adição do agente floculante em 1, 3 e 6 h.

A contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando-se um microscópio óptico (Nikon Eclipse E200).

4.10.2.2 Cultivo da microalga *C. vulgaris* (IPR-Chlv7123)

O planejamento experimental Box-Behnken foi realizado no programa STATISTICA 7.0, constituído de 16 tratamentos com quatro repetições no ponto central, com as variáveis de tempo igual a 2,4 e 6 h, concentração igual a 0;0,05 e 0,1%v/v e pH igual a 6, 8 e 10 induzido com HCl ou NaOH.

Para formação do inóculo a estirpe foi cultivada de acordo com item 4.10.2.1, por 15 dias.

O cultivo da microalga *C. vulgaris* (IPR-Chlv7123) ocorreu em fotobiorreator vertical em saco plástico transparente com capacidade para 100 L contendo 50 L de meio de cultivo, com injeção direta por compressor de ar por 10 dias. No 10º dia foi coletado 8 L do cultivo microalgal que foi fracionado em frascos com 500 mL.

O agente floculante foi adicionado nos frascos com suas devidas concentrações de floculante e suas variáveis de estudo e realizado homogeneização manual com bastão de vidro por 1 minuto.

Foram coletadas alíquotas de 2,0 mL de amostra do sobrenadante de acordo com tempo de repouso e as amostras foram levadas para análise de densidade óptica em espectrofotômetro.

4.10.2.3 Cultivo da microalga *B. braunii* (UTEX 572)

O planejamento experimental Box-Behnken foi realizado no programa STATISTICA 7.0, constituído de 16 tratamentos com quatro repetições no ponto central, com as variáveis de tempo igual a 2,4 e 6 h, concentração igual a 0;0,05 e 0,1%v/v e pH igual a 6, 8 e 10.

A microalga *B. braunii* (UTEX 572) foi cultivada de acordo com item 4.10.1.2 por 15 dias.

O experimento floculação com a adição de amido de mandioca catiônico ocorreu no 15º dia de cultivo. Foi coletado 8 litros do cultivo microalgal que foi fracionado e frascos de 500 mL.

O agente floculante foi adicionado nos frascos com suas devidas concentrações de floculante e suas variáveis de estudo e realizado homogeneização manual com bastão de vidro por 1 minuto.

Foram coletadas alíquotas de 2,0 mL de amostra do sobrenadante de acordo com tempo de repouso e as amostras foram levadas para análise de densidade óptica em espectrofotômetro.

4.10.3 Experimento de Floculação por Indução Alcalina do pH

4.10.3.1 Cultivo de microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185)

O planejamento experimental Box-Behnken foi realizado no programa STATISTICA 7.0, constituído de 13 tratamentos com quatro repetições no ponto central, com as variáveis de tempo igual a 2,4 e 6 h pH alcalino induzido igual a 8,0; 9,5 e 11,0.

Para formação do inóculo a estirpe, foi cultivada de acordo com item 4.10.2. por 13 dias.

O cultivo da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185) ocorreu em recipiente do tipo aquário com capacidade para 80L contendo 55L de meio de cultivo, com agitação por bomba ®Boyu (*submersible pump*, modelo SP 1800) por 12 dias.

A indução alcalina do pH ocorreu no 12º dia de cultivo com a utilização de NaOH. Foi coletado 6,5 litros do cultivo microalgal que foi, fracionado em Becker de 2 e 4 L, onde ocorreu a indução alcalina de acordo com o delineamento experimental, após ocorrer a indução alcalina do pH o cultivo foi novamente fracionado frascos de 500 mL.

Foram coletadas alíquotas de 2,0 mL de amostra do sobrenadante de acordo com tempo de repouso e as amostras foram levadas para análise de densidade óptica em espectrofotômetro.

4.10.3.2 Cultivo de microalga *B. braunii* (UTEX 572)

O planejamento experimental Box-Behnken foi realizado no programa STATISTICA 7.0 constituído de 13 tratamentos com quatro repetições no

ponto central, com as variáveis de tempo igual a 5, 26,5 e 48 h e pH alcalino induzido igual a 8; 9,5 e 11.

A microalga *B. braunii* (UTEX 572) foi cultivada de acordo com item 4.10.1.2 por 13 dias.

A indução alcalina do pH ocorreu no 13º dia de cultivo, com a utilização de NaOH. Foi coletado 6,5 L do cultivo microalgal que foi, fracionado em Becker de 2 e 4 L, onde ocorreu a indução alcalina de acordo com o delineamento experimental, após ocorrer a indução alcalina do pH o cultivo foi novamente fracionado frascos de 500 mL.

Foram coletadas alíquotas de 2,0 mL de amostra do sobrenadante de acordo com tempo de repouso e as amostras foram levadas para análise de densidade óptica em espectrofotômetro.

4.10.4 Floculação com PAC - Policloreto de Alumínio

Foi utilizado neste experimento o floculante comercial PAC- Policloreto de alumínio, utilizado no tratamento de água. A Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP, Assis – SP), gentilmente cedeu uma amostra do Policloreto de Alumínio- PAC com as seguintes propriedades físico- químicas:

- Estado físico: líquido viscoso límpido.
- Cor: coloração âmbar a castanho.
- pH: < 3,5 (solução tal qual a 25°C).
- Densidade: 1,20 a 1,40 g/cm³ a 25°C.
- Viscosidade a 25°C: 0,01 a 1,0 Kg/m.s.

4.10.4.1 Cultivo da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185)

O planejamento experimental Box-Behnken foi realizado no programa STATISTICA 7.0, constituído de 16 tratamentos com quatro repetições no ponto central, com as variáveis de tempo igual a 15, 30 e 45 min e pH igual a 6,0; 7,5 e 9 com utilização de NaOH ou HCl e concentração de 0, 100 e 200 ppm.

Para formação do inóculo a estirpe, foi cultivada de acordo com item 4.10.2.1 por 13 dias.

O cultivo da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185) ocorreu de acordo com item 4.10.3.1 por 13 dias.

O experimento de floculação com policloreto de alumínio-PAC ocorreu no 13^o dia de cultivo. Foram coletados 8 litros do cultivo microalgal que foi fracionado em frascos de 500 mL.

O agente floculante foi adicionado e realizado homogeneização manual com bastão de vidro por 1 minuto.

Foram coletadas alíquotas de 2,0 mL de amostra do sobrenadante de acordo com tempo de repouso e as amostras foram levadas para análise de D.O. em espectrofotômetro.

4.10.4.2 Cultivo da microalga *C. vulgaris* (IPR-Chlv7123)

O planejamento experimental Box-Behnken foi realizado no programa STATISTICA 7.0, constituído de 16 tratamentos com quatro repetições no ponto central, com as variáveis de tempo igual a 15, 30 e 45 min, concentração 0, 50 e 100 ppm e pH igual a 6,0; 7,5 e 9,0 induzido com NaOH ou HCl.

Para formação do inóculo a estirpe foi cultivada de acordo com item 4.10.2.1, por 15 dias. No 15^o dia de crescimento do inóculo foi realizada a contagem celular em câmara de Neubauer e densidade óptica.

O cultivo da microalga *C. vulgaris* (IPR-Chlv7123) ocorreu em fotobiorreator vertical em saco plástico transparente com capacidade para 100 L contendo 50 L de meio de cultivo, com injeção direta por compressor de ar por 10 dias. No 10^o dia de cultivo foi coletado 8 litros do cultivo microalgal que foi fracionado em frascos de 500 mL.

O agente floculante foi adicionado nos frascos com suas devidas concentrações de floculante e suas variáveis de estudo e realizado homogeneização manual com bastão de vidro por 1 minuto.

Foram coletadas alíquotas de 2,0 mL de amostra do sobrenadante de acordo com tempo de repouso e as amostras foram levadas para análise de D.O. em espectrofotômetro.

4.10.4.3 Cultivo da microalga *B. braunii* (UTEX 572)

O planejamento experimental Box-Behnken foi realizado no programa STATISTICA 7.0, constituído de 16 tratamentos com quatro repetições no ponto central, com as variáveis de tempo igual a 15, 30 e 45 minutos, concentração 0, 50 e 100 ppm e pH igual a 6,0; 7,0; 8,0 induzido com NaOH ou HCl.

A microalga *B. braunii* (UTEX 572) foi cultivada de acordo com item 4.10.1.2 por 14 dias.

No 14º dia de cultivo foram coletados 8L cultivo microalgal que foi fracionado em frascos de vidro com 500 mL.

O agente floculante foi adicionado nos frascos com suas devidas concentrações de floculante e suas variáveis de estudo e realizado homogeneização manual com bastão de vidro por 1 min.

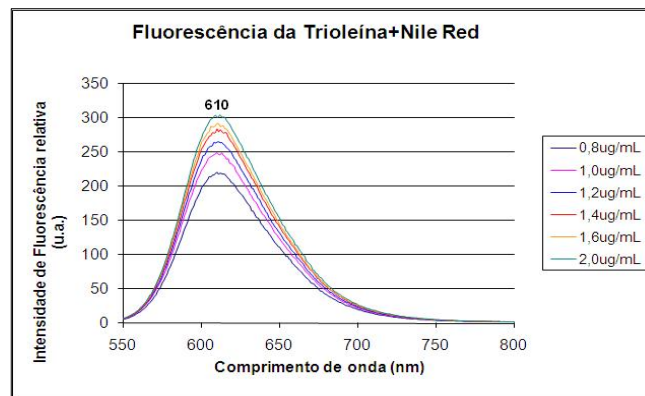
Foram coletadas alíquotas de 2,0 mL de amostra do sobrenadante de acordo com tempo de repouso e as amostras foram levadas para análise de D.O. em espectrofotômetro.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DE CONCENTRAÇÃO DE LIPÍDEOS

Neste trabalho, todas as leituras foram realizadas após 30 minutos de reação. O espectro obtido no momento da construção da curva de calibração está representado na figura 17.

Figura 16 – Espectro de fluorescência da curva analítica com emissão máxima em 610nm.



Fonte: Silva e Lima (2012).

A linearidade foi obtida no intervalo de concentração de 0,8 a 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 610 nm, com coeficiente de correlação (R^2) > 0,98 sendo aceitável conforme a especificação da ANVISA (ANVISA, 2003).

A repetibilidade do método foi calculada com base nos coeficientes de variação das amostras e os valores encontrados foram de 2% para *C. Vulgaris* (IPR-*Chlv*7123), 2,7% para *N. Oleoabundans* (UTEX LB 1185) e 3,8% para *B. braunii* (UTEX 572). Os resultados de biomassa algal e teor lipídico das microalgas avaliadas estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6 – Teor lipídico e biomassa das microalgas avaliadas.

Espécie	Biomassa (g/L ⁻¹)	Lipídeos (%)
<i>C. vulgaris</i> (IPR- <i>Chlv</i> 7123)	0,30 ± 0,013	19,14 ± 0,6
<i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB 1185)	0,04 ± 0,004	47,15 ± 0,8
<i>B. braunii</i> (UTEX 572)	0,10 ± 0,001	32,33 ± 0,7

Fonte: Silva (2012).

Das microalgas avaliadas neste trabalho todas apresentaram alto teor de lipídeos em sua biomassa com porcentagens variando de 19 a 47 %, com destaque para microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB 1185) que teve maior porcentual de lipídeos em sua biomassa (Tabela 6). Porém os cultivos desenvolvidos produziram baixa quantidade de biomassa, onde a microalga *C. vulgaris* (IPR-*Chlv*7123) teve maior produtividade em g/L⁻¹ (Tabela 6), podendo este fator estar relacionado ao meio de cultivo utilizado (RICHMOND, 2004).

Devido ao grande número de estudos e variações de cultivos existentes, as espécies avaliadas podem apresentar variação na quantidade de lipídeos na biomassa seca em torno de: 5 – 58 % para microalga *C. vulgaris* (IPR-*Chlv*7123), 29 - 65 % para microalga *N. oleoabundans* e de 25 – 75 % para *B. braunii* (MATA et al., 2010).

5.2 CONCENTRAÇÃO DE MICROALGAS POR CENTRIFUGAÇÃO

5.2.1 Microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185)

A densidade óptica ao final de 15 dias de cultivo da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB 1185) foi de 0,179 e a contagem celular de 6,6. 10⁶ células mL⁻¹ e pH foi igual a 7,96.

No experimento de centrifugação a análise estatística indicou efeito significativo ($p > 0,05$) das variáveis tempo e rotação por minuto, visto que as duas variáveis interferem no resultado final do experimento.

O coeficiente de regressão ($R^2 = 0,999$) tabela 7, indica que 99,9% da variabilidade pode ser explicado pelo modelo com melhor previsão de resposta. A ANOVA é utilizada para avaliar a adequação do modelo ajustado, desta forma para

ser considerado um bom modelo os valores do R^2 devem ser superiores a 0,9, ou seja, quanto mais próximo de 1,00 o valor de R^2 , mais adequado é o modelo e melhor as previsões de resposta (BURKERT et al., 2004; SAFARALIE et al., 2010).

Tabela 7 – Análise de variância ANOVA de acordo com a resposta D.O. da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB 1185).

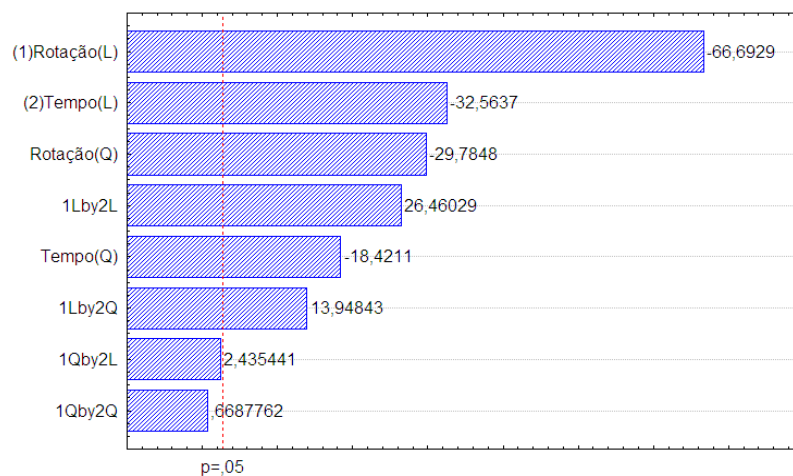
Factor	SS ^a	d.f. ^b	MS ^c	F - value	p - value
Rotação ⁽¹⁾	0,009070	2	0,004535	2667,539	0,000001
Tempo ⁽²⁾	0,002380	2	0,001190	699,865	0,000008
1*2	0,001532	4	0,000383	225,271	0,000058
Pure Error	0,000007	4	0,000002		
Total SS	0,014547	12			
$R_{sqr} = 0,999 / R^2_{adj} = 0,998$					

^a Soma dos quadrados; ^b Graus de liberdade; ^c Quadrado Médio.

Fonte: Silva (2012).

Os efeitos com maior influência e suas interações podem ser visualizados pelo gráfico de pareto (Figura 18), no qual o comprimento da barra é proporcional à importância do efeito, ultrapassado o nível de significância mínimo de 5%, valor mínimo do erro experimental. Observa-se novamente a importância das variáveis rotação e tempo.

Figura 17 – Representação gráfica do diagrama de Pareto para os efeitos dos parâmetros analisados sobre a densidade óptica (670 nm), obtidos pela centrifugação da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185).



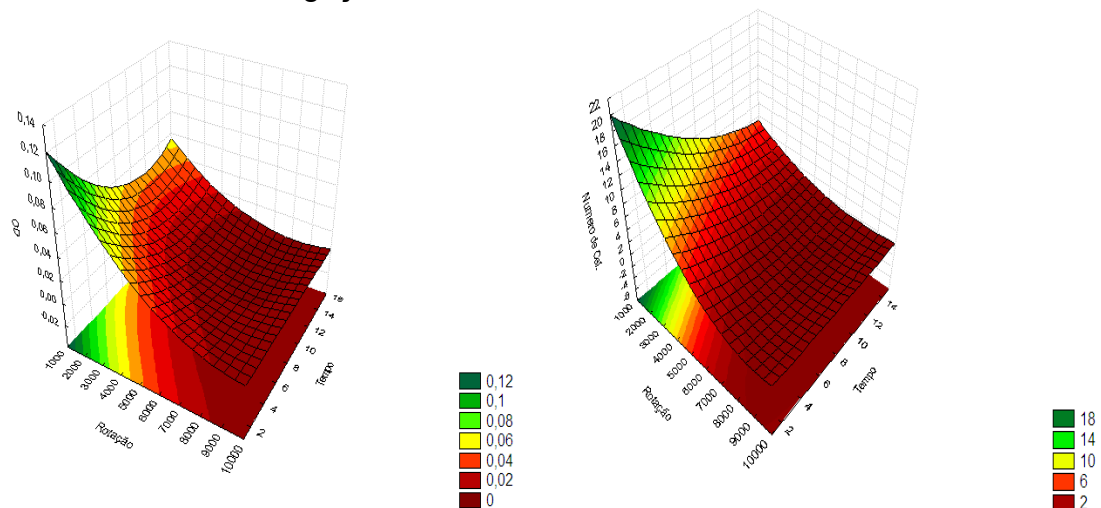
Fonte: Silva (2012).

O valor de $F_{\text{calculado}} = 5.803,299$ foi superior ao $F_{\text{tabelado}} = 6,04$, sendo este estatisticamente significativo. O teste F permite afirmar se o modelo referido apresenta significância estatística para que possa ser utilizado para fins preditivos a um nível de confiança de 95%. No entanto, para que o modelo tenha um significado estatístico o F calculado deve ser pelo menos três a cinco vezes superior ao tabelado (KALIL et al., 2000).

As equações que descrevem a modelagem de superfície de resposta para densidade óptica ($Z = 0,1654 - 3,01 \cdot 10^{-5}x + 1,41 \cdot 10^{-9}x^2 - 0,017y + 7,24 \cdot 10^{-4}y^2 + 2,09 \cdot 10^{-6}xy - 8,3 \cdot 10^{-8}xy^2 - 3,63 \cdot 10^{-11}x^2y + 1,05 \cdot 10^{-12}x^2y^2$) e número de células ($Z = 68,553 - 0,0146x + 7,89 \cdot 10^{-7}x^2 - 5,7746y + 0,1591y^2 + 0,0007xy - 5,07 \cdot 10^{-6}xy^2 - 1,69 \cdot 10^{-8}x^2y - 1,03 \cdot 10^{-9}x^2y^2$) estão apresentadas na (Figura 19). A separação da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB 1185) do meio de cultivo por centrifugação variou de acordo com o número de rotação e intervalo de tempo de centrifugação.

Os pontos ótimos de trabalho para determinar o tempo de centrifugação e o número de rotações por minuto foram obtidos através de valores previstos e desejáveis conforme os gráficos da (Figura 20).

Figura 18 – Superfície de resposta para densidade óptica e número de células ($\times 10^5$) do sobrenadante do meio de cultivo da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB 1185) após centrifugação de acordo com o número de rotações por minuto e tempo de centrifugação.



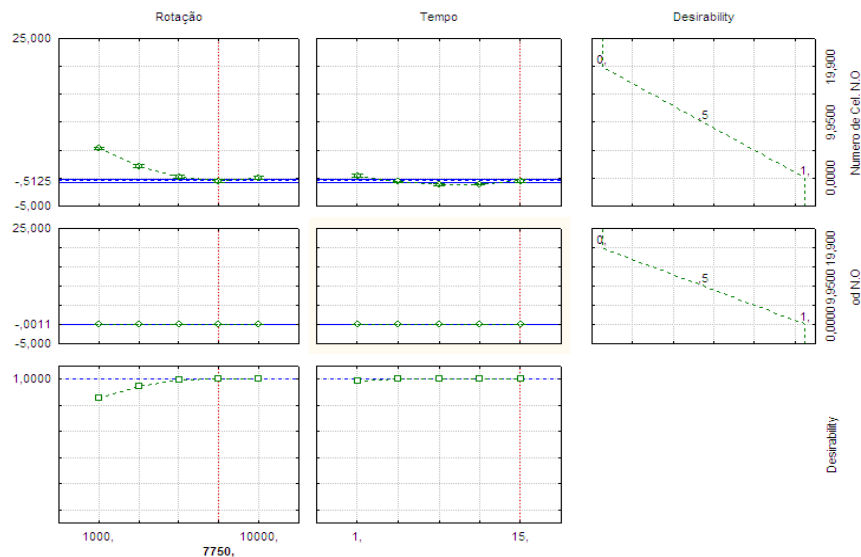
Fonte: Silva (2012).

Os gráficos apresentados na figura 19 revelam o comportamento das células de microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB 1185) frente ao tempo de

centrifugação e ao número de rotações por minuto durante a etapa de separação da microalga do meio de cultivo.

Para alcançar o valor de densidade óptica e contagem celular igual ou próxima a zero, indicando maior grau de separação da microalga do meio, o ponto ótimo para realização do experimento de centrifugação é 7750 rpm com duração mínima de 15 minutos. A faixa de segurança de trabalho pode conter uma variação na rotação acima de 5500 e tempo acima de 4,5 minutos (Figura 20). Para obtenção acima de 97,76% de concentração de biomassa.

Figura 19 – Parâmetros desejáveis para pontos ótimos de trabalho de centrifugação da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185) por densidade óptica e contagem celular.



Fonte: Silva (2012).

5.2.2 Microalga *C. vulgaris* (IPR-*Chlv7123*)

A densidade óptica ao final de 15 dias de cultivo da microalga *C. vulgaris* (IPR-*Chlv7123*) foi de 0,252 e a contagem celular de $6,27 \cdot 10^6$ células mL^{-1} e pH foi igual a 8,54.

No experimento de centrifugação da microalga *C. vulgaris* (IPR-*Chlv7123*) a análise estatística indicou significativa ($p > 0,05$) das variáveis tempo e rotação por minuto, visto que as duas variáveis interferem no resultado final do experimento (Figura 21).

O coeficiente de regressão ($R_{sqr}= 0,999$) tabela 8, corresponde que 99,9% da variabilidade pode ser explicado pelo modelo e melhor previsão de resposta (BURKERT et al., 2004; SAFARALIE et al., 2010).

Tabela 8 – Análise de variância ANOVA de acordo com a resposta D.O. da microalga *C. vulgaris* (IPR-*Chlv7123*).

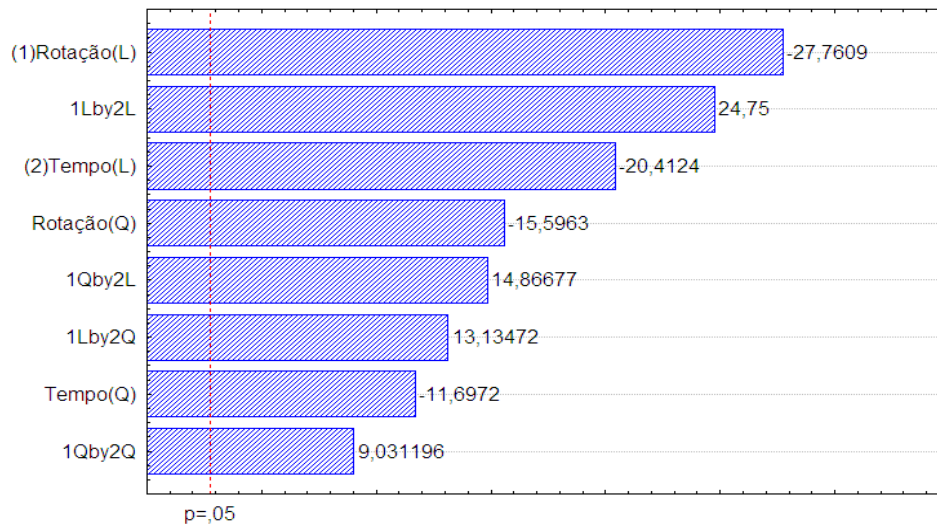
Factor	SS^a	d.f.^b	MS^c	F - value	p - value
Rotação ⁽¹⁾	0,004043	2	0,002021	1122,975	0,000003
Tempo ⁽²⁾	0,002204	2	0,001102	612,299	0,000011
1*2	0,004363	4	0,001091	605,941	0,000008
Pure Error	0,000007	4	0,000002		
Total SS	0,010721	12			
$R_{sqr}= 0,999 / R^2_{adj}= 0,997$					

^a Soma dos quadrados; ^b Graus de liberdade; ^c Quadrado Médio.

Fonte: Silva (2012).

Os efeitos com maior influência e suas interações podem ser visualizados pelo gráfico de pareto figura 21, no qual o comprimento da barra é proporcional à importância do efeito, ultrapassado o nível de significância mínimo de 5%, valor mínimo do erro experimental. Observa-se novamente a importância das variáveis rotação e tempo.

Figura 20 – Representação gráfica do diagrama de Pareto para os efeitos dos parâmetros analisados sobre a densidade óptica (670 nm), obtidos pela centrifugação da microalga *C. vulgaris* (IPR-*Chlv7123*).

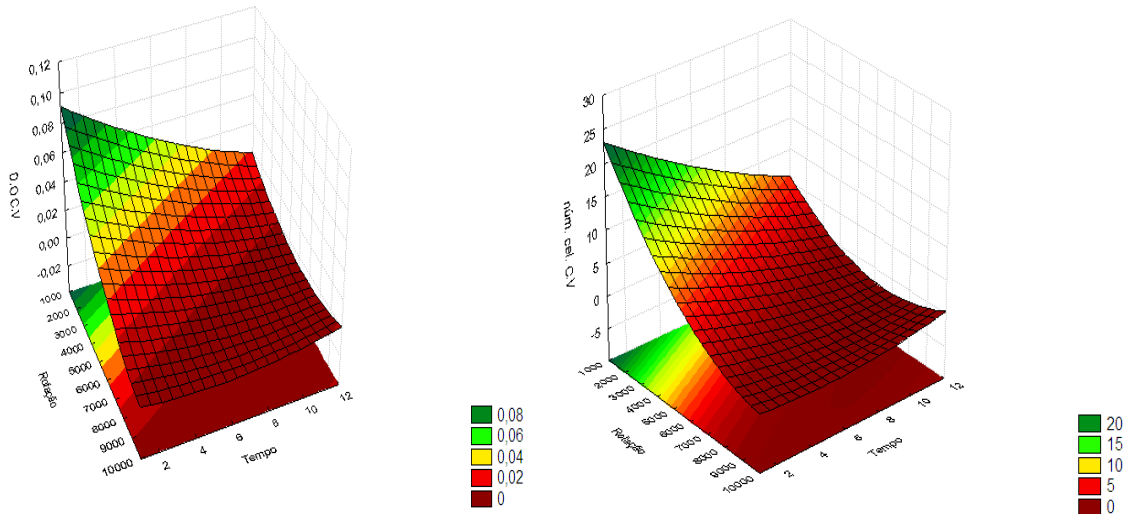


Fonte: Silva (2012).

O valor de $F_{\text{calculado}} = 760,4$ foi superior ao $F_{\text{tabelado}} = 6,04$, sendo este estatisticamente significativo (KALIL et al., 2000).

As equações que descrevem a modelagem de superfície de resposta para densidade óptica células ($z = 0,119 - 1,9 \cdot 10^{-5}x + 7,79 \cdot 10^{-10}x^2 - 0,010y + 0,0002y^2 + 7,81 \cdot 10^{-4}xy$) e número de células ($z = 30,633 - 0,005x + 2,486 \cdot 10^{-7}x^2 - 2,307y + 0,041y^2 + 1,904 \cdot 10^{-4}xy$) estão apresentadas na Figura 22. A separação da microalga *C. vulgaris* (IPR-*Chlv7123*) do meio de cultivo por centrifugação variou de acordo com o número de rotação e intervalo de tempo de centrifugação.

Figura 21 – Superfície de resposta para densidade óptica e número de células ($\times 10^5$) do sobrenadante do meio de cultivo da microalga *C. vulgaris* (IPR-*Chlv7123*) após centrifugação de acordo com o número de rotações por minuto e tempo de centrifugação.

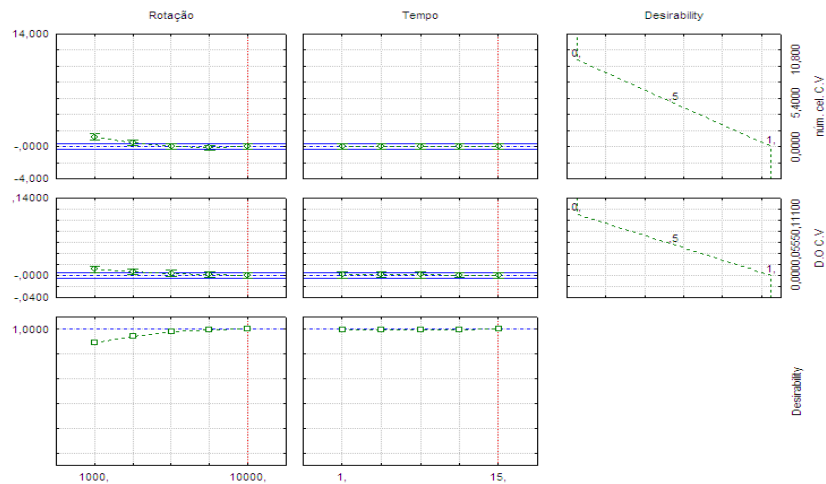


Fonte: Silva (2012).

Os gráficos apresentados na figura 22 revelam o comportamento das células de microalga *C. vulgaris* (IPR-*Chlv7123*) frente ao tempo de centrifugação e ao número de rotações por minuto durante a etapa de separação da microalga do meio de cultivo.

Para alcançar o valor de densidade óptica e contagem celular igual a zero, indicando maior grau de separação da microalga *C. vulgaris* (IPR-*Chlv7123*) do meio, o ponto ótimo para realização do experimento de centrifugação deverá estar acima de 10.000 rpm com duração mínima de 15 minutos para obtenção de 100% de concentração de biomassa. Entretanto, a faixa de segurança de trabalho pode conter uma variação na rotação acima de 7.500 rpm e tempo acima de 1 minuto (Figura 23).

Figura 22 – Parâmetros desejáveis para pontos ótimos de trabalho de centrifugação da microalga *C. vulgaris* (IPR-*Chlv7123*) por densidade óptica e contagem celular.



Fonte: Silva (2012).

5.2.3 Microalga *B. braunii* (UTEX 572)

Para o cultivo da microalga *B. braunii* (UTEX 572) a densidade óptica ao final de 14 dias foi de: 0,142 e o pH de 7,3.

No experimento de centrifugação da microalga *B. braunii* (UTEX 572) a análise estatística indicou resposta significativa ($p > 0,05$) para tempo e rotação por minuto, visto que estas duas variáveis interferem no resultado final (Figura 24).

O coeficiente de regressão obtido para o método da centrifugação ($R_{sqr} = 0,9973$) (Tabela 9) corresponde que 99,73% da variabilidade pode ser explicado pelo modelo com melhor previsão de resposta (BURKERT et al., 2004; SAFARALIE et al., 2010).

Para análise de ajuste do modelo aos dados experimentais foi utilizada a relação entre *Lack of Fit* e *Pure Error*, valores elevados da razão entre os dois indica falta de ajuste do modelo. O modelo apresentou um valor de 3,557 para f , implicando que o modelo não é significativo em relação ao puro erro experimental, confirmando a validade do modelo (TOVAR et al., 2010).

Tabela 9 – Análise da variância (ANOVA) para resposta em D.O da estirpe de microalga *B. braunii* (UTEX 572).

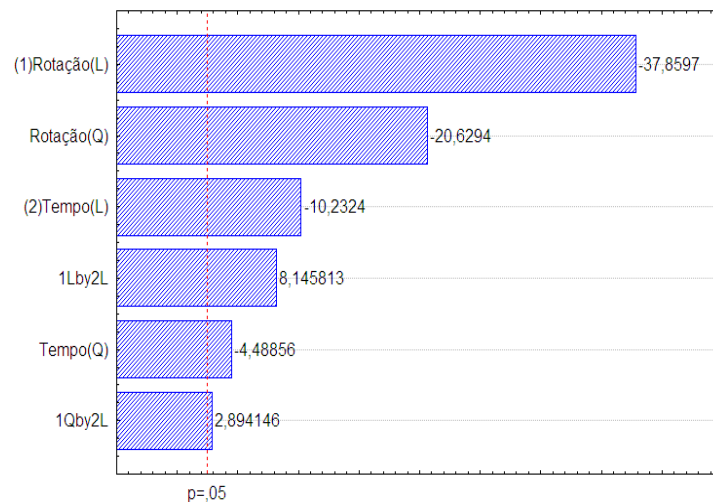
Factor	SS ^a	d.f. ^b	MS ^c	F - value	p - value
Rotação ⁽¹⁾	0,018938	2	0,009469	1721,664	0,000001
Tempo ⁽²⁾	0,001272	2	0,000636	115,629	0,000289
1*2	0,000761	2	0,000381	69,212	0,000789
Lack of Fit	0,000039	2	0,000020	3,557	0,129535
Pure Error	0,000022	4	0,000005		
Total SS	0,022644	12			
<i>Rsqr</i> =0,9973 / <i>R</i> ² _{adj} =0,9946					

^a Soma dos quadrados; ^b Graus de liberdade; ^c Quadrado Médio.

Fonte: Silva (2012).

Os efeitos com maior influência e suas interações podem ser visualizados pelo gráfico de pareto (Figura 24). Observa-se a importância das variáveis rotação e tempo.

Figura 23 – Representação gráfica do diagrama de Pareto para os efeitos dos parâmetros analisados sobre a densidade óptica (670 nm), obtidos pela centrifugação da microalga *B. braunii* (UTEX 572).



Fonte: Silva (2012).

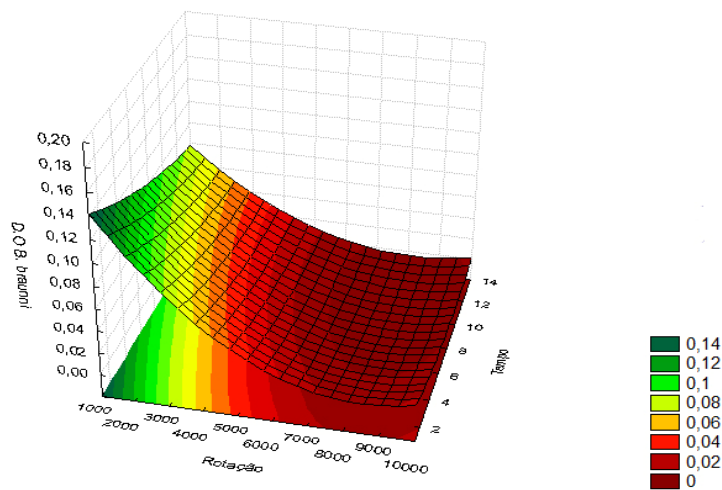
O valor de $F_{\text{calculado}} = 420,3$ foi superior ao $F_{\text{tabelado}} = 6,04$, sendo este estatisticamente significativo (KALIL et al., 2000).

As equações que descrevem a modelagem de superfície de resposta para densidade óptica $Z = 0,183 - 3,774 \cdot 10^{-5}x + 2,048 \cdot 10^{-9}x^2 - 0,007y + 9,438 \cdot 10^{-5}y^2 - 2,381 \cdot 10^{-7}xy + 7,947 \cdot 10^{-8}xy^2 + 7,831 \cdot 10^{-11}x^2y - 8,181 \cdot 10^{-12}x^2y^2$, está apresentada na

(Figura 25). A separação da microalga *B. braunii* (UTEX 572) do meio de cultivo por centrifugação variou de acordo com o número de rotação e intervalo de tempo de centrifugação.

Os pontos ótimos de trabalho para determinar o tempo de centrifugação e o número de rotações por minuto foram obtidos através de valores previstos e desejáveis conforme os gráficos da figura 25.

Figura 24 – Superfície de resposta para densidade óptica do meio de cultivo da microalga *B. braunii* (UTEX 572) após centrifugação de acordo com o número de rotações por minuto e tempo de centrifugação.

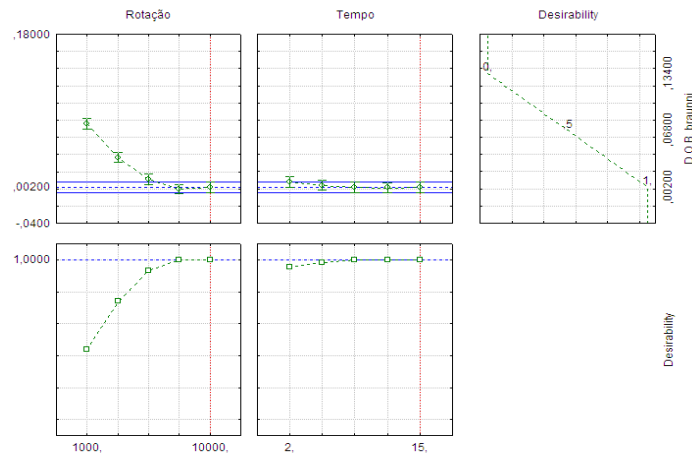


Fonte: Silva (2012).

Os gráficos apresentados na figura 25 revelam o comportamento das células de microalga *B. braunii* (UTEX 572) frente ao tempo de centrifugação e ao número de rotações por minuto durante a etapa de separação da microalga do meio de cultivo.

Para alcançar o valor de densidade óptica igual ou próxima a zero, indicando maior grau de separação da microalga do meio de cultivo, o ponto ótimo para realização do experimento de centrifugação deverá estar acima de 7750 rpm com duração mínima de 8,5 minutos Figura 26. Para obtenção acima de 98,59% de concentração de biomassa.

Figura 25 – Parâmetros desejáveis para pontos ótimos de trabalho de centrifugação da microalga *B. braunii* (UTEX 572) por densidade óptica.



Fonte: Silva (2012).

5.3 FLOCULAÇÃO DE MICROALGAS COM AMIDO DE MANDIOCA CATIÔNICO

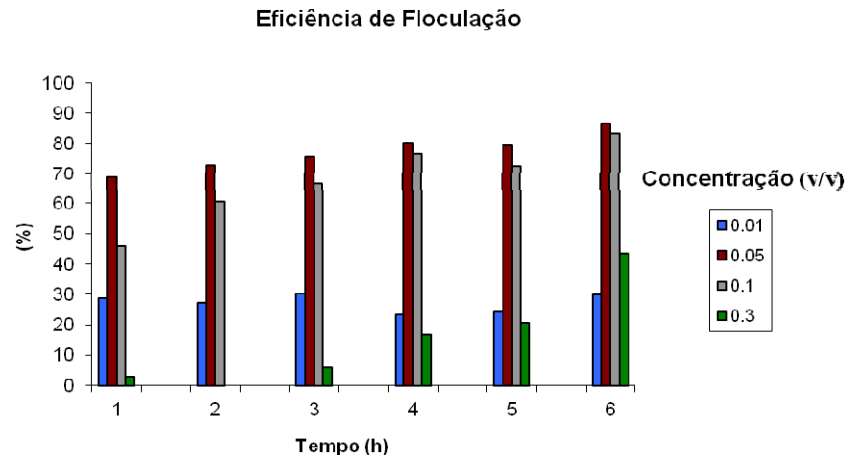
5.3.1 Microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185)

A Contagem celular da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185) no cultivo do inóculo inicial após 12 dias foi de $1,47 \cdot 10^7$ células mL^{-1} e densidade óptica 0,37. No cultivo com maior volume em aquário a contagem de células no 15º dia foi de $1,22 \cdot 10^7$ células mL^{-1} , densidade óptica 0,35 e pH de 9,0.

Os resultados evidenciaram que as taxas de floculação (68,5 a 86,6 %) foram maiores após 6 h de repouso do meio de cultivo, quando a concentração de agente floculante testada foi de 0,05 % (v/v).

Na figura 27, representa a eficiência de floculação da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185) com amido de mandioca catiônico com porcentagens de floculação chegando a 86,6 %, onde os melhores resultados foram obtidos nas concentrações de 0,05 e 0,1 % (v/v) de amido de mandioca catiônico. VANDAMME et al. (2010), obteve resultados de eficiência de floculação acima de 80 % para microalgas de água doce utilizando amido de milho catiônico.

Figura 26 – Taxa de floculação no meio de cultivo da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185) contendo diferentes concentrações do amido de mandioca catiônico (0,01; 0,05; 0,1 e 0,3 % v/v) após 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h de adição do agente floculante.



Fonte: Silva (2012).

As médias dos valores de densidade óptica a 670 nm detectados no meio de cultivo da microalga nos intervalos de tempo de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h após adição do agente floculante nas concentrações de 0,01; 0,05; 0,10 e 0,3 % v/v foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância (Tabela 10).

Tabela 10 – Densidade óptica (D.O. 670) no meio de cultivo da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185) após adição do amido de mandioca catiônico.

Concentração de floculante	Período de repouso após adição do floculante ao cultivo da microalga					
	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
zero	0,35 Aa	0,33 ABa	0,33 ABa	0,30 BCa	0,29 Ca	0,30 Ca
0,01%	0,25 Ab	0,24 ABb	0,23 ABb	0,23 ABb	0,22 ABb	0,21 Bb
0,05%	0,11 Ad	0,09 ABd	0,08 ABc	0,06 BCc	0,06 BCc	0,04 Cd
0,1%	0,19 Ac	0,13 Bc	0,11 Bc	0,07 Cc	0,08 Cc	0,05 Cd
0,3%	0,34 Aa	0,33 Aa	0,31 Aa	0,25 Bb	0,23 Bb	0,17 Cc

Coefficiente de variação (CV) = 8.21 %

¹ Médias seguidas por mesmas letras maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância

² Médias seguidas por mesmas letras minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância

Fonte: Silva (2012).

A partir da análise dos dados na Tabela 10 pode-se concluir que o tempo de floculação tem significância a partir de 1 h. A concentração de amido de

mandioca catiônico foi mais significativa entre 0,05 e 0,1%. Para avaliar os pontos ótimos e comparação do grau de significância, foi utilizado o programa STATISTICA 7.0.

A análise de variância (ANOVA) para a *N. oleoabundans* (UTEX LB 1185) indicou a participação significativa ($p > 0,05$) da variável concentração e tempo (Tabela 11). O coeficiente de regressão ($R^2=0,992$) indica que 99,2% da variabilidade pode ser explicado pelo modelo e melhor previsão de resposta (BURKERT et al., 2004; SAFARALIE et al., 2010).

Para análise de ajuste do modelo aos dados experimentais foi utilizada a relação entre *Lack of Fit* e *Pure Error* nos valores do quadrado médio, valores elevados da razão entre os dois indica falta de ajuste do modelo. O modelo apresentou um valor de 0,223 para *f*, implicando que o modelo não é significativo em relação ao puro erro experimental, confirmando a validade do modelo (TOVAR et al., 2010).

Tabela 11 – Análise da variância (ANOVA) para variável resposta D.O. da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185).

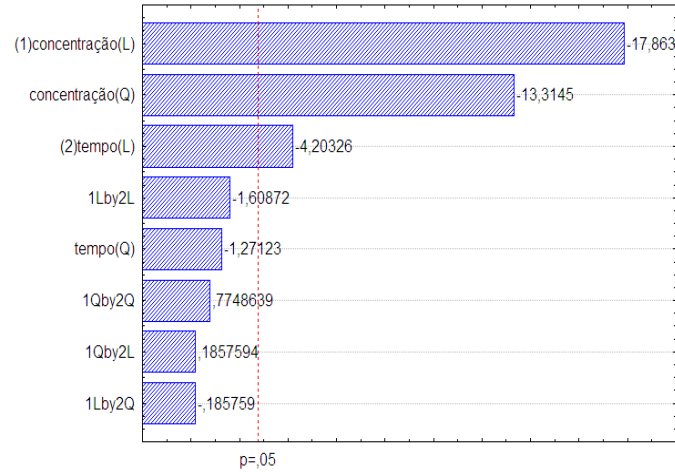
Factor	SS ^a	d.f. ^b	MS ^c	F - value	p - value
Concentração ⁽¹⁾	0,123743	2	0,061871	256,1964	0,000060
Tempo ⁽²⁾	0,004543	2	0,002271	9,4055	0,030749
1*2	0,000625	1	0,000625	2,5880	0,182960
Lack of Fit	0,000162	3	0,000054	0,2231	0,875967
Pure Error	0,000966	4	0,000242		
Total SS	0,141209	12			
$R_{sqr}=0,9920 / R^2_{adj}=0,9863$					

^a Soma dos quadrados; ^b Graus de liberdade; ^c Quadrado Médio.

Fonte: Silva (2012).

Os efeitos com maior influência e suas interações podem ser visualizados pelo gráfico de pareto (Figura 28).

Figura 27 – Representação gráfica do diagrama de Pareto para os efeitos dos parâmetros analisados sobre a densidade óptica (670 nm), obtidos pela floculação da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185) com amido de mandioca catiônico.

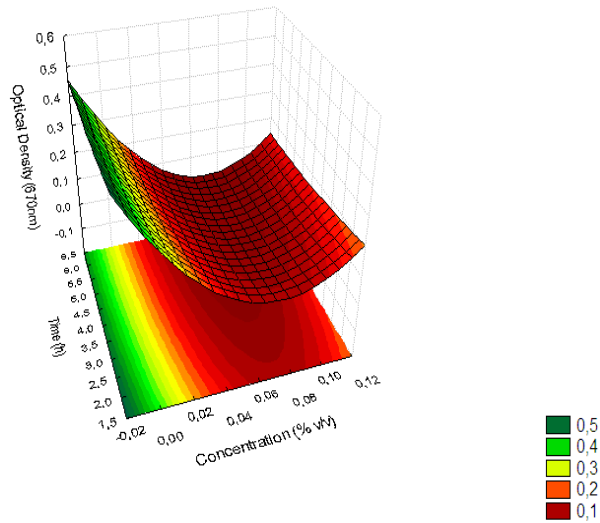


Fonte: Silva (2012).

O valor de $F_{\text{calculado}} = 64,73$ foi superior ao $F_{\text{tabelado}} = 6,04$, sendo este estatisticamente significativo (KALIL et al., 2000).

A modelagem de superfície de resposta ($Z = 0,396 - 7,467x + 52x^2 - 0,033y + 0,002y^2$) (Figura 29), descreve o comportamento de floculação da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB 1185), conforme a variação de concentração de amido de mandioca catiônico e tempo de repouso.

Figura 28 – Superfície de resposta para densidade óptica (670 nm) da *N. oleoabundans* (UTEX LB1185) em atividade de floculação nos níveis de concentração floculante e tempo de repouso.



Fonte: Silva (2012).

Conforme o teste tukey, a variável concentração possui maior nível de significância e maior atividade entre 0,05 e 0,1% v/v, o tempo também altera o comportamento da microalga. Os pontos ótimos de concentração de amido de mandioca catiônico e tempo de repouso foram obtidos através de valores previsto e desejáveis conforme o gráfico de desejabilidade (Figura 31).

Foram comparadas as médias dos valores obtidos da contagem de células (câmara de Neubauer) no meio de cultivo da microalga após adição do agente floculante em diferentes concentrações aplicando-se também o teste de Tukey a 5% de significância (Tabela 12).

Tabela 12 – Contagem de células ($\times 10^5$) (cel. mL⁻¹) no meio de cultivo da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185) após adição do amido de mandioca catiônico.

Concentração de floculante	Período de repouso após adição do floculante ao cultivo da microalga					
	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
zero	121.75 Aa	106.75 Ba	103.75 Ba	103.75 Ba	103.00 Ba	102.75 Ba
0,01%	42.62 Ab	36.12 Ab	34.81 Ac	30.37 Ac	31.87 Ab	36.02 Ab
0,05%	13.06 Ad	9.25 Ad	9.25 Ad	6.43 Ad	5.93 Ac	5.37 Ac
0,1%	27.56 Ac	21.87 ABc	18.37 ABd	12.31 Bd	12.06 Bc	9.18 Bc
0,3%	48.56 Ab	47.93 Ab	50.00 Ab	49.43ABb	34.93BCb	27.62 Cb

CV: 15.0095 %

¹ Médias seguidas por mesmas letras maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância

² Médias seguidas por mesmas letras minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância

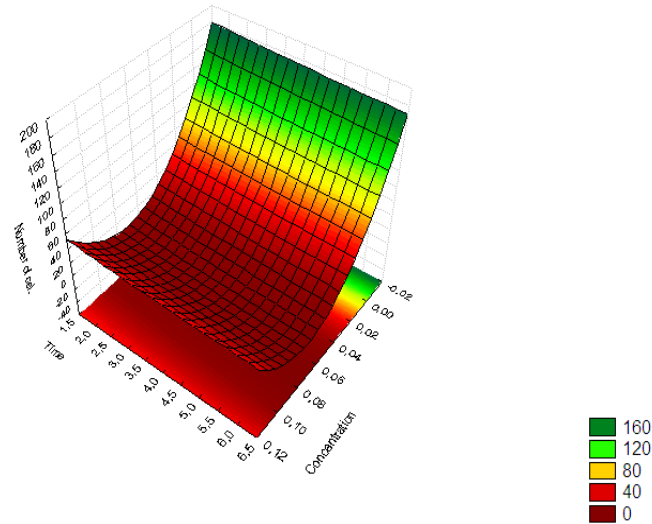
Fonte: Silva (2012).

Os valores na tabela 12 descrevem que nos menores tempos de repouso (1 e 2 h) todas as concentrações se diferiram do controle (zero) e a melhor concentração para flocular a microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185) foi a concentração a 0,05% e a partir de 3 h a melhor faixa de concentração de amido de mandioca catiônico para flocular a microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185) foram entre 0,05 e 0,1%.

Para avaliar os pontos ótimos e comparação do grau de significância, foi utilizado o programa STATISTICA 7.0. A análise estatística indicou a participação significativa ($p > 0,05$) da variável concentração e tempo como visto no tratamento de dados para densidade óptica. A variável tempo também interferiu significativamente nos resultados de contagem de células.

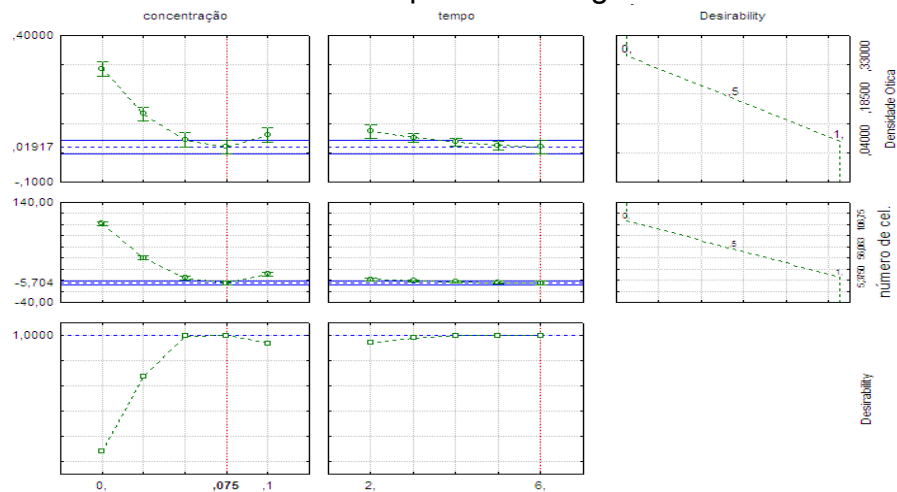
A modelagem de superfície ($z = 114,760 - 3028,204x + 21186,206x^2 - 3,207y + 0,186y^2$), de resposta (Figura 30) descreve o comportamento da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185) em número de células frente à atividade de floculação sob diferentes níveis de concentração e tempo.

Figura 29 – Superfície de resposta do número de células ($\times 10^5$) (cel. mL⁻¹) *N. oleoabundans* (UTEX LB1185) em atividade de floculação com diferentes níveis de amido de mandioca catiônico e tempo de repouso.



Fonte: Silva (2012).

Figura 30 – Parâmetros desejáveis para pontos ótimos de trabalho para floculação da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185) com amido de mandioca catiônico por densidade óptica e contagem celular.



Fonte: Silva (2012).

O gráfico de desejabilidade apresentado na figura 31 revela o comportamento da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185) em atividade de floculação frente à adição de diferentes níveis de amido de mandioca catiônico e tempo de repouso. Para alcançar o valor de densidade óptica e contagem celular igual a 0 sugere-se que os pontos ótimos de trabalho sejam de 0,075 % v/v de

floculante e 6 h de repouso. A faixa de segurança de trabalho pode conter uma variação para concentração de floculante sendo de 0,05 e 0,075%v/v, o tempo de repouso é seguro a partir de 4 h.

O teste de Tukey a 5% de significância foi também aplicado para comparar as médias dos valores de pH detectados no meio de cultivo da microalga nos intervalos de tempo de 1, 3 e 6 h após adição do agente floculante em diferentes concentrações (Tabela 13).

Tabela 13 – Medidas de pH no meio de cultivo da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185) após adição do agente floculante (amido de mandioca catiônico).

Concentração	Tempo (h)		
	1	3	6
Controle	9,06 Aa	9,06 Aa	8,98 Aa
0,01%	8,92 Aa	8,79 Ab	8,27 Bc
0,05%	9,08 Aa	8,98 Aa	8,68 Bb
0,1%	9,00 Aa	8,96 Aa	8,69 Bb
0,3%	8,98 Aa	8,90 Aab	8,55 Bb

CV: 0,9336%

¹ Médias seguidas por mesmas letras maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância.

² Médias seguidas por mesmas letras minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância.

Fonte: Silva (2012).

De acordo com os resultados apresentados na tabela 13 pode-se concluir que após 6 h de repouso, o pH do controle, sem adição de floculante, não obteve variação sob o ponto de vista estatístico.

Na concentração de 0,01; 0,05; 0,1 e 0,3 % (v/v), o pH no intervalo de 1 h, estatisticamente permaneceram sem alterações, contudo, após 3 a 6 h, houve diferenças significativas no pH.

5.3.2 Microalga *C. Vulgaris* (IPR-*Chlv7123*)

A densidade celular da microalga *C. vulgaris* (IPR-*Chlv7123*) no cultivo do inóculo inicial após 15° dias foi de 0,257 e contagem de células de $6,3 \cdot 10^6$ células mL⁻¹ e pH 8,3.

A densidade celular da microalga *C. vulgaris* (IPR-*Chlv7123*) no 10° dia de cultivo em fotobiorreator vertical em saco plástico transparente foi de 0,129, contagem celular de $3,32 \cdot 10^6$ cel. mL⁻¹ e pH de 8.4.

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) utilizando-se o software *STATISTICA 7.0* para verificar qual a concentração mais adequada de agente floculante em relação ao pH e tempo de repouso do meio de cultivo.

No experimento de floculação da microalga *C. vulgaris* (IPR-*Chlv7123*)

O coeficiente de regressão ($R_{sqr}=0,998$) (Tabela 14) corresponde que 99,8% da variabilidade pode ser explicado pelo modelo e melhor previsão de resposta. (BURKERT et al., 2004; SAFARALIE et al., 2010).

Tabela 14 – Análise da variância (ANOVA) para variável resposta D.O. da microalga *C. vulgaris* (IPR-*Chlv7123*).

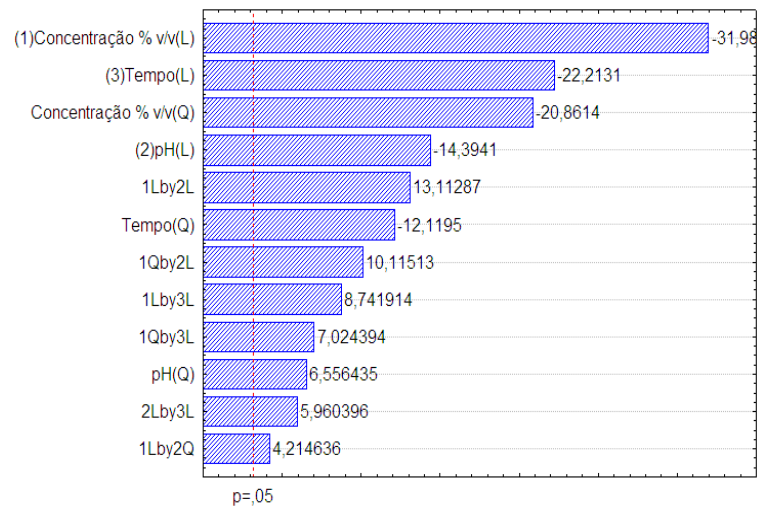
Factor	SS ^a	d.f. ^b	MS ^c	F - value	p - value
Concentração % v/v ⁽¹⁾	0,002309	2	0,001155	729,1776	0,000093
pH ⁽²⁾	0,000396	2	0,000198	125,0882	0,001290
Tempo ⁽³⁾	0,001014	2	0,000507	320,1513	0,000318
1*2	0,000462	3	0,000154	97,3421	0,001735
1*3	0,000199	2	0,000100	62,8816	0,003556
2*3	0,000056	1	0,000056	35,5263	0,009447
Pure Error	0,000005	3	0,000002		
Total SS	0,004289	15			
$R_{sqr}=0,998 / R^2_{adj}=0,994$					

^a Soma dos quadrados; ^b Graus de liberdade; ^c Quadrado Médio.

Fonte: Silva (2012).

Os efeitos com maior influência e suas interações podem ser visualizados pelo gráfico de pareto (Figura 32). Observa-se a importância das variáveis concentração, pH e tempo de repouso.

Figura 31 – Representação gráfica do diagrama de Pareto para os efeitos dos parâmetros analisados sobre a densidade óptica (670 nm), obtidos pela floculação da microalga *C. vulgaris* (IPR-*Chlv7123*) com amido de mandioca catiônico.

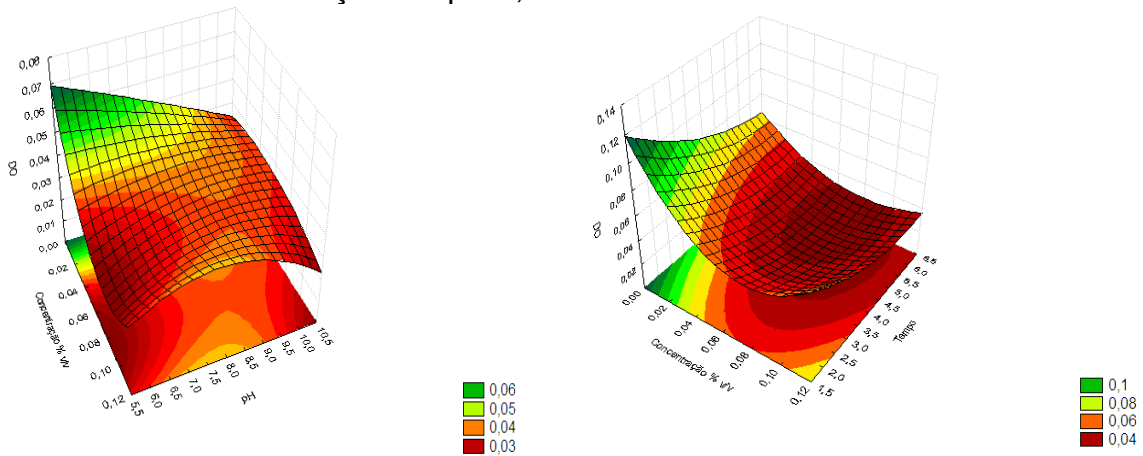


Fonte: Silva (2012).

O valor de $F_{\text{calculado}} = 184,86$ foi superior ao $F_{\text{tabelado}} = 8,74$, sendo este estatisticamente significativo (KALIL et al., 2000).

As equações que descrevem a modelagem de superfície de resposta para densidade óptica, para as variáveis pH e concentração no tempo de 6 h de repouso $z = 0,2240 - 4,794x + 24,649x^2 - 0,011y - 93 \cdot 10^{-5}y^2 + 0,562xy - 0,018xy^2 - 1,799x^2y + 0,18 \cdot 6x - 1,25 \cdot 6x^2 + 0,0009 \cdot 6y - 0,121$ e para variação de tempo e concentração no pH 6,0 $z = 0,224 - 4,794x + 24,649x^2 - 0,031y + 0,001y^2 + 0,562 \cdot 6x - 0,018 \cdot 36x - 1,799 \cdot 6x^2 + 0,18xy - 1,25x^2y + 0,00090 \cdot 6y - 0,070$, estão apresentadas na (Figura 33). A separação da microalga *C. vulgaris* (IPR-*Chlv7123*) do meio de cultivo por floculação com amido de mandioca catiônico variou de acordo com a concentração de amido de mandioca catiônico, o pH e o tempo de repouso.

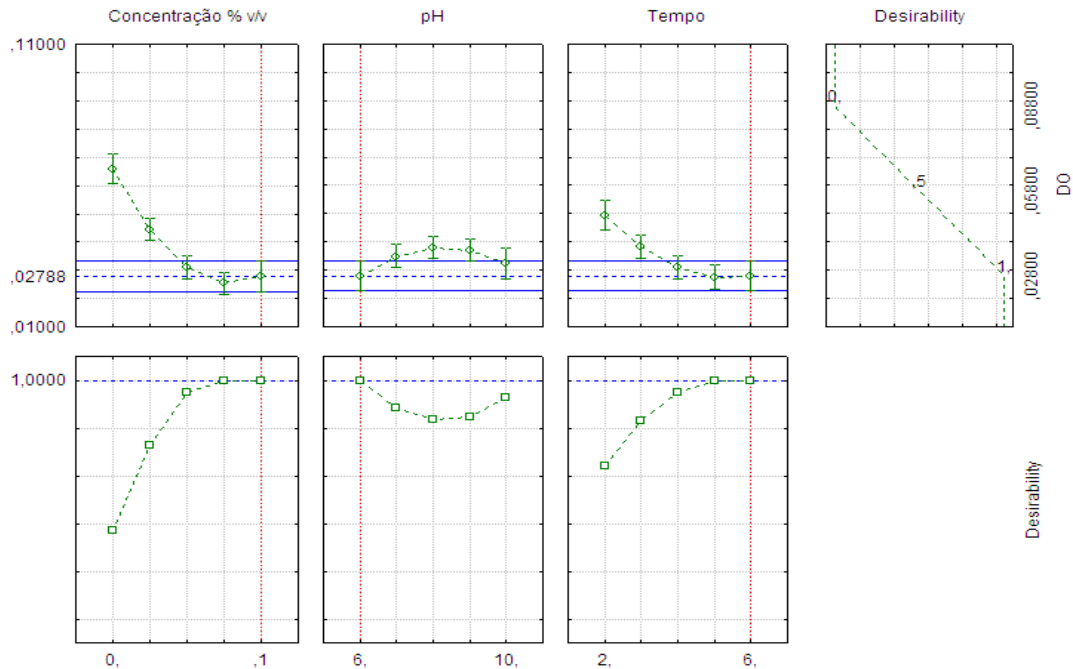
Figura 32 – Superfície de resposta para densidade óptica do meio de cultivo da microalga *C. vulgaris* (IPR-*Chlv7123*), com variação do pH, concentração em tempo de 6 h de repouso e variação de tempo e concentração em pH 6,0.



Fonte: Silva (2012).

O gráfico de desejabilidade apresentado na figura 33 revela o comportamento da microalga *C. vulgaris* (IPR-*Chlv7123*) em atividade de floculação frente à adição de diferentes níveis de amido de mandioca catiônico, pH e tempo de repouso. Para alcançar o valor de densidade óptica próximo a 0 sugere-se que os pontos ótimos de trabalho sejam de 0,1 % v/v de floculante, pH 6,0 e 6 h de repouso. A faixa de segurança de trabalho pode conter uma variação para concentração de floculante sendo de 0,075 e 0,1 %v/v, o tempo de repouso é seguro a partir de 5 h em pH 6,0 (Figura 34). Com a combinação destes fatores a eficiência de floculação alcançada é acima de 71 %.

Figura 33 – Parâmetros desejáveis para pontos ótimos de trabalho para floculação da microalga *C. vulgaris* (IPR-*Chlv7123*) com amido de mandioca catiônico por densidade óptica.



Fonte: Silva (2012).

5.3.3 Microalga *B. braunii* (UTEX 572)

A densidade óptica do cultivo da microalga *B. braunii* (UTEX 572) no 15º de cultivo foi de 0,166 e pH de 7,5.

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) utilizando-se o software *STATISTICA 7.0* para verificar qual a concentração mais adequada de agente floculante em relação ao pH e tempo de repouso do meio de cultivo.

No experimento de floculação da microalga *B. braunii* (UTEX 572) com amido de mandioca catiônico a análise estatística indicou significativa ($p > 0,05$) a variável concentração, desta forma esta variável apresenta maior grau de significância perante as variáveis pH e tempo.

O coeficiente de regressão ($R^2=0,984$) (Tabela 15) corresponde que 98,4% da variabilidade pode ser explicado pelo modelo e melhor previsão de resposta (BURKERT et al., 2004; SAFARALIE et al., 2010).

Para análise de ajuste do modelo aos dados experimentais foi utilizada a relação entre *Lack of Fit* e *Pure Error* nos valores do quadrado médio, valores elevados da razão entre os dois indica falta de ajuste do modelo. O modelo

apresentou um valor de 0,937 para f , implicando que o modelo não é significativo em relação ao puro erro experimental, confirmando a validade do modelo (TOVAR et al., 2010).

Tabela 15 – Análise da variância (ANOVA) para resposta em D.O da microalga *B. braunii* (UTEX 572).

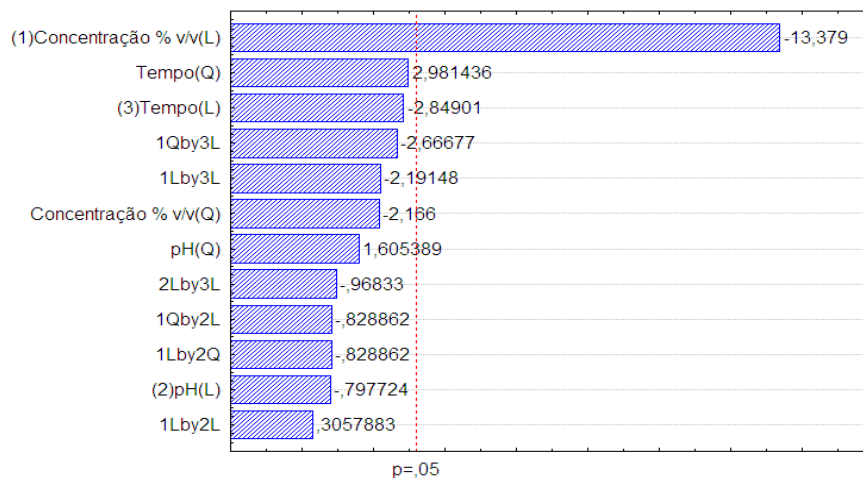
Factor	SS ^a	d.f. ^b	MS ^c	F - value	p - value
Concentração ⁽¹⁾	0,017680	2	0,008840	91,84422	0,002037
pH ⁽²⁾	0,000416	2	0,000208	2,16240	0,262113
Tempo ⁽³⁾	0,001637	2	0,000818	8,50292	0,058069
1*2	0,000075	2	0,000038	0,39026	0,706895
1*3	0,001147	2	0,000573	5,95714	0,090215
2*3	0,000066	1	0,000066	0,68701	0,467970
Lack of Fit	0,000090	1	0,000090	0,93766	0,404306
Pure Error	0,000289	3	0,000096		
Total SS	0,024700	15			
$R^2=0,9846 / R^2_{adj}=0,9424$					

^a Soma dos quadrados; ^b Graus de liberdade; ^c Quadrado Médio.

Fonte: Silva (2012).

Os efeitos com maior influência e suas interações podem ser visualizados pelo gráfico de pareto (Figura 35),

Figura 34 – Representação gráfica do diagrama de Pareto para os efeitos dos parâmetros analisados sobre a densidade óptica da microalga *B. braunii* (UTEX 572) (670 nm), obtidos pela floculação com amido de mandioca catiônico.

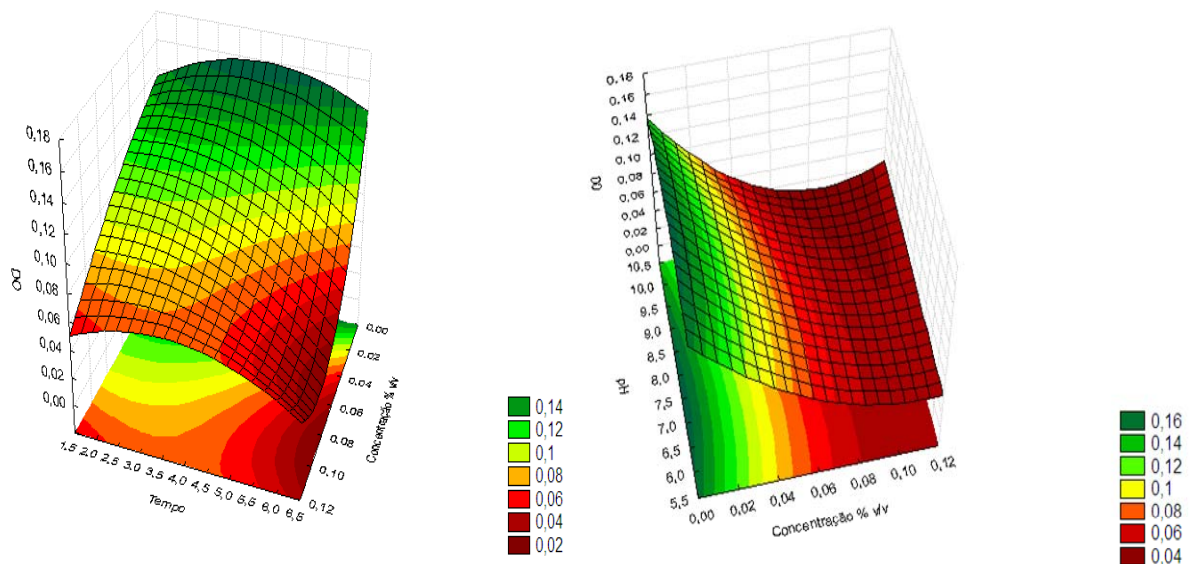


Fonte: Silva (2012).

O valor de $F_{\text{calculado}} = 18,23$ foi superior ao $F_{\text{tabelado}} = 8,74$ (KALIL et al , 2000).

A modelagem de superfície de resposta para D.O. descrita pelas equações: para tempo e concentração no pH 8,0 $z = -0,142 + 3,070x - 19,749x^2 + 0,042y - 0,003y^2 - 0,560.8x + 0,028.64x + 1,149.8x^2 - 0,477xy + 3,699x^2y - 0,001.8y + 0,246$. Para as variáveis concentração e pH no tempo de 6h $z = -0,142 + 3,070x - 19,749x^2 + 0,058y - 0,003y^2 - 0,560xy + 0,028xy^2 + 1,149x^2y - 0,477.6x + 3,699.6x^2 - 0,001.6y + 0,120$, esta representada na (Figura 36).

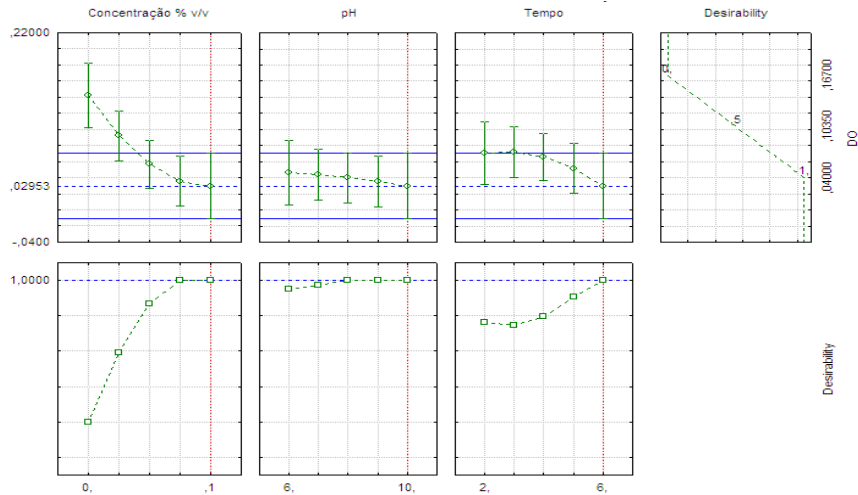
Figura 35 – Superfície de resposta para densidade óptica do meio de cultivo da microalga *B. braunii* (UTEX 572), no pH 8,0 com variação de tempo e concentração de amido de mandioca catiônico e a superfície de resposta no tempo 6 h de repouso com variação no pH e concentração de amido de mandioca catiônico.



Fonte: Silva (2012).

Ao avaliar os três fatores em conjunto segundo ANOVA, a concentração é o fator mais significativo no nível de 5%. A combinação de concentração e tempo possui valores desejáveis de sedimentação a partir de 0,075% a 0,1% v/v de amido de mandioca catiônico e 6 h de repouso (Figura 37). A combinação de concentração e pH sugere uma faixa de pH de 8,0 a 10. Com a combinação destes fatores a eficiência de floculação alcançada é acima de 75 %.

Figura 36 – Parâmetros desejáveis para pontos ótimos de trabalho para floculação da microalga *B. braunii* (UTEX 572) com amido de mandioca catiônico por densidade óptica.



Fonte: Silva (2012).

5.4 FLOCULAÇÃO DE MICROALGAS POR INDUÇÃO ALCALINA DO PH

5.4.1 Microalga *N. Oleoabundans* (UTEX LB 1185)

A densidade celular da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185) no cultivo do inóculo inicial após 13 dias foi de 0,15 e contagem de células $5,05 \cdot 10^6 \text{ mL}^{-1}$ e pH 8,3.

A densidade celular da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185) no 12º dia de cultivo em aquário de vidro foi de 0,168 e pH de 6,9 contagem de células $5,4 \cdot 10^6 \text{ mL}^{-1}$.

No experimento de floculação da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185) pela indução alcalina do pH no meio de cultivo, a análise estatística indicou significativa ($p > 0,05$) a variável pH e tempo, desta forma estas variáveis apresentam significância perante ao resultado final da densidade óptica.

O coeficiente de regressão ($R^2=0,991$) (Tabela 16) corresponde que 99,1% da variabilidade pode ser explicado pelo modelo e melhor previsão de resposta (BURKERT et al., 2004; SAFARALIE et al., 2010).

Para análise de ajuste do modelo aos dados experimentais foi utilizada a relação entre *Lack of Fit* e *Pure Error* nos valores do quadrado médio,

valores elevados da razão entre os dois indica falta de ajuste do modelo. O modelo apresentou um valor de 0,116 para f , implicando que o modelo não é significativo em relação ao puro erro experimental, confirmando a validade do modelo (TOVAR et al., 2010).

Tabela 16 – Análise da variância (ANOVA) para variável resposta D.O. da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185).

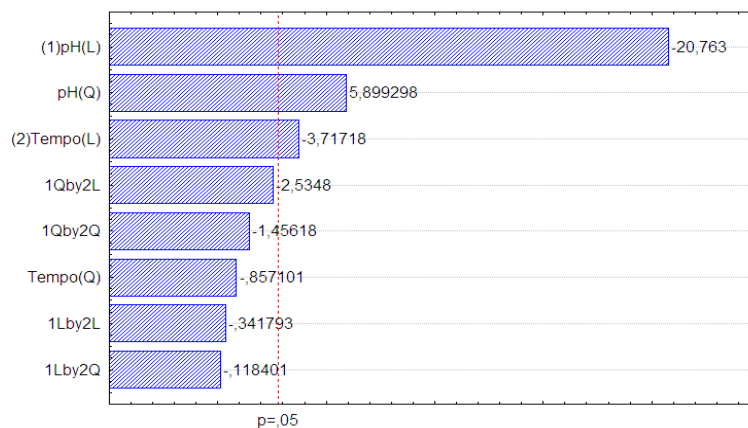
Factor	SS ^a	d.f. ^b	MS ^c	F - value	p - value
pH ⁽¹⁾	0,024926	2	0,012463	232,9523	0,000072
Tempo ⁽²⁾	0,000755	2	0,000378	7,0570	0,048763
1*2	0,000398	3	0,000133	2,4775	0,200704
Lack of Fit	0,000006	1	0,000006	0,1168	0,749709
Pure Error	0,000214	4	0,000053		
Total SS	0,025889	12	0,012463		
$R^2=0,991 / R^2_{adj}=0,979$					

^a Soma dos quadrados; ^b Graus de liberdade; ^c Quadrado Médio.

Fonte: Silva (2012).

Os efeitos com maior influência e suas interações podem ser visualizados pelo gráfico de pareto (Figura 38). Observa-se a importância das variáveis tempo e indução alcalina do pH.

Figura 37 – Representação gráfica do diagrama de Pareto para os efeitos dos parâmetros analisados sobre a densidade óptica (670 nm), obtidos pela indução alcalina do pH da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185).

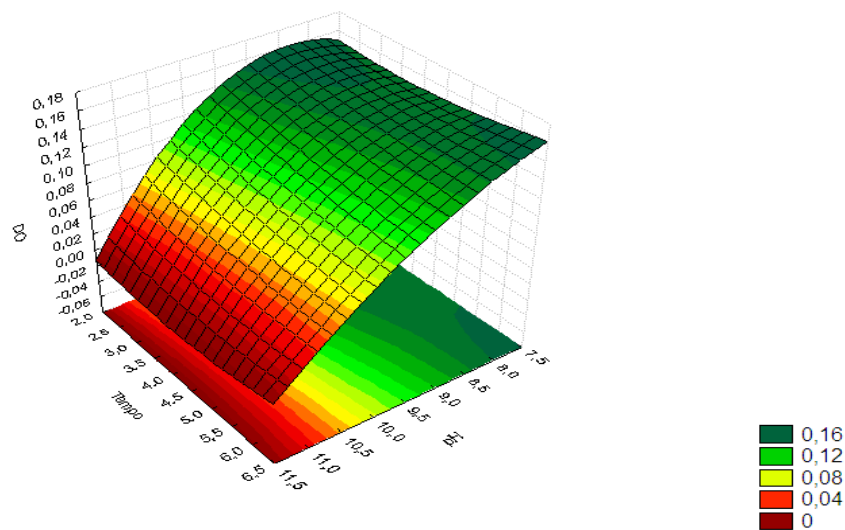


Fonte: Silva (2012).

O valor de $F_{\text{calculado}} = 61,71$ foi superior ao $F_{\text{tabelado}} = 6,04$, sendo este estatisticamente significativo (KALIL et al., 2000).

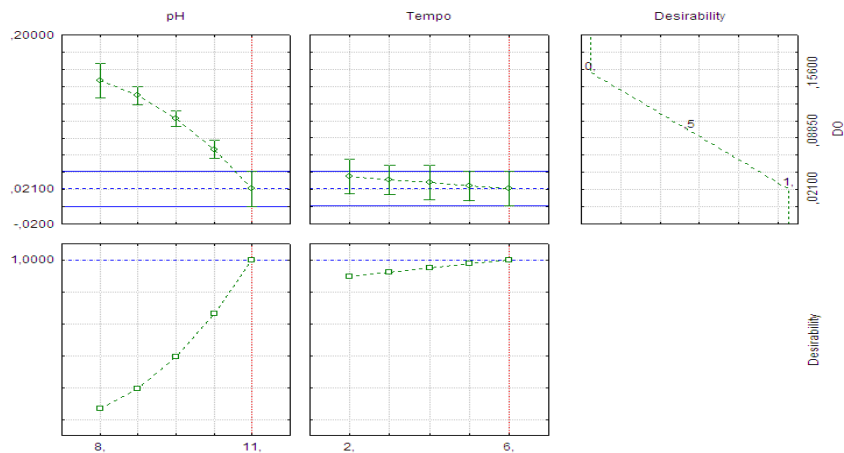
A modelagem de superfície de resposta $z = -1,111 + 0,307x - 0,018x^2 - 0,010y + 0,027y^2 - 0,005xy^2 - 3,818 \cdot 10^{-5}x^2y + 0,0003x^2y^2$, (Figura 39), descreve o comportamento de floculação da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185), conforme a variação de tempo de repouso e a indução alcalina do pH.

Figura 38 – Superfície de resposta para densidade óptica (670 nm) em atividade de floculação da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185) pela indução alcalina do pH e tempo de repouso.



Fonte: Silva (2012).

Figura 39 – Parâmetros desejáveis para pontos ótimos de trabalho para floculação da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185) pela indução alcalina do pH por densidade óptica.



Fonte: Silva (2012).

O gráfico de desejabilidade apresentado na figura 40, revela o comportamento da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185) em atividade de floculação frente a indução alcalina do pH e tempo de repouso. Para alcançar o valor de densidade óptica próximo a 0 sugere-se que os pontos ótimos de trabalho sejam no pH de 11 e 6 h de repouso. Com a combinação destes fatores a eficiência de floculação alcançada é acima de 87 %. Richmond (2004) descreve que a eficiência de floculação alcançada por indução alcalina do pH entre 11 e 12 é em média de 80%. Vandamme et al. (2011) obteve resultados de eficiência de floculação induzindo o pH a 11 acima de 75%, utilizando microalgas de água doce.

5.4.2 Microalga *B. Braunii* (UTEX 572)

A densidade celular da microalga no 13º dia de cultivo da microalga *B. braunii* (UTEX 572) foi de 0,139 e pH de 7,3.

No experimento de floculação da microalga *B. braunii* (UTEX 572) pela indução alcalina do pH no meio de cultivo, a análise estatística indicou significativa ($p > 0,05$) a variável indução alcalina do pH e tempo, desta forma estas variáveis apresentam significância perante ao resultado final de D.O.

O coeficiente de regressão ($R^2=0,975$) (Tabela 17), corresponde que 97,5% da variabilidade pode ser explicado pelo modelo e melhor previsão de resposta (BURKERT et al., 2004; SAFARALIE et al., 2010).

Para análise de ajuste do modelo aos dados experimentais foi utilizada a relação entre *Lack of Fit* e *Pure Error*, valores elevados da razão entre os dois indica falta de ajuste do modelo. O modelo apresentou um valor de 2,17 para *f*, implicando que o modelo não é significativo em relação ao puro erro experimental, confirmando a validade do modelo (TOVAR et al., 2010).

Tabela 17 – Análise da variância (ANOVA) para resposta em D.O da microalga *B. braunii* (UTEX 572) no método da indução alcalina.

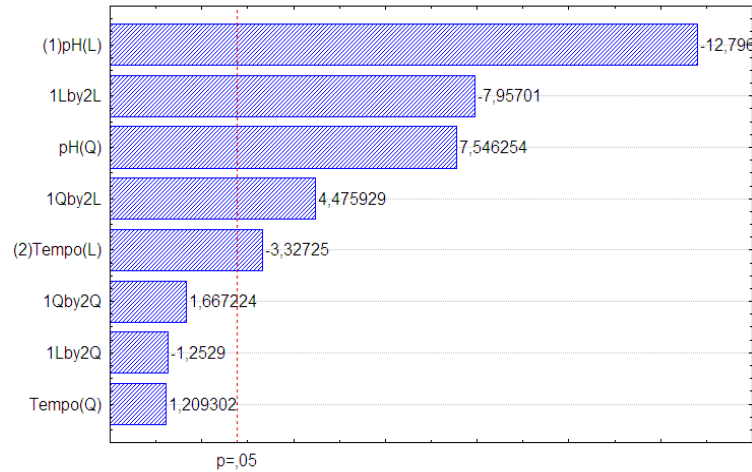
Factor	SS ^a	d.f. ^b	MS ^c	F - value	p - value
pH ⁽¹⁾	0,008447	2	0,004223	109,1297	0,000324
Tempo ⁽²⁾	0,000597	2	0,000299	7,7179	0,042356
1*2	0,003145	2	0,001573	40,6363	0,002200
Lack of Fit	0,000168	2	0,000084	2,1747	0,229514
Pure Error	0,000155	4	0,000039		
Total SS	0,013121	12			
$R^2=0,975 / R^2_{adj}=0,95$					

^a Soma dos quadrados; ^b Graus de liberdade; ^c Quadrado Médio.

Fonte: Silva (2012).

Os efeitos com maior influência e suas interações podem ser visualizados pelo gráfico de pareto (Figura 41).

Figura 40 – Representação gráfica do diagrama de Pareto para os efeitos dos parâmetros analisados sobre a densidade óptica (670 nm), obtidos pela indução alcalina do pH da microalga *B. braunii* (UTEX 572).

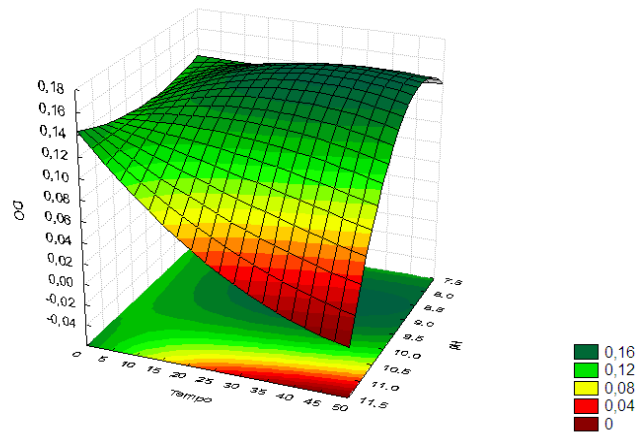


Fonte: Silva (2012).

O valor de $F_{\text{calculado}}=39,80$ foi superior ao $F_{\text{tabelado}}=6,04$, sendo este estatisticamente significativo (KALIL et al., 2000).

A modelagem de superfície de resposta para D.O descrita pela equação: $z=0,421-0,065x+0,003x^2-0,092y+0,001y^2+0,021xy-2,615 \cdot 10^{-4}xy^2-0,001x^2y+1,42710^{-5}x^2y^2$ para tempo e pH está representada na Figura 42.

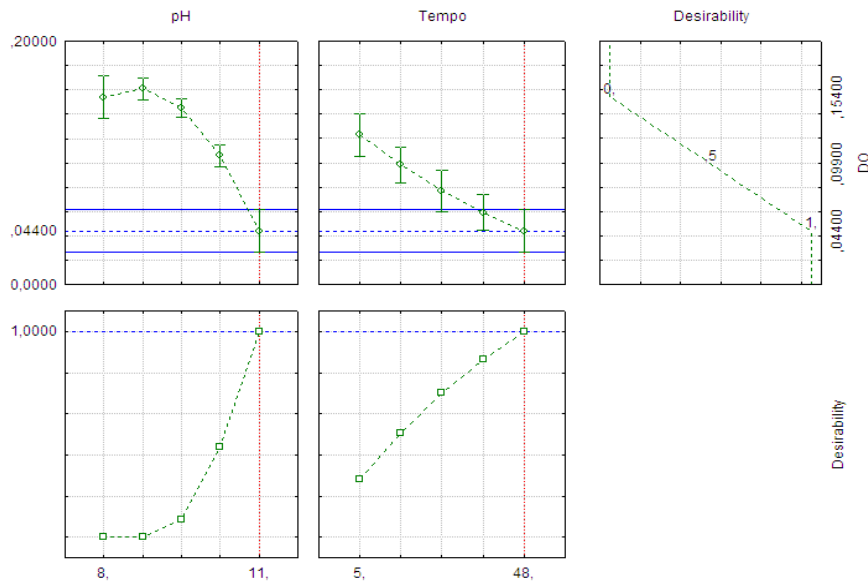
Figura 41 – Superfície de resposta para densidade óptica das amostras do sobrenadante da microalga *B. braunii* (UTEX 572) após indução do pH e tempo de repouso.



Fonte: Silva (2012).

A combinação das variáveis tempo e pH, possui valores desejáveis para densidade óptica nula em indução do pH a 11 e tempo de repouso em 48 h indicando que este é o ponto ótimo de trabalho quando se busca flocular a microalga *B. braunii* (UTEX 572) do meio de cultivo por indução alcalina do pH (Figura 43). Com a combinação destes fatores a eficiência de floculação alcançada é acima de 68 %.

Figura 42 – Parâmetros desejáveis para pontos ótimos de trabalho para floculação da microalga *B. braunii* (UTEX 572) por indução alcalina do pH por densidade óptica.



Fonte: Silva (2012).

5.5 FLOCULAÇÃO DE MICROALGAS COM PAC - POLICLORETO DE ALUMÍNIO

5.5.1 Microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185)

A densidade celular da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185) no cultivo do inóculo inicial após 13^o dias foi de 0,15 e contagem de células $5,05 \cdot 10^6$ mL⁻¹ e pH 8,3.

No cultivo em aquário de vidro a densidade óptica ao final de 13 dias foi de 0,138 e pH foi igual a 6,9 contagem de células $4,6 \cdot 10^6$ mL⁻¹.

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) utilizando-se o software *STATISTICA 7.0* para verificar qual a concentração mais adequada de agente floculante em relação ao pH e tempo de repouso do meio de cultivo.

No experimento de floculação da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185) com policloreto de alumínio a análise estatística indicou significativa ($p > 0,05$) das variáveis concentração (PPM), pH e tempo de repouso, visto que as três variáveis interferem no resultado final do experimento.

O coeficiente de regressão ($R^2=0,999$) (Tabela 18), corresponde que 99,9% da variabilidade pode ser explicado pelo modelo e melhor previsão de resposta (BURKERT et al., 2004; SAFARALIE et al., 2010).

Tabela 18 – Análise da variância (ANOVA) para resposta em D.O da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185).

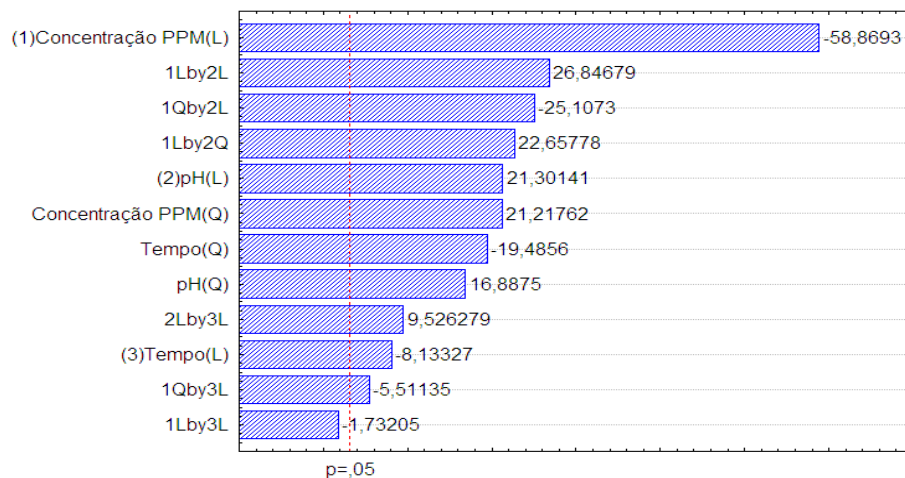
Factor	SS ^a	d.f. ^b	MS ^c	F - value	p - value
Concentração ppm ⁽¹⁾	0,005221	2	0,002611	1957,894	0,000021
pH ⁽²⁾	0,000985	2	0,000493	369,469	0,000257
Tempo ⁽³⁾	0,000594	2	0,000297	222,919	0,000546
1*2	0,002486	3	0,000829	621,500	0,000109
1*3	0,000045	2	0,000022	16,688	0,023685
2*3	0,000121	1	0,000121	90,750	0,002453
Pure Error	0,000004	3	0,000001		
Total SS	0,008512	15			
$R^2= 0,999 / R^2_{adj}= 0,997$					

^a Soma dos quadrados; ^b Graus de liberdade; ^c Quadrado Médio.

Fonte: Silva (2012).

Os efeitos com maior influência e suas interações podem ser visualizados pelo gráfico de pareto (Figura 44).

Figura 43 – Representação gráfica do diagrama de Pareto para os efeitos dos parâmetros analisados sobre a densidade óptica (670 nm), obtidos pela floculação com policloreto de alumínio-PAC da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185).

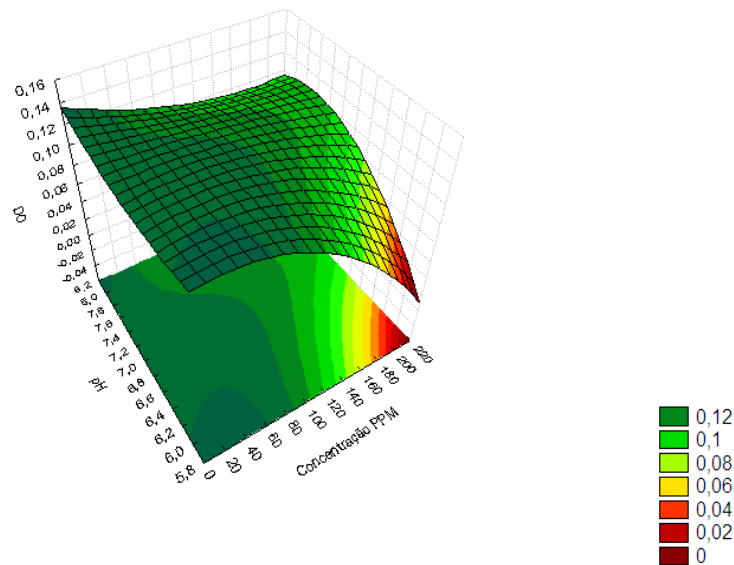


Fonte: Silva (2012).

O valor de $F_{\text{calculado}} = 64,73$ foi superior ao $F_{\text{tabelado}} = 8,74$, sendo este estatisticamente significativo (KALIL et al., 2000).

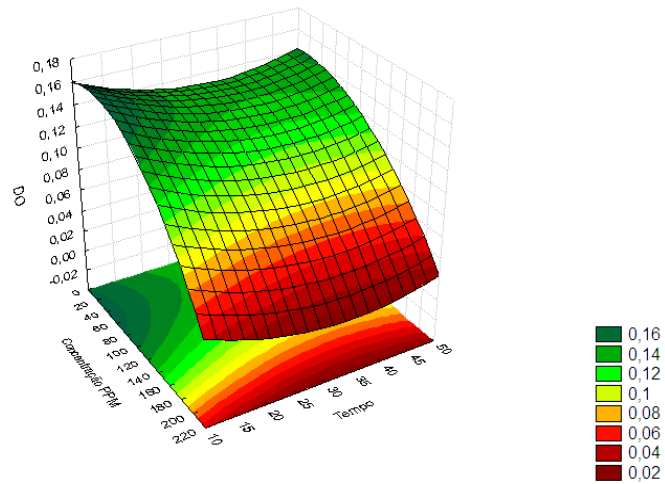
A modelagem de superfície de resposta ($z = 0,672 - 0,006x - 1,6 \cdot 10^{-5}x^2 - 0,133y + 0,008y^2 + 0,002xy - 0,0001xy^2 + 2,051 - 6x^2y - 6,6 \cdot 10^{-6} \cdot 30x + 3 \cdot 10^{-8} \cdot 30x^2 + 0,0003 \cdot 30y - 0,124$), descreve o comportamento de floculação da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185), conforme a variação de concentração de policloreto de alumínio, pH e tempo igual a 30 minutos (Figura 45). A modelagem de superfície de resposta ($z = 0,672 - 0,006x - 1,64 \cdot 10^{-5}x^2 - 0,005y + 5 \cdot 10^{-4}y^2 + 0,002 \cdot 6x - 0,0001 \cdot 36x + 2 \cdot 10^{-6} \cdot 6x^2 - 6,6 \cdot 10^{-6}xy + 3 \cdot 10^{-8}x^2y + 0,0003 \cdot 6y - 0,483$) descreve o comportamento de floculação da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185), conforme a variação de concentração de policloreto de alumínio e tempo em pH 6,0 (Figura 46).

Figura 44 – Superfície de resposta para densidade óptica do meio de cultivo da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185), conforme a variação de concentração de policloreto de alumínio, pH e tempo igual a 30 minutos.



Fonte: Silva (2012).

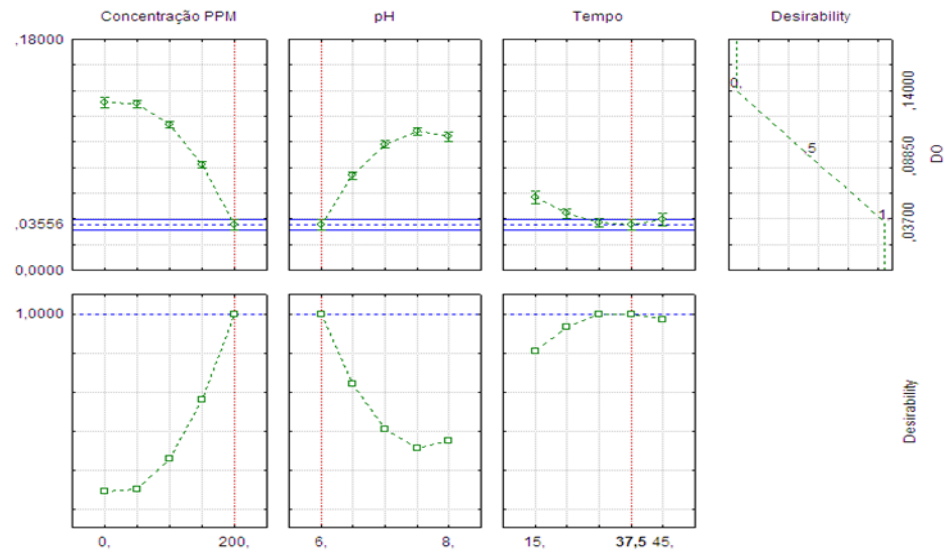
Figura 45 – Superfície de resposta para densidade óptica do meio de cultivo da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185), conforme a variação de concentração de policloreto de alumínio e tempo pH 6,0.



Fonte: Silva (2012).

O gráfico de desejabilidade apresentado na figura 47, revela o comportamento da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185) em atividade de floculação frente à adição de diferentes níveis de policloreto de alumínio, pH e tempo de repouso. Para alcançar o valor de densidade óptica próximo a 0 sugere-se que os pontos ótimos de trabalho sejam de 200 ppm de policloreto de alumínio, pH 6,0 e 37,5 min de repouso. A faixa de segurança de trabalho pode conter uma variação para o tempo de repouso, a partir de 30 min. Com a combinação destes fatores a eficiência de floculação alcançada é acima de 78%.

Figura 46 – Parâmetros desejáveis para pontos ótimos de trabalho para floculação da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185) com policloreto de alumínio- PAC por densidade óptica.



Fonte: Silva (2012).

5.5.2 Microalga *C. Vulgaris* (IPR-*Chlv7123*)

A densidade celular da microalga *C. vulgaris* (IPR-*Chlv7123*) no cultivo do inóculo inicial após 15° dias foi de 0,257 e contagem de células de $6,3 \cdot 10^6$ células mL⁻¹ e pH 8,3.

A densidade óptica ao final de 10 dias de cultivo da microalga *C. vulgaris* (IPR-*Chlv7123*) em fotobiorreator vertical em saco plástico transparente, foi de 0,129, contagem celular de $3,32 \cdot 10^6$ cel. mL⁻¹ e pH de cultivo de 8,34.

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) utilizando-se o software *STATISTICA 7.0* para verificar qual a concentração mais adequada de agente floculante em relação ao pH e tempo de repouso do meio de cultivo.

No experimento de floculação da microalga *C. vulgaris* (IPR-*Chlv7123*) com policloreto de alumínio a análise estatística indicou significativa ($p > 0,05$) das variáveis concentração, pH e tempo de repouso, visto que as três variáveis interferem no resultado final do experimento.

O coeficiente de regressão ($R^2 = 0,966$) (Tabela 19), corresponde que 96,6% da variabilidade pode ser explicado pelo modelo e melhor previsão de resposta (BURKERT et al., 2004; SAFARALIE et al., 2010).

Para análise de ajuste do modelo aos dados experimentais foi utilizada a relação entre *Lack of Fit* e *Pure Error* nos valores do quadrado médio, valores elevados da razão entre os dois indica falta de ajuste do modelo. O modelo apresentou um valor de 0,85 para *f*, implicando que o modelo não é significativo em relação ao puro erro experimental, confirmando a validade do modelo (TOVAR et al., 2010).

Tabela 19 – Análise da variância (ANOVA) para resposta em D.O da microalga *C. vulgaris* (IPR-*Chlv7123*).

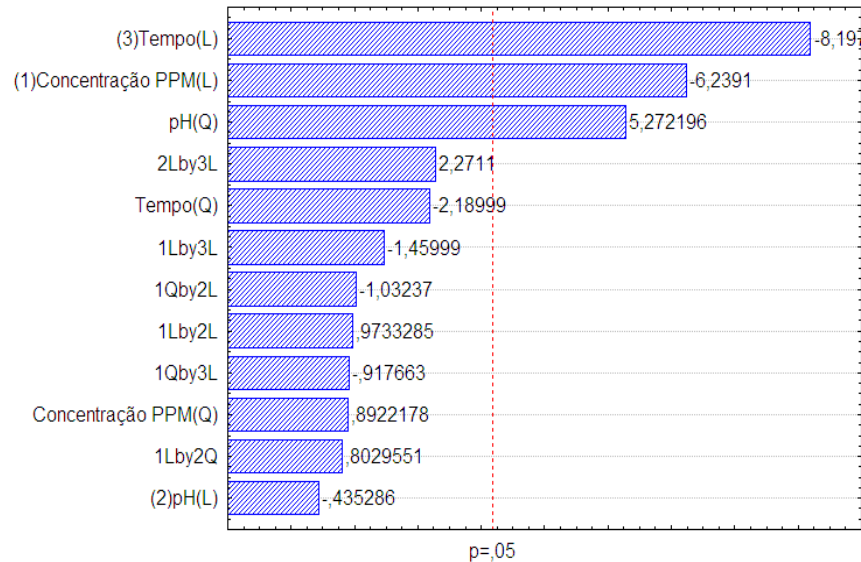
Factor	SS ^a	d.f. ^b	MS ^c	F - value	p - value
Concentração PPM ⁽¹⁾	0,001543	2	0,000771	20,29934	0,018050
pH ⁽²⁾	0,001081	2	0,000540	14,22039	0,029474
Tempo ⁽³⁾	0,003224	2	0,001612	42,42434	0,006311
1*2	0,000036	1	0,000036	0,94737	0,402179
1*3	0,000081	1	0,000081	2,13158	0,240410
2*3	0,000196	1	0,000196	5,15789	0,107816
Lack of Fit	0,000097	3	0,000032	0,85088	0,551236
Pure Error	0,000114	3	0,000038		
Total SS	0,006372	15	0,000771		
$R^2 = 0,966 / R^2_{adj} = 0,917$					

^a Soma dos quadrados; ^b Graus de liberdade; ^c Quadrado Médio.

Fonte: Silva (2012).

Os efeitos com maior influência e suas interações podem ser visualizados pelo gráfico de pareto (Figura 48), no qual o comprimento da barra é proporcional à importância do efeito, ultrapassado o nível de significância mínimo de 5%, valor mínimo do erro experimental. Observa-se a importância das variáveis concentração, pH e tempo de repouso.

Figura 47 – Representação gráfica do diagrama de Pareto para os efeitos dos parâmetros analisados sobre a densidade óptica (670 nm), obtidos pela floculação com policloreto de alumínio-PAC da microalga *C. vulgaris* (IPR-*Chlv7123*).

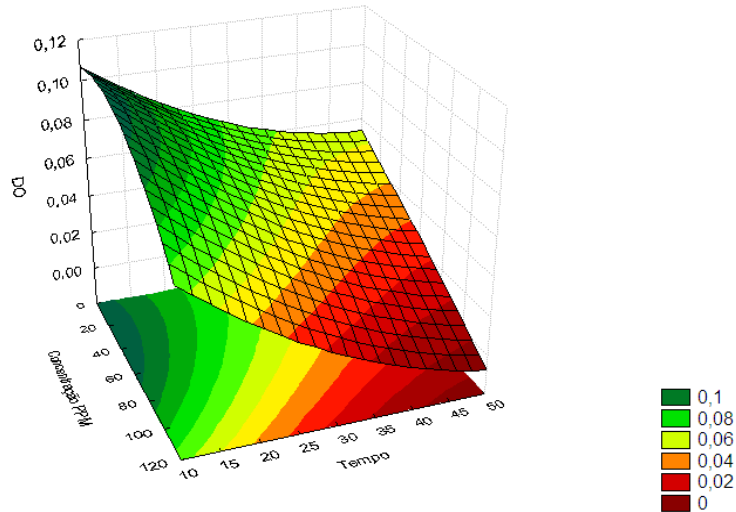


Fonte: Silva (2012).

O valor de $F_{\text{calculado}} = 12,54$ foi superior ao $F_{\text{tabelado}} = 8,74$ (KALIL et al., 2000).

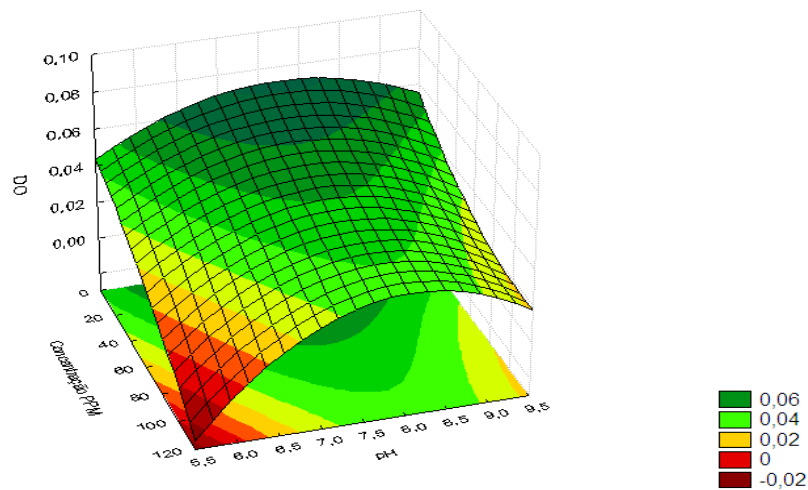
A modelagem de superfície de resposta, ($Z = -0,104 - 0,0007x - 1,3 \cdot 10^{-5}x^2 + 0,073y - 0,005y^2 + 0,0003xy - 3,1 \cdot 10^{-5}xy^2 + 1,2 \cdot 10^{-6}x^2y - 1,6 \cdot 10^{-6} \cdot 45x + 1,0 \cdot 10^{-7} \cdot 45x^2 + 0,0003 \cdot 45y - 0,164$) descreve o comportamento de floculação da microalga *C. vulgaris* (IPR-*Chlv7123*), conforme a variação de concentração de policloreto de alumínio, e tempo em pH 6,0 (Figura 49). A modelagem de superfície de resposta ($Z = -0,104 - 7 \cdot 10^{-4}x - 3 \cdot 10^{-5}x^2 + 0,073y - 0,005y^2 + 3,8 \cdot 10^{-4}xy - 3 \cdot 10^{-5}xy^2 + 1,2 \cdot 10^{-6}x^2y - 1,6 \cdot 10^{-5} \cdot 45x + 1 \cdot 10^{-7} \cdot 45x^2 + 3,1 \cdot 10^{-4} \cdot 45y - 0,164$), descreve o comportamento de floculação da microalga *C. vulgaris* (IPR-*Chlv7123*), conforme a variação de concentração de policloreto de alumínio, pH e tempo de 45 min (Figura 50).

Figura 48 – Superfície de resposta para densidade óptica do meio de cultivo da microalga *C. vulgaris* (IPR-*Chlv7123*), conforme a variação de concentração de policloreto de alumínio, tempo em pH 6,0.



Fonte: Silva (2012).

Figura 49 – Superfície de resposta para densidade óptica do meio de cultivo da microalga *C. vulgaris* (IPR-*Chlv7123*), conforme a variação de concentração de policloreto de alumínio, pH no tempo de 45 min.

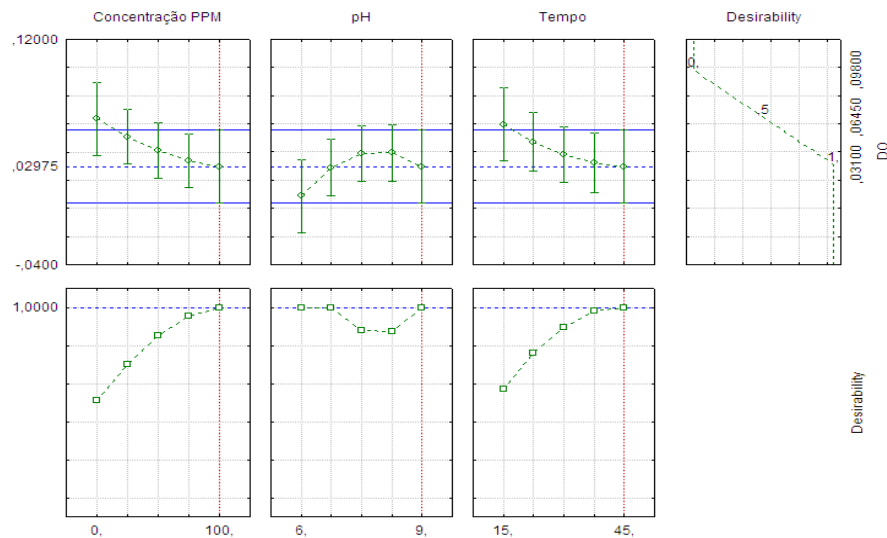


Fonte: Silva (2012).

O gráfico de desejabilidade apresentado na figura 51 revela o comportamento da microalga *C. vulgaris* (IPR-*Chlv7123*) em atividade de floculação frente à adição de diferentes níveis de policloreto de alumínio, pH e tempo de repouso. Para alcançar o valor de densidade óptica próximo a 0 sugere-se que os pontos ótimos de trabalho sejam de 100 ppm de policloreto de alumínio, pH 9,0 e 45

min de repouso. A faixa de segurança de trabalho pode conter uma variação do pH, podendo- se obter resultados eficientes com pH 6,0 a 6,75 e 9,0. Com a combinação destes fatores a eficiência de floculação alcançada é acima de 73%.

Figura 50 – Parâmetros desejáveis para pontos ótimos de trabalho para floculação da microalga *C. vulgaris* (IPR-*Chlv*7123) com policloreto de alumínio- PAC por densidade óptica.



Fonte: Silva (2012).

5.5.3 Microalga *B. braunii* (UTEX 572)

A densidade óptica ao final de 14 dias de cultivo foi de: 0,143 pH de 7,3.

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) utilizando-se o software *STATISTICA 7.0* para verificar qual a concentração mais adequada de agente floculante em relação ao pH e tempo de repouso do meio de cultivo.

No experimento de floculação da microalga *B. braunii* (UTEX 572) com policloreto de alumínio- PAC, a análise estatística indicou significativa ($p > 0,05$) a variável pH, concentração e tempo.

O coeficiente de regressão ($R^2=0,999$) (Tabela 20) corresponde que 99,9% da variabilidade pode ser explicado pelo modelo e melhor previsão de resposta (BURKERT et al., 2004; SAFARALIE et al., 2010).

Tabela 20 – Análise da variância (ANOVA) para resposta em D.O da microalga *B. braunii* (UTEX 572).

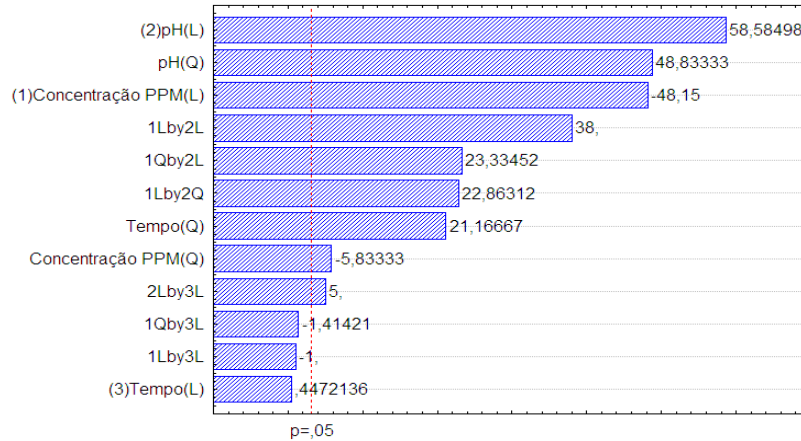
Factor	SS ^a	d.f. ^b	MS ^c	F - value	p - value
Concentração PPM ⁽¹⁾	0,005293	2	0,002647	1176,225	0,000045
pH ⁽²⁾	0,013088	2	0,006544	2908,447	0,000012
Tempo ⁽³⁾	0,001009	2	0,000504	224,114	0,000542
1*2	0,005650	3	0,001883	837,074	0,000070
1*3	0,000007	2	0,000003	1,500	0,353553
2*3	0,000056	1	0,000056	25,000	0,015392
Pure Error	0,000007	3	0,000002		
Total SS	0,027234	15			
$R^2 = 0,999 / R^2_{adj} = 0,998$					

^a Soma dos quadrados; ^b Graus de liberdade; ^c Quadrado Médio.

Fonte: Silva (2012).

Os efeitos com maior influência e suas interações podem ser visualizados pelo gráfico de pareto (Figura 52). Para a floculação da microalga *B. braunii* (UTEX 572) com policloreto de alumínio- PAC observa-se a importância das três variáveis concentração, pH e tempo.

Figura 51 – Representação gráfica do diagrama de Pareto para os efeitos dos parâmetros analisados sobre a densidade óptica (670 nm), obtidos pela floculação com policloreto de alumínio-PAC da microalga *B. braunii* (UTEX 572).

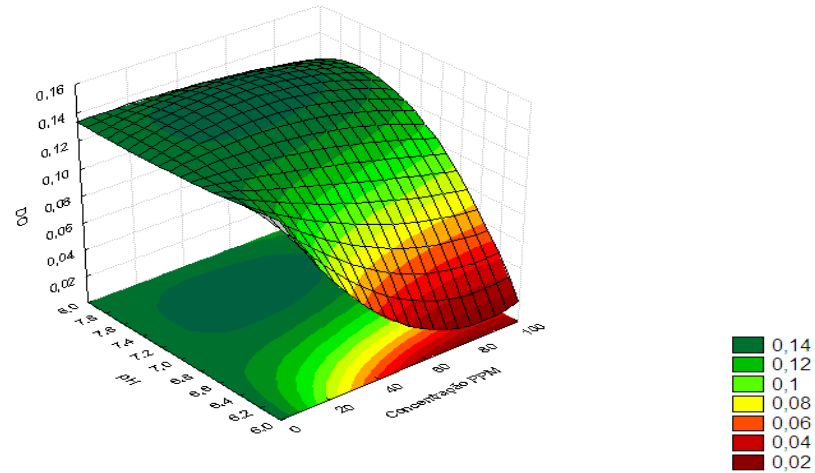


Fonte: Silva (2012).

O valor de $F_{\text{calculado}} = 1045,949$ foi superior ao $F_{\text{tabelado}} = 8,74$ sendo este estatisticamente significativo (KALIL et al., 2000).

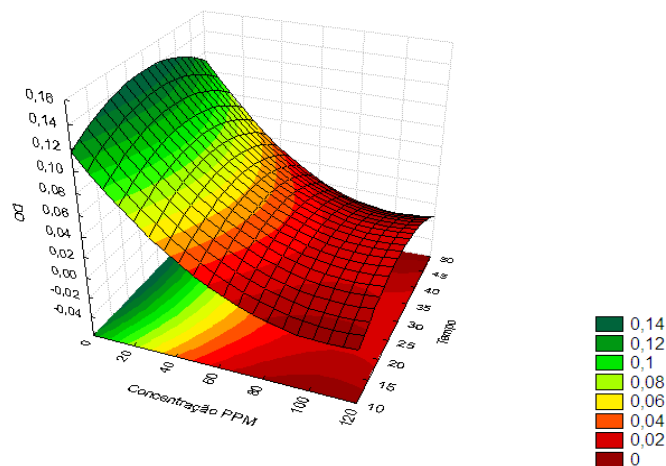
A modelagem de superfície de resposta ($Z = 0,334 - 0,096x + 6,870 \cdot 10^{-4}x^2 - 0,053y + 0,003y^2 + 0,026xy - 0,001xy^2 - 1,877 \cdot 10^{-4}x^2y + 1,270 \cdot 10^{-5}x^2y^2$), descreve o comportamento de floculação da microalga *B. braunii* (UTEX 572), conforme a variação de concentração de policloreto de alumínio, pH e tempo 45 min (Figura 53). A modelagem de superfície de resposta ($Z = -0,441 - 0,034x + 6,984 \cdot 10^{-5}x^2 + 0,002y - 7,055 \cdot 10^{-5}y^2 + 0,008 \cdot 6x - 4,850 \cdot 10^{-4} \cdot 36x - 9,89910^{-6} \cdot 6x^2 - 5 \cdot 10^{-6}xy + 4 \cdot 10^{-8}x^2y + 2,499 \cdot 10^{-4} \cdot 6y + 0,525$) (Figura 54), descreve o comportamento de floculação da microalga *B. braunii* (UTEX 572) para concentração e tempo no pH 6,0.

Figura 52 – Superfície de resposta para densidade óptica do meio de cultivo da microalga *B. braunii* (UTEX 572) após adição de policloreto de alumínio, analisando as variáveis pH e concentração no tempo de 45 min de repouso.



Fonte: Silva (2012).

Figura 53 – Superfície de resposta para densidade óptica do meio de cultivo da microalga *B. braunii* (UTEX 572) após adição de policloreto de alumínio, analisando as variáveis tempo e concentração em pH 6,0.

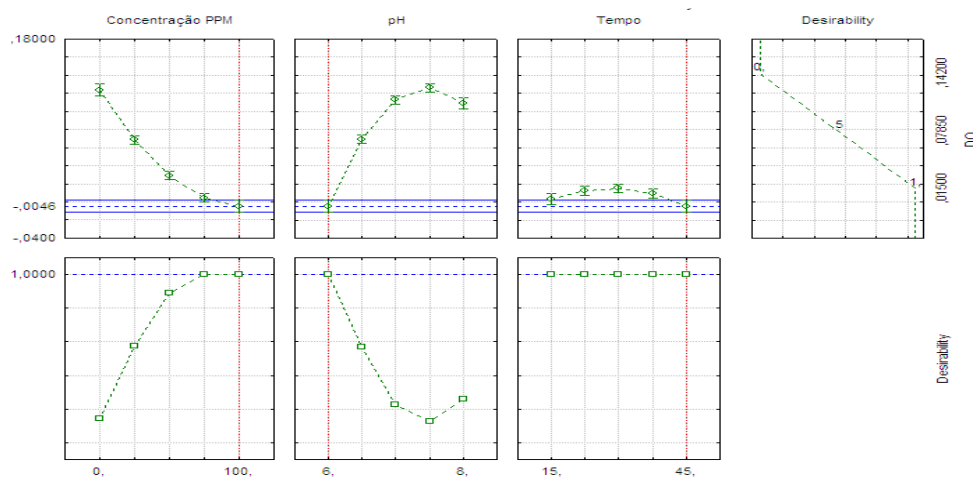


Fonte: Silva (2012).

O gráfico de desejabilidade apresentado na figura 55, revela o comportamento da microalga *B. braunii* (UTEX 572) em atividade de floculação frente à adição de diferentes níveis de policloreto de alumínio, pH e tempo de repouso. A combinação concentração, pH e tempo possui valores desejáveis a partir de 75 ppm e pH 6.0 e tempo a partir de 15 minutos, com ponto ótimo de trabalho em 45 minutos. Com a combinação destes fatores a eficiência de floculação alcançada é

acima de 94 %. SIRIN et al.(2011), descreve em seus experimentos eficiência de floculação acima de 90% para microalga *P. Tricornutum* com utilização policloreto de alumínio-PAC.

Figura 54 – Parâmetros desejáveis para pontos ótimos de trabalho para floculação da microalga *B. braunii* (UTEX 572) com policloreto de alumínio- PAC por densidade óptica.



Fonte: SILVA (2012).

6 CONCLUSÕES

As microalgas estudadas apresentam alto teor de lipídeo em sua biomassa ou seja, matéria prima para produção de biodiesel. O teor de lipídeos obtido, foi de 19 a 47 %, sendo que para microalga *C. vulgaris* (IPR-*Chlv*7123) foi de 19,1%, 32,3% *B. braunii* (UTEX 572) e 47,1% para *N. oleoabundans* (UTEX LB 1185).

Os métodos utilizados para concentrar a biomassa das microalgas foram eficientes, e otimizados. Estes métodos variam de acordo com a espécie cultivada, assim como o custo final de cada método para concentrar a biomassa.

A centrifugação é um método de grande eficiência na concentração da biomassa em cultivo de microalgas, mas apresenta desvantagens com relação ao custo de operação, quando se deseja concentrar grandes quantidades de cultivo. Neste trabalho esta eficiência esteve acima de 97 %.

A floculação com amido de mandioca catiônico em cultivos de microalgas teve eficiência de floculação variando de 71 a 86% de acordo com a estirpe de microalga estudada, com a concentração de floculante, tempo de repouso e pH do cultivo.

A eficiência de floculação por indução alcalina do pH foi acima de 68% variando de acordo com a microalga trabalhada e variável pH e tempo de repouso.

A eficiência de floculação utilizando o floculante PAC-Policloreto de alumínio foi acima de 73% podendo chegar a 94%, variando de acordo com a estirpe de microalga trabalhada, tempo de repouso e pH.

O método estatísticos de superfície de resposta, melhora a qualidade da informação obtida através dos resultados, na busca pela otimização dos processos.

REFERÊNCIAS

- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária,. **Resolução nº RE 899**. 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 10 abr. 2012.
- BILANOVIC, D.; SHELEF, G.; SUKENIK, A. Flocculation of microalgae with cationic polymers - Effects of medium salinity. **Biomass**, v. 17, n. 1, p. 65-76, 1988.
- BITTON, G.; FOX, J. L.; STRICKLAND, H. G. Removal of algae from Florida lakes by magnetic filtration. **Applied Microbiology**, v. 30, n. 6, p. 905-908, 1975.
- BLACKADDER, D. A.; NEDDERMAN, R. M. **Manual de operações unitárias**. São Paulo: Hemus, 1982.
- BOLD, H. C. The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama* sp. nov. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 76, p. 101-108, 1949.
- BOLTO, B.; GREGORY, J. Organic polyelectrolytes in water treatment. **Water Research**, v. 41, n. 11, p. 2301-2324, 2007.
- BORGES, L.; MORÓN-VILLARREYES, J. A.; D'OCA, M. G. M.; ABREU, P. C. Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 10, p. 4449-4454, 2011.
- BOROWITZKA, M. A. Algal biotechnology products and o processes - Matching science and economics. **Journal of Applied Phycology**, v. 4, n. 3, p. 267-279, Sep. 1992.
- _____. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 70, n. 1-3, p. 313-321, Apr. 1999.
- BOSMA, R.; VAN SPRONSEN, W. A.; TRAMPER, J.; WIJFFELS, R. H. Ultrasound, a new separation technique to harvest microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 15, n. 2-3, p. 143-153, Mar./Jun. 2003.
- BRASIL. Potencial de redução de emissões de CO₂ em projetos de produção e uso de biocombustíveis. **EPE - Empresa de Pesquisa energética**, 2005.
- _____. Ministério de Minas e Energias. **Balanco energético nacional**, p. 244, 2008.
- _____. Balanco energetico nacional. **EPEM - Empresa Pesquisa Energética**, 2011.
- BROWN, L. M.; ZEILER, K. G. Aquatic biomass and carbon-dioxide trapping. **Energy Conversion and Management**, v. 34, n. 9-11, p. 1005-1013, Sep./Nov. 1993.

- BUELNA, G.; BHATTARAI, K. K.; NOÛE, J. D. L.; TAIGANIDES, E. P. Evaluation of various flocculants for the recovery of algal biomass growth on pig-waste. **Biol. Wastes**, 31: 211-222, 1990.
- BURKERT, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 91, n. 1, p. 77-84, Jan. 2004.
- CHACÓN-LEE, T. L.; GONZÁLEZ-MARIÑO, G. E. Microalgae for “healthy” foods - Possibilities and challenges. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 6, p. 655-675. 2010.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.
- COOKSEY, K. E.; GUCKERT, J. B.; WILLIAMS, S. A.; CALLIS, P. R. Fluorometric - Determination of the neutral lipid content of microalgal cells using Nile red. **Journal of Microbiological Methods**, v. 6, n. 6, p. 333-345, Sep. 1987.
- COULSON, J. M.; RICHARDSON, J. F. **Tecnologia química**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1965. v. 3.
- DUARTE, D. R. D. S. **Alimentos funcionais com microalgas: nova fonte de pigmentos, antioxidantes e ácidos gordos ómega 3**. 2010. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2010.
- EISENBERG, D. M.; KOOPMAN, B.; BENEMANN, J. R.; OSWALD, W. J. Algal bioflocculation and energy-conservation in microbial sewage ponds. **Biotechnology and Bioengineering**, p. 429-448, 1981.
- FON SING, S.; ISDEPSKY, A.; BOROWITZKA, M.; MOHEIMANI, N. Production of biofuels from microalgae. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, p. 1-26, 2011.
- GOLDEMBERG, J. A independência energética. **Jornal da Ciência**, 2006.
Disponível em: <<http://www.jornaldaciencia.org.br/Detail.jsp?id=39940>>. Acesso em: 19 dez. 2012.
- GOUVEIA, L.; OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 269-274, Feb. 2009.
- GREENSPAN, P.; FOWLER, S. D. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. **Journal of Lipid Research**, v. 26, n. 7, p. 781-789, 1985.
- GRIMA, E. M.; BELARBI, E. H.; FERNANDEZ, F. G. A.; MEDINA, A. R.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 7-8, p. 491-515, Jan. 2003.
- GROBBELAAR, J. U. Physiological and technological considerations for optimising mass algal cultures. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 3-5, p. 201-206, Oct. 2000.

GUDIN, C.; CHAUMONT, D. Cell fragility - the key problem of microalgae mass-production in closed photobioreactors. **Bioresource Technology**, v. 38, n. 2-3, p. 145-151, 1991.

HARUN, R.; SINGH, M.; FORDE, G. M.; DANQUAH, M. K.. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 3, p. 1037-1047, 2010.

HOEK, V. D. C. **Algae**: an introduction to phycology. London: Cambridge University, 1995.

HORIUCHI, J. I.; OHBA, I.; TADA, K.; KOBAYASHI, M.; KANNO, T.; KISHIMOTO, M. Effective cell harvesting of the halotolerant microalga *Dunaliella tertiolecta* with pH control. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 95, n. 4, p. 412-415, Apr. 2003.

KALIL, S. J.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 6, p. 539-550, Jan. 2000.

KNUCKEY, R. M.; BROWN, M. R.; ROBERT, R.; FRAMPTON, D. M. F. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. **Aquacultural Engineering**, v. 35, n. 3, p. 300-313, 2006.

LEE, A. K.; LEWIS, D. M.; ASHMAN, P. J. Microbial flocculation, a potentially low-cost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, n. 5, p. 559-567, Oct. 2009.

LEE, S. J.; KIM, S. B.; KWON, G. S.; YOON, B. D.; OH, H. M. Effects of harvesting method and growth stage on the flocculation of the green alga *Botryococcus braunii*. *Letters in Applied Microbiology*, v.27, n.1, p.14-18. 1998.

LI, Y.; QIN, J. G. Comparison of growth and lipid content in three *Botryococcus braunii* strains. **Journal of Applied Phycology**, v. 17, n. 6, p. 551-556, Dec. 2005.

LIBÂNIO, M. Fundamentos de qualidade e tratamento de água. Campinas: Átomo, 2010. v. 3.

LOURENÇO, S. O. Culture collections of microalgae in Brazil: progress and constraints. **Nova Hedwigia**, v. 79, n. 1-2, p. 149-173, 2004.

_____. Cultivo de microalgas marinhas - princípios e aplicações. **Rima**, 2006.

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, n. 1, p. 217-232, 2010.

MOHN, F. H. Harvesting of micro-algal biomass. In: BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. (Ed.). **Micro-algal biotechnology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. p. 395-414.

NAE, C. Núcleo Estratégico da Presidência da República. **Secretaria de Comunicação de Governo e Gestão Estratégica**, v. 2, 2005.

OH, H. M.; LEE, S. J.; PARK, M. H.; KIM, H. S.; KIM, H. C.; YOON, J. H.; KWON, G. S.; YOON, B. D. Harvesting of *Chlorella vulgaris* using a bioflocculant from *Paenibacillus sp* AM49. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 15, p. 1229-1234, Aug. 2001.

OLAIZOLA, M. Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 3-5, p.499-506, Oct. 2000.

PAPAZI, A.; KOTZABASIS, K. Bioenergetic strategy of microalgae for the biodegradation of phenolic compounds-Exogenously supplied energy and carbon sources adjust the level of biodegradation. **Journal of Biotechnology**, v. 129, n. 4, p. 706-716, 2007.

PAPAZI, A.; MAKRIDIS, P.; DIVANACH, P. Harvesting *Chlorella minutissima* using cell coagulants. **J Appl Phycol**, v. 22, p. 349-355, 2010.

PETRUŠEVSKI, B.; BOLIER, G.; VAN BREEMEN, A. N.; ALAERTS, G. J. Tangential flow filtration: A method to concentrate freshwater algae. **Water Research**, v. 29, n. 5, p. 1419-1424, 1995.

QIANG, H.; FAIMAN, D.; RICHMOND, A. Optimal tilt angles of enclosed reactors for growing photoautotrophic microorganisms outdoors. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 85, n. 2, p. 230-236, 1998.

RAVEN, P. H. **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

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

RICHTER, C. A.; AZEVEDO NETTO, J. M. **Tratamento de água: tecnologia atualizada**. São Paulo: Edgard Blucher, 2003.

RYAN, D. Biodiesel - A Primer. **ATTRA - National Sustainable Agriculture Information Service**, 2004.

SAFARALIE, A.; FATEMI, S.; SALIMI, A. Experimental design on supercritical extraction of essential oil from valerian roots and study of optimal conditions. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, n. C2-3, p. 312-318, Jul./Sep. 2010.

SANDBANK, E.; SHELEF, G.; WACHS, A. M. Improved electroflotation for the removal of suspended solids from algal pond effluents. **Water Research**, v. 8, n. 9, p. 587-592, 1974.

SAS. **Statistical Analysis System**, versão 9.1. 1999.

SAWAYAMA, S.; INOUE, S.; YOKOYAMA, S. Continuous-culture of hydrocarbon-rich microalga *Botryococcus braunii* in secondarily treated sewage. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 6, p. 729-731, Aug. 1994.

SHEEHAN, J.; DUNAHAY, T.; BENEMANN, J.; ROESSLER, P. **Look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from algae.** Close-Out Report, p. Medium: ED; Size: 325 pages. 1998.

SHELEF, G.; SUKENIK, A.; GREEN, M. Microalgae harvesting and processing: a literature review. **US Department of Energy: Golden Colorado**, p.101: pp. 87-96. 1984.

SINGH, R. P.; TRIPATHY, T.; KARMAKAR, G. P.; RATH, S. K.; KARMAKAR, N. C.; PANDEY, S. R.; JAIN, S. K.; KANNAN, K.; LAN, N. T. Novel biodegradable flocculants based on polysaccharides. **Current Science**, v. 78, p.798-803, 2000.

ŞIRIN, S.; TROBAJO, R.; IBANEZ, C.; SALVADÓ, J. Harvesting the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* with polyaluminum chloride, aluminium sulphate, chitosan and alkalinity-induced flocculation. **Journal of Applied Phycology**, p. 1-14, 2011.

STATSOFT, I. **Statistica** (data analysis software system), version 7. 2007.

SUKENIK, A.; BILANOVIC, D.; SHELEF, G. Flocculation of microalgae in brackish and sea waters. **Biomass and Bioenergy**, v. 15, p. 187-199, 1988.

TORZILLO, G.; CARLOZZI, P.; PUSHPARAJ, B.; MONTAINI, E.; MATERASSI, R. A 2-plane tubular photobioreactor for outdoor culture of spirulina. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, n. 7, p. 891-898, Sep. 1993.

TOVAR, L. P.; MACIEL, M. R. W.; PINTO, G. M. F.; MACIEL, R.; GOMES, D. R. Factorial design applied to concentrate bioactive component of *Cymbopogon citratus* essential oil using short path distillation. **Chemical Engineering Research & Design**, v. 88, n. 2A, p. 239-244, Feb. 2010.

UDUMAN, N.; BOURNIQUEL, V.; DANQUAH, M. K.; HOADLEY, A. F. A. A parametric study of electrocoagulation as a recovery process of marine microalgae for biodiesel production. **Chemical Engineering Journal**, v. 174, n. 1, p. 249-257, 2011.

VANDAMME, D.; FOUBERT, I.; MEESCHAERT, B.; MUYLAERT, K. Flocculation of microalgae using cationic starch. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, n. 4, p. 525-530, 2010.

VANDAMME, D.; PONTES, S. C. U. V.; GOIRIS, K.; FOUBERT, I.; PINOY, L. J. J.; MUYLAERT, K. Evaluation of electro-coagulation - Flocculation for harvesting marine and freshwater microalgae. **Biotechnology and Bioengineering**, 2011.

VERTES, A. A.; INUI, M.; YUKAWA, H. Implementing biofuels on a global scale. **Nat Biotech**, v. 24, n. 7, p. 761-764, 2006.

WOLF, F. R. *Botryococcus braunii* - an unusual hydrocarbon-producing alga. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 249-260, 1983.

XU, H.; MIAO, X. L.; WU, Q. Y. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 126, n. 4, p. 499-507, Dec. 2006.

XU, L.; GUO, C.; WANG, F.; ZHENG, S.; LIU, C. Z. A simple and rapid harvesting method for microalgae by in situ magnetic separation. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 21, p. 10047-10051, 2011.

XU, L.; WANG, F.; LI, H. Z.; HU, Z. M.; GUO, C.; LIU, C. Z. Development of an efficient electroflocculation technology integrated with dispersed-air flotation for harvesting microalgae. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 85, n. 11, p. 1504-1507, 2010.

YAHY, H.; ELMALEH, S.; COMA, J. Algal flocculation-sedimentation by pH increase in a continuous reactor. **Water Sci Technol**, v. 30, p. 259-267, 1994.