

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E
AMBIENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
AMBIENTAL**

Fábio de Farias Neves

**FIXAÇÃO DE CARBONO ATRAVÉS DE MICROALGAS
NATIVAS (*Chlamydomonas* sp.) CULTIVADAS EM
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CO₂**

Florianópolis
2013

Fábio de Farias Neves

**FIXAÇÃO DE CARBONO ATRAVÉS DE MICROALGAS
NATIVAS (*Chlamydomonas* sp.) CULTIVADAS EM
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CO₂**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Henrique de Melo Lisboa.

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Bianchini Derner.

Florianópolis
2013

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

Neves, Fábio de Farias

Fixação de carbono através de microalgas nativas
(Chlamydomonas sp.) cultivadas em diferentes concentrações
de CO₂ / Fábio de Farias Neves ; orientador, Henrique de
Melo Lisboa ; co-orientador, Roberto Bianchini Derner . -
Florianópolis, SC, 2013.
200 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Ambiental.

Inclui referências

1. Engenharia Ambiental. 2. Fixação de Carbono. 3.
Cultivo de Microalgas. 4. Chlamydomonas sp.. I. Lisboa,
Henrique de Melo. II. Derner , Roberto Bianchini . III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Ambiental. IV. Título.

TERMO DE APROVAÇÃO

*A poluição do planeta é apenas
um reflexo externo de uma
poluição interior psíquica
gerada por milhões de
indivíduos inconscientes, sem a
menor responsabilidade pelos
espaços que trazem dentro de si.
(Eckhart Tolle)*

*Dedico esta tese aos meus pais,
Alexandre e Jádina, à minha
irmã, Fernanda e à minha
namorada, Marina.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela Vida.

Agradeço à minha família, pelas oportunidades que me proporcionaram, pela base familiar que me asseguram, e pelo suporte à seguir lutando.

Agradeço ao Prof. Dr. Henrique de Melo Lisboa pela sabedoria, no seu mais amplo sentido, repassada ao longo da execução deste trabalho. Também, pela oportunidade que abriu em minha carreira profissional.

Agradeço ao Prof. Dr. Roberto Bianchini Derner pela co-orientação, conhecimento e suporte dedicados na execução deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Leonardo Rubi Rörig pelo apoio e pelas excelentes contribuições aportadas na execução deste trabalho.

Agradeço aos professores Dr. William Gerson Matias, Dr. Paulo Belli Filho, Dr.^a Cátia Regina de Carvalho Pinto, Dr.^a Rosana de Cássia de Souza Schneider e Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias, pelas contribuições e críticas construtivas para o enriquecimento deste trabalho.

Agradeço aos colegas, estudantes de graduação e de pós-graduação, do Laboratório de Controle da Qualidade do Ar (ENS/UFSC), do Laboratório de Cultivo de Algas (AQI/UFSC) e do Laboratório de Ficologia (BOT/UFSC), que foram essenciais na execução das atividades demandadas para elaboração desta tese, bem como, pela amizade e apoio disponibilizado ao longo de todos os anos deste doutoramento.

Agradeço ao grupo de pesquisa do Laboratório de Métodos de Extração e Separação (LAMES/UFGO), coordenado pelo Dr. Nelson Roberto Antoniosi Filho, pelo apoio na realização das análises do perfil de ácidos graxos e teor de ésteres metílicos de ácidos graxos.

Agradeço aos órgãos de fomento, CNPq, CAPES, FAPESC e MCTI, por subsidiarem a realização deste trabalho.

RESUMO

Devido ao atual problema do aumento das emissões de Gases de Efeito Estufa (GEE), especialmente de dióxido de carbono (CO_2), diversas pesquisas vêm sendo realizadas a fim de obter tecnologias que reduzam estas emissões ou retirem estes gases da atmosfera. Neste sentido, é crescente a aplicação do cultivo de microalgas no campo da Biotecnologia Ambiental, buscando fixação de CO_2 de emissões atmosféricas e obtenção de energia da biomassa. Entretanto, para essas aplicações se tornarem economicamente viáveis, é necessária a adoção de estratégias para baixar o custo de produção de microalgas, bem como, faz-se necessário o uso de microalgas que apresentem elevadas taxas de crescimento, produtividade e biofixação de CO_2 quando cultivadas sob a introdução de elevadas concentrações deste gás. Sendo assim, este trabalho avaliou a influência da injeção de atmosferas com diferentes concentrações de dióxido de carbono (0,038, 5, 10, 15 e 20%) sobre o crescimento, produtividade e biofixação de CO_2 nos cultivos de *Chlamydomonas* sp. nativas de Santa Catarina, utilizando como meio de cultura efluente doméstico tratado (EDT). Também, foi avaliado o efeito do uso do EDT como meio de cultura alternativo sobre o crescimento e a produtividade do cultivo. Os cultivos foram submetidos a diferentes tratamentos distribuídos em quatro experimentos. Foram avaliados parâmetros de crescimento, produtividade, fixação de CO_2 , remoção de nutrientes e potencial para utilização da biomassa na produção de biodiesel. Os resultados demonstram que o efluente doméstico tratado tem potencial para ser utilizado como meio de cultura para o cultivo de *Chlamydomonas* sp. Os cultivos com introdução de ar com concentrações de 5 e 10% de CO_2 foram os que apresentaram os maiores valores de crescimento, produtividade e fixação de CO_2 , entretanto, foi possível o cultivo das microalgas sob concentrações de 15 e 20% de CO_2 , sugerindo fixação de CO_2 também nessas concentrações elevadas. Contudo, a eficiência de utilização do CO_2 introduzido deve ser ampliada. As espécies estudadas se mostraram potencialmente adequadas para a fixação de CO_2 de emissões atmosféricas quando cultivadas em EDT. No entanto, apenas uma das espécies estudadas apresentou potencial como matéria prima para a produção de biodiesel.

Palavras-chave: fixação de carbono, microalgas, *Chlamydomonas* sp., cultivo, CO_2 .

ABSTRACT

Due to the current problem of rising emissions of Greenhouse Gases (GHGs), especially carbon dioxide (CO_2), several studies have been performed in order to reduce emissions or remove these gases from the atmosphere. In this sense, there is a growing application of microalgae culture in the field of Environmental Biotechnology, with the objectives on fixation of atmospheric CO_2 and obtaining energy from biomass. However, for these applications to be economically viable, it is necessary to adopt strategies to lower the cost of production of microalgae, as well, work with microalgae that have high growth rates, productivity and CO_2 fixation, when the culture grown under introducing high concentrations of this gas. Thus, this study evaluated the influence of injection different concentrations of carbon dioxide (0.038, 5, 10, 15 and 20%) on the growth, productivity and CO_2 fixation on *Chlamydomonas* sp. strains that is indigenous of Santa Catarina State, using as culture medium treated wastewater (TW). Also, it was evaluated the effect of the use of TW as alternative culture medium on growth and productivity of the strains. The cultures were subjected to different treatments over four experiments. Parameters of growth, productivity, CO_2 fixation, nutrient removal and the potential of the use of biomass in the production of biodiesel were evaluated. The results indicate that treated wastewater can be used as culture medium for *Chlamydomonas* sp. strains. The introduction of air concentrations of 5 and 10% CO_2 shown the highest values of growth, productivity and CO_2 fixation. However, it was possible grown this strains in concentrations of 15 and 20% CO_2 , suggesting, also, CO_2 fixation in such high concentrations. However, the efficiency of use introduced CO_2 must be increase. The studied strains have shown potentially suitable for fixing CO_2 from atmospheric emissions when grown in TW. However, only one of the strains studied showed potential as raw material for biodiesel production.

KEY-WORDS: carbon fixation, microalgae, *Chlamydomonas* sp., cultivation, CO_2 .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Relação da curva de crescimento microalgal (curva contínua) com a curva de concentração de nutrientes (curva tracejada) em um cultivo de microalgas em batelada (RICHMOND, 2004).	50
Figura 2 - Relação do pH, da alcalinidade e da concentração de CO ₂ em situações de alcalinidade 25, 50 e 100 mg L ⁻¹ em água com 0 ppt de salinidade e 20 °C.	56
Figura 3 - Representação de um Fotobiorreator Vertical	62
Figura 4 - Representação de um Fotobiorreator Horizontal	63
Figura 5 - Tanques abertos para a produção extensiva da microalga <i>Dunaliella salina</i> no noroeste da Austrália	64
Figura 6 - Tanques para produção de microalgas no Laboratório de Camarões Marinhos do Departamento de Aquicultura da UFSC.....	65
Figura 7 - Tanque aberto utilizado para produção da microalga <i>Chlorella</i> em Taiwan.....	65
Figura 8 - Tanques raceway utilizados para a produção da microalga <i>Spirulina</i> na Califórnia.	66
Figura 9 - Sistema de lagoas para tratamento de efluentes na Califórnia. Entre as diferentes variedades de lagoas há uma Lagoa de Alta Taxa com área de 6 há.....	73
Figura 10 - Imagem em microscópio da microalga <i>Chlamydomonas</i> sp.1 em aumento de 400x.	80
Figura 11 - Sistema experimental de tratamento e polimento final de lixiviado pertencente ao Laboratório de Efluentes Líquidos e Gasosos (LABEFLU – ENS/UFSC). A espécie 1 foi isolada da lagoa demarcada em vermelho.	81

Figura 12 - (A e B) Lago de drenagem ácida de mina de carvão, de onde a espécie 2 foi isolada pela equipe do Laboratório de Ficologia BOT/UFSC.	82
Figura 13 - Microalgas isoladas e mantidas em câmara de germinação.	84
Figura 14 - Produção de inóculo para início do Experimento E3.	86
Figura 15 - Resumo do planejamento experimental realizado.	87
Figura 16 - Estação de Tratamento de Esgotos da Lagoa da Conceição / Florianópolis. (A) Tratamento preliminar; (B) Vista geral da ETE com o reator UASB ao fundo; (C) Vista geral da ETE com o valo de oxidação ao fundo; (D) Vista geral da ETE com decantador ao fundo; (E) Sistema para desinfecção final com hipoclorito de sódio; (F) Efluente tratado pela ETE e utilizado como meio de cultura alternativo nos experimentos.	90
Figura 17 - Unidades experimentais (experimento E2) dispostas em sala de cultivo.	92
Figura 18 - Unidades experimentais dispostas em sala com temperatura controlada de 25 ± 2 °C e iluminação constante.	94
Figura 19 - Procedimentos de coleta de dados sendo realizados. (A) Ajuste de concentração de CO ₂ ; (B) monitoramento da temperatura do meio de cultura; (C, D e E) coleta de amostras dos cultivos.	96
Figura 20 - Experimento E3. (A, B e C) Dias iniciais do experimento E3; (D, E e F) dias finais do experimento E3.	97
Figura 21 - Experimento E4. (A) Início do experimento; (B e C) Após início do experimento; (D) Vista lateral das unidades experimentais; (E) Dias finais do experimento; (F) Vista geral da infra-estrutura do experimento E4.	99
Figura 22 - (A e B) Amostras retiradas diariamente, de cada unidade experimental, para coleta de dados.	101

Figura 23 - (A) Câmera de Neubauer disposta em microscópio; (B) quadrantes da câmara de Neubauer utilizados para contagem de células nos cultivos da espécie 1.	102
Figura 24 - (A e B) Alíquotas coletadas dos cultivos, e filtradas em filtros de fibra de vidro GF-1, porosidade de 0,7 µm.	104
Figura 25 - Esquema simplificado da instalação do Experimento E3 e E4 com ênfase no sistema de inoculação da mistura (ar atmosférico x CO ₂).	105
Figura 26 - (A) Mesa com rotômetros para controle da vazão na entrada das unidades experimentais; (B) Entrada e saída de ar das unidades experimentais; (C) Misturador de gases com rotômetros para controle de vazão do compressor de ar e do cilindro de CO ₂	105
Figura 27 - Medidor de gases GEM 2000.	106
Figura 28 - Análise da concentração de CO ₂ na saída (A e B); e na entrada de cada unidade experimental (C).	107
Figura 29 - (A) Amostras coletadas ao final do cultivo prontas para serem centrifugadas; (B) centrífuga; (C) biomassa centrifugada; (D) biomassa sendo liofilizada.	110
Figura 30 - Biomassa liofilizada sendo pesada e separada para posterior análise de ésteres.	111
Figura 31 - Aumento da densidade celular (10 ⁴ células mL ⁻¹) durante o cultivo de <i>Chlamydomonas</i> sp.2. Cada linha refere-se a média entre quatro repetições de cada tratamento. T1 - Meio TAP; T2 - 50% Efluente; T3 - 100% Efluente.	114
Figura 32 - Aumento da massa seca (g L ⁻¹) durante o cultivo de <i>Chlamydomonas</i> sp.2. Cada linha refere-se a média entre quatro repetições de cada tratamento. T1 - Meio TAP; T2 - 50% Efluente; T3 - 100% Efluente.	116
Figura 33 - Biomassa acumulada durante o cultivo de <i>Chlamydomonas</i> sp.2, representada em massa seca (g L ⁻¹). Cada barra refere-se a média entre quatro repetições de cada tratamento. T1-Meio TAP; T2-50%	

Efluente; T3-100% Efluente. Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas. 118

Figura 34 - Variação do pH durante o desenvolvimento das culturas (Experimento E1). Cada linha refere-se a média entre quatro repetições de cada tratamento. T1-Meio TAP; T2-50% Efluente; T3-100% Efluente. 119

Figura 35 - Variação da turbidez em unidades nefelométricas durante o desenvolvimento das culturas (Experimento E1). Cada linha refere-se a média entre quatro repetições de cada tratamento. T1-Meio TAP; T2-50% Efluente; T3-100% Efluente. 120

Figura 36 - Aumento da densidade celular (células mL⁻¹) durante o cultivo de *Chlamydomonas* sp.1. Cada linha refere-se a média entre quatro repetições de cada tratamento. T1-Meio TAP; T2-50% Efluente; T3-100% Efluente. 123

Figura 37 - Aumento da massa seca (g L⁻¹) durante o cultivo de *Chlamydomonas* sp.1. Cada linha refere-se a média entre quatro repetições de cada tratamento. T1 - Meio TAP; T2 - 50% Efluente; T3 - 100% Efluente. 126

Figura 38 - Biomassa acumulada durante o cultivo, representada em massa seca (g L⁻¹) (Experimento E2). Cada barra refere-se a média entre quatro repetições de cada tratamento (Experimento E2). T1-Meio TAP; T2-50% Efluente; T3-100% Efluente. Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas. 127

Figura 39 - Variação do pH durante o desenvolvimento das culturas (Experimento E2). Cada linha refere-se a média entre quatro repetições de cada tratamento. T1 - Meio TAP; T2 - 50% Efluente; T3 - 100% Efluente. 129

Figura 40 - Variação da turbidez em unidades nefelométricas durante o desenvolvimento das culturas (Experimento E2). Cada linha refere-se a média entre quatro repetições de cada tratamento. T1 - Meio TAP; T2 - 50% Efluente; T3 - 100% Efluente. 130

Figura 41 - Aumento da densidade celular (células mL⁻¹) durante o cultivo de *Chlamydomonas* sp.1. Cada linha refere-se a média entre três

repetições de cada tratamento. T-0% -introdução de 0,03% ($v v^{-1}$) de CO_2 ; T-5% -introdução de 5% ($v v^{-1}$) de CO_2 ; T-10% -introdução de 10% ($v v^{-1}$) de CO_2 ; T-15% -introdução de 15% ($v v^{-1}$) de CO_2 ; T-20% -introdução de 20% ($v v^{-1}$) de CO_2 132

Figura 42 - Aumento da massa seca ($g L^{-1}$) durante o cultivo de *Chlamydomonas* sp.1. Cada linha refere-se a média entre três repetições de cada tratamento. T-0% -introdução de 0,03% ($v v^{-1}$) de CO_2 ; T-5% -introdução de 5% ($v v^{-1}$) de CO_2 ; T-10% -introdução de 10% ($v v^{-1}$) de CO_2 ; T-15% -introdução de 15% ($v v^{-1}$) de CO_2 ; T-20% -introdução de 20% ($v v^{-1}$) de CO_2 136

Figura 43 - Taxa de biofixação de CO_2 (Experimento E3) durante o desenvolvimento das culturas para os tratamentos T-5% (introdução de 5% $v v^{-1}$ de CO_2) e T-10% (introdução de 10% $v v^{-1}$ de CO_2). Cada ponto refere-se a média entre três repetições. 138

Figura 44 - Taxa de biofixação de CO_2 (Experimento E3) durante o desenvolvimento das culturas para os tratamentos T-15% (introdução de 15% $v v^{-1}$ de CO_2) e T-20% (introdução de 20% $v v^{-1}$ de CO_2). Cada ponto refere-se a média entre três repetições. 139

Figura 45 - Colunas de vidros utilizadas como unidades experimentais nos dias finais do Experimento E3. (A) Imagem de uma repetição do Tratamento T-10%. (B) Imagem de uma repetição do Tratamento T-15%. (C) Imagem de duas unidades experimentais do Tratamento T-15% onde é notável a aglomeração das células. 145

Figura 46 - Variação do pH durante o desenvolvimento das culturas (Experimento E3). Cada linha refere-se a média entre três repetições de cada tratamento. T-0% -introdução de 0,03% ($v v^{-1}$) de CO_2 ; T-5% -introdução de 5% ($v v^{-1}$) de CO_2 ; T-10% -introdução de 10% ($v v^{-1}$) de CO_2 ; T-15% -introdução de 15% ($v v^{-1}$) de CO_2 ; T-20% -introdução de 20% ($v v^{-1}$) de CO_2 146

Figura 47 - Aumento da densidade celular (células mL^{-1}) durante o cultivo de *Chlamydomonas* sp.2. Cada linha refere-se a média entre três repetições de cada tratamento. T-0% -introdução de 0,03% ($v v^{-1}$) de CO_2 ; T-5% -introdução de 5% ($v v^{-1}$) de CO_2 ; T-10% -introdução de 10% ($v v^{-1}$) de CO_2 ; T-15% -introdução de 15% ($v v^{-1}$) de CO_2 ; T-20% -introdução de 20% ($v v^{-1}$) de CO_2 156

Figura 48 - Aumento da massa seca (g L^{-1}) durante o cultivo de *Chlamydomonas* sp.2. Cada linha refere-se a média entre três repetições de cada tratamento. T-0% -introdução de 0,03% (v v^{-1}) de CO_2 ; T-5% - introdução de 5% (v v^{-1}) de CO_2 ; T-10% -introdução de 10% (v v^{-1}) de CO_2 ; T-15% -introdução de 15% (v v^{-1}) de CO_2 ; T-20% -introdução de 20% (v v^{-1}) de CO_2 159

Figura 49 - Taxa de biofixação de CO_2 (Experimento E4) durante o desenvolvimento das culturas para os tratamentos T-0% (injeção de 0,038% v v^{-1} de CO_2), T-5% (injeção de 5% v v^{-1} de CO_2) e T-10% (injeção de 10% v v^{-1} de CO_2). Cada ponto refere-se a média entre três repetições..... 161

Figura 50 - Taxa de biofixação de CO_2 (Experimento E4) durante o desenvolvimento das culturas para os tratamentos T-15% (injeção de 15% v v^{-1} de CO_2) e T-20% (injeção de 20% v v^{-1} de CO_2). Cada ponto refere-se a média entre três repetições. 162

Figura 51 - Variação do pH durante o desenvolvimento das culturas (Experimento E4). Cada linha refere-se a média entre três repetições de cada tratamento. 0% -introdução de 0,03% (v v^{-1}) de CO_2 ; 5% - introdução de 5% (v v^{-1}) de CO_2 ; 10% -introdução de 10% (v v^{-1}) de CO_2 ; 15% -introdução de 15% (v v^{-1}) de CO_2 ; 20% -introdução de 20% (v v^{-1}) de CO_2 166

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Composição química em percentual de peso seco total de diferentes microalgas de águas doce e marinha.	42
Quadro 2 - Componentes do Ar Seco.....	52
Quadro 3 - Solubilidade em água a 15 °C dos quatro gases presentes no ar em maior quantidade.....	53
Quadro 4 - Concentração de saturação do CO ₂ em diferentes concentrações no ar, considerando a temperatura da água em 20°C.	54
Quadro 5 - Reações de equilíbrio ácido-base do sistema carbonato.	56
Quadro 6 - Concentrações efluentes reportadas na literatura em estações de tratamento de despejos com duas diferentes composições.	75
Quadro 7 - Classificação taxonômica da microalga <i>Chlamydomonas</i> sp.	79
Quadro 8 - Meio de cultura Chu #10 ajustado com solução de metais traço e de vitaminas, utilizado para <i>Chlamydomonas</i> , descrito por Andersen (2005). Cada composto foi dissolvido individualmente em 950mL de água destilada. Posteriormente, completou-se para 1 L e se autoclavou o meio.	84
Quadro 9 - Solução de metais traço a ser adicionada ao meio de cultura Chu#10. Cada composto foi dissolvido individualmente em 950mL de água destilada. Posteriormente, completou-se para 1 L.	85
Quadro 10 - Solução de vitaminas a ser adicionada ao meio de cultura Chu#10. Em 950 mL de água destilada, dissolveu-se a Tiamina.HCl, posteriormente, adicionou-se 1 mL de cada composto e completou para 1 L. Esterilizou-se e manteve-se a solução resfriada.....	85
Quadro 11 - Meio de cultura TAP utilizado para o cultivo de <i>Chlamydomonas</i> spp. (GORMAN; LEVINE, 1965).....	91
Quadro 12 - Modelo do desenho experimental aplicado nos experimentos E1 e E2.....	100

Quadro 13 - Modelo do desenho experimental aplicado nos experimentos E3 e E4. 100

Quadro 14 - Métodos analíticos para avaliação de remoção de nitrogênio e fósforo. 109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características físico-químicas do lago onde a espécie 2 foi isolada.	81
Tabela 2 - Valores médios obtidos no afluyente da lagoa onde a espécie 1 foi isolada. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=20). ...	82
Tabela 3 - Valores médios obtidos no efluente da ETE utilizado como meio de cultura alternativo (Experimento E1).	89
Tabela 4 - Valores médios obtidos no efluente da ETE utilizado como meio de cultura alternativo (Experimento E2). Valores expressos como média \pm desvio padrão.....	93
Tabela 5 - Valores médios obtidos no efluente da ETE utilizado como meio de cultura alternativo (Experimento E3).	95
Tabela 6 - Valores médios obtidos no efluente da ETE utilizado como meio de cultura alternativo (Experimento E4).	98
Tabela 7 - Valores de Densidade Celular Máxima (DCM), Tempo de Cultivo, Velocidade de Crescimento (k), Tempo de Duplicação, Taxa de Crescimento Específico (μ) e Produtividade nos diferentes tratamentos (Experimento E1).	115
Tabela 8 - Valores de Densidade Celular Máxima (DCM), Tempo de Cultivo, Velocidade de Crescimento (k), Tempo de Duplicação, Taxa de Crescimento Específico (μ) e Produtividade nos diferentes tratamentos (Experimento E2).	124
Tabela 9 - Valores de Densidade Celular Máxima (DCM), Tempo de Cultivo, Velocidade de Crescimento (k), Tempo de Duplicação, Taxa de Crescimento (μ) e Produtividade nos diferentes tratamentos (Experimento E3).	133
Tabela 10 - Quantidade de CO ₂ introduzido, removido e biofixado pelos cultivos (Experimento E3) após 14 dias.	141

Tabela 11 - Valores de nitrogênio amoniacal, nitrito, nitrato e ortofosfato nos diferentes tratamentos do Experimento E3.	148
Tabela 12 - Rendimento em óleo na biomassa de <i>Chlamydomonas</i> sp.1 cultivada sob os diferentes tratamentos.....	150
Tabela 13 - Composição percentual dos ácidos graxos encontrados na biomassa de <i>Chlamydomonas</i> sp.1 cultivada sob os diferentes tratamentos do Experimento E3.....	152
Tabela 14 - Teores totais de ácidos graxos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA), diinsaturados (DUFA), triinsaturados (TUFA) e poliinsaturados (PUFA) encontrados na biomassa de <i>Chlamydomonas</i> sp.1 cultivada sob os diferentes tratamentos do Experimento E3.	153
Tabela 15 - Valores de Densidade Celular Máxima (DCM), Tempo de Cultivo, Velocidade de Crescimento (k), Tempo de Duplicação, Taxa de Crescimento Específico (μ) e Produtividade nos diferentes tratamentos (Experimento E4).....	157
Tabela 16 - Quantidade de CO ₂ introduzido, removido e biofixado pelos cultivos após 10 dias do Experimento E4.	165
Tabela 17 - Valores de nitrogênio amoniacal, nitrito, nitrato e ortofosfato nos diferentes tratamentos do Experimento E4.	168
Tabela 18 - Rendimento em óleo na biomassa da <i>Chlamydomonas</i> sp.2 cultivada sob os diferentes tratamentos.....	170
Tabela 19 - Composição percentual dos ácidos graxos encontrados na biomassa de <i>Chlamydomonas</i> sp.2 cultivada sob os diferentes tratamentos (Experimento E4).	172
Tabela 20 - Teores totais de ácidos graxos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA), diinsaturados (DUFA), triinsaturados (TUFA) e poliinsaturados (PUFA) encontrados na biomassa de <i>Chlamydomonas</i> sp.2 cultivada sob os diferentes tratamentos (Experimento E4).....	173

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	31
1.1 JUSTIFICATIVA	34
1.2 OBJETIVOS	36
<i>Objetivo geral.....</i>	<i>36</i>
<i>Objetivos específicos</i>	<i>36</i>
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	39
2.1 PROBLEMÁTICA.....	39
2.1.1 <i>O aumento das emissões de GEE</i>	<i>39</i>
2.1.2 <i>Soluções para mitigação do aumento da concentração de GEE</i>	<i>39</i>
2.2 AS MICROALGAS COMO ALTERNATIVA DE MITIGAÇÃO DE GEE	41
2.2.1 <i>As microalgas</i>	<i>41</i>
2.2.2 <i>Cultivo de microalgas.....</i>	<i>43</i>
2.2.2.1 <i>Condições de Cultivo.....</i>	<i>43</i>
2.2.2.2 <i>O Carbono no cultivo de microalgas.....</i>	<i>50</i>
2.2.2.3 <i>Sistemas de cultivo.....</i>	<i>61</i>
2.2.3 <i>Métodos de separação da biomassa</i>	<i>67</i>
2.2.4 <i>Biocombustíveis a partir de microalgas</i>	<i>67</i>
2.2.5 <i>Outros produtos originados das microalgas</i>	<i>70</i>
2.2.5 <i>Cultivo integrado com sistemas de tratamento de efluentes</i>	<i>71</i>
2.2.5.1 <i>Aproveitamento de efluentes como meio de cultura</i>	<i>74</i>
2.3 NECESSIDADES DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO	76
3 MATERIAIS E MÉTODO	79
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	79
3.1.1 <i>Isolamento de Chlamydomonas sp.</i>	<i>83</i>
3.2 ACLIMATAÇÃO PRÉVIA	85
3.3 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.....	86
3.3.1 <i>Experimento 1: Efeito do uso de efluente doméstico tratado,</i> <i>como meio de cultura alternativo, sobre o crescimento e</i> <i>produtividade da microalga ácido-tolerante Chlamydomonas sp.2</i> <i>isolada de lago de drenagem ácida de mina de carvão.....</i>	<i>88</i>
3.3.2 <i>Experimento 2: Efeito do uso de efluente doméstico tratado,</i> <i>como meio de cultura alternativo, sobre o crescimento e</i> <i>produtividade da microalga Chlamydomonas sp.1 isolada de</i> <i>lixiviado de aterro sanitário.</i>	<i>92</i>

3.3.3 Experimento 3: Efeito da introdução de diferentes concentrações de CO ₂ nos cultivos de <i>Chlamydomonas sp.1</i> , isolada de lixiviado de aterro sanitário.	94
3.3.4 Experimento 4: Efeito da introdução de diferentes concentrações de CO ₂ nos cultivos da microalga ácido-tolerante <i>Chlamydomonas sp.2</i> , isolada de lago de drenagem ácida de mina de carvão.	98
3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	100
3.5 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO.....	101
3.5.1 Curvas de Crescimento.....	101
3.5.2 Densidade Celular Máxima (DCM).....	102
3.5.3 Tempo de Cultivo (TEMPO).....	102
3.5.4 Taxa de Crescimento Específico (μ).....	102
3.5.5 Velocidade de Crescimento e Tempo de Duplicação.....	103
3.6 DETERMINAÇÃO DA PRODUTIVIDADE.....	103
3.7 AVALIAÇÃO DA FIXAÇÃO DE CARBONO.....	104
3.8 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO E FÓSFORO.....	108
3.9 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E TEOR DE ÉSTERES METÁLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS (FAME) PRESENTES NA BIOMASSA MICROALGAL.....	109
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	112
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	113
4.1 EXPERIMENTO 1: EFEITO DO USO DE EFLUENTE DOMÉSTICO TRATADO, COMO MEIO DE CULTURA, SOBRE O CRESCIMENTO E PRODUTIVIDADE DO CULTIVO DE <i>CHLAMYDOMONAS SP.2</i> , ISOLADA DE LAGO DE DRENAGEM ÁCIDA DE MINA DE CARVÃO.	113
4.1.1 Parâmetros de Crescimento.....	113
4.1.2 Produtividade.....	115
4.1.3 pH.....	118
4.1.4 Turbidez.....	120
4.2.5 Conclusões referentes ao Experimento E1.....	121
4.2 EXPERIMENTO 2: EFEITO DO USO DE EFLUENTE DOMÉSTICO TRATADO, COMO MEIO DE CULTURA, SOBRE O CRESCIMENTO E PRODUTIVIDADE DO CULTIVO DE <i>CHLAMYDOMONAS SP.1</i> , ISOLADA DE LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO.....	122
4.2.1 Parâmetros de Crescimento.....	122
4.2.2 Produtividade.....	125
4.2.3 pH.....	128
4.2.4 Turbidez.....	129
4.2.5 Conclusões referentes ao Experimento E2.....	131

4.3 EXPERIMENTO 3: EFEITO DA INTRODUÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CO ₂ NOS CULTIVOS DE CHLAMYDOMONAS SP.1, ISOLADA DE LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO.....	131
4.3.1 <i>Parâmetros de Crescimento</i>	131
4.3.2 <i>Produtividade</i>	135
4.3.3 <i>Avaliação da Fixação de Carbono</i>	137
4.3.3.1 <i>Eficiência de utilização do CO₂</i>	140
4.3.4 <i>pH</i>	146
4.3.5 <i>Nutrientes</i>	147
4.3.6 <i>Perfil de Ácidos Graxos e Teor de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos (FAME) Presentes na Biomassa Microalgal</i>	149
4.3.7 <i>Conclusões referentes ao Experimento E3</i>	154
4.4 EXPERIMENTO 4: EFEITO DA INTRODUÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CO ₂ NOS CULTIVOS DE CHLAMYDOMONAS SP.2, ISOLADA DE LAGO DE DRENAGEM ÁCIDA DE MINA DE CARVÃO.....	155
4.4.1 <i>Parâmetros de Crescimento</i>	155
4.4.2 <i>Produtividade</i>	158
4.4.3 <i>Avaliação da Fixação de Carbono</i>	159
4.4.3.1 <i>Eficiência de utilização do CO₂</i>	163
4.4.4 <i>pH</i>	166
4.4.5 <i>Nutrientes</i>	167
4.4.6 <i>Perfil de Ácidos Graxos e Teor de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos (FAME) Presentes na Biomassa Microalgal</i>	169
4.4.7 <i>Conclusões referentes ao Experimento E4</i>	174
4.5 DISCUSSÃO GERAL.....	175
5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	181
5.1 CONCLUSÕES.....	181
5.2 RECOMENDAÇÕES	182
REFERÊNCIAS.....	185

1 INTRODUÇÃO

O aquecimento global é apontado por muitos cientistas como um dos mais graves problemas ambientais deste século. Durante o último século, registrou-se um aumento de cerca de $0,74^{\circ}\text{C}$ na temperatura média global da Terra. Esse problema vem sendo causado pela intensificação antrópica da emissão de determinados gases como, principalmente, o dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4) e óxido nitroso (N_2O), conhecidos como Gases de Efeito Estufa (GEE). O dióxido de carbono, apesar de ser menos efetivo que o gás metano na absorção da radiação emitida pela superfície da terra, é considerado a maior causa do aquecimento global (IPCC, 2001).

Caso não haja uma solução global, estima-se que durante este século as emissões de GEE continuarão aumentando, fato que poderá acarretar em mudanças dramáticas nos sistemas climáticos do planeta terra (HUNTLEY; REDALJE, 2006). Entre os possíveis danos ambientais que estas mudanças climáticas poderiam causar estão a intensificação das chuvas e secas, causando graves quebras na produção agrícola, aceleração do derretimento de geleiras, aumento dos níveis dos oceanos, alteração da circulação oceânica e, maior proliferação de pragas e doenças (ADAMS et al., 2003).

É possível estabelecer algumas estratégias de mitigação das emissões de GEE. No entanto, mesmo com a adoção destas estratégias, a projeção média de estabilização do teor de CO_2 na atmosfera é da ordem de 450 ppm. Este valor é 80 ppm mais elevado que à concentração atual. Nos últimos 20 milhões de anos não foi constatado diferença de concentração desta magnitude (PEARSON; PALMER, 2000). Além disso, nenhum método de mitigação, se aplicado isoladamente, será capaz de estabilizar o nível de dióxido de carbono em concentrações suficientes para evitar uma possível catástrofe climática futura (VAN HARMELEN; OONK, 2006).

A intensificação das emissões de GEE pode ser mitigada através da redução do uso de combustíveis fósseis. Isto pode ser promovido pelo aumento da eficiência na geração de energia, ou pela diminuição de sua demanda, utilizando-a mais eficientemente (BENEMANN, 1997).

O uso de energias renováveis também é uma alternativa de mitigação. A substituição de combustíveis fósseis por biodiesel, bioetanol, biogás, energia nuclear, energia eólica, energia solar, entre

outras, contribui com a redução das emissões de CO₂ na atmosfera (PEDRONI et al., 2001).

É possível reduzir as concentrações atmosféricas de CO₂ através da captura e estocagem deste gás, retirando-o do seu ciclo biogeoquímico. Para tanto, são propostas ações como a injeção do CO₂ em poços petrolíferos, em minas de carvão, em águas oceânicas profundas, em minas de sal, entre outras medidas (BENEMANN, 1997).

O sequestro de carbono da atmosfera através da biofixação do CO₂ por organismos fotossintetizantes, ou seja, realizado por um processo natural, tem sido evidenciado como uma das mais eficientes formas de mitigação (KREMER et al., 2004). Pode ser alcançado através do cultivo de vegetais superiores, incorporando diretamente o CO₂ da atmosfera (BENEMANN, 1997), ou através do cultivo de microrganismos fotossintetizantes com a utilização do fluido gasoso de uma atividade geradora de CO₂ incorporando este gás como nutriente, antes de ser emitido à atmosfera, agindo como um dispositivo de controle de emissões (SAWAYAMA et al., 1995; YUN et al., 1997).

A biomassa produzida, através do processo de fotossíntese, pode ser utilizada para diversos propósitos, especialmente como fonte de compostos de interesse industrial (alimento, madeira, biocombustíveis, compostos bioativos etc.) (BENEMANN, 1997; DERNER et al., 2006; FALKOWSKI; RAVEN, 1997; KREMER et al., 2004). Segundo Huntley e Redalje (2006) a produção de biodiesel, através de microrganismos fotossintetizantes, talvez seja a mais promissora estratégia de mitigação biológica do CO₂.

Naturalmente, as microalgas, exemplos de microrganismos fotossintetizantes, são as principais responsáveis pela absorção biológica de dióxido de carbono atmosférico no mundo. Elas estão presentes em grande número nas águas superficiais do planeta, as quais equivalem a aproximadamente 75% da superfície terrestre (FALKOWSKI; RAVEN, 1997).

Na natureza, a produtividade fotossintética das microalgas excede a das plantas terrestres em aproximadamente uma ordem de magnitude (LONGHURST et al., 1995). Aproximadamente 50% da composição celular de microalgas (biomassa seca) é carbono (SÁNCHEZ MIRÓN et al., 2003), substância que é tipicamente derivada do dióxido de carbono (CHISTI, 2007).

Atualmente, as microalgas, são cultivadas principalmente para a produção de alimento vivo, para atividades aquícolas e para a produção de biomassa, como matéria prima para extração de substâncias de interesse comercial (fertilizantes, pigmentos, corantes, alimento humano

e animal, biopolímeros, alimentos funcionais, e compostos farmacológicos) (DERNER et al., 2006).

A indústria de produção de algas, apesar de pequena, cresce rapidamente em países como Japão, Estados Unidos, Índia, China, entre outros. Foram produzidas em 2006, aproximadamente 10.000 toneladas de biomassa microalgal seca, sendo quase toda realizada em tanques abertos e destinada a produção de suplementos nutricionais (VAN HARMELEN; OONK, 2006). Os sistemas de produção de microalgas mais utilizados são os tanques abertos do tipo carrossel ou “raceway” (MOLINA GRIMA et al., 1999, SPOLAORE et al., 2006). De acordo com diversos autores (MOLINA GRIMA et al., 1999; SÁNCHEZ MIRON et al., 2003), os fotobiorreatores tubulares também vêm sendo bastante utilizados, principalmente em casos de volumes de produção menores.

Recentemente, a produção de microalgas, tanto em tanques abertos como em fotobiorreatores, vem sendo alvo de pesquisas em diversos países para desenvolver a tecnologia de remoção do dióxido de carbono presentes em fluidos gasosos. Este seria o caso dos processos de geração de energia termelétrica e de geração de biogás (ONO; CUELLO, 2004; CHISTI, 2007; MORAIS; COSTA, 2007; MORAIS; COSTA, 2008; JACOB-LOPEZ et al., 2008; CHIU et al., 2008; CHIU et al., 2009; BILANOVIC et al., 2009; YOO et al., 2010; DOUSKOVÁ et al., 2010). Diversas instituições governamentais, como o Departamento de Energia dos Estados Unidos e o Instituto de Biotecnologia Marinha do Japão, e empresas privadas ou mistas, como a Petrobras, a EniTechnologie, a Shell, a Boeing, a Chevron e a Dow Chemical, vêm financiando projetos de pesquisas sobre a produção de microalgas (BILANOVIC et al., 2009; CHIU et al., 2008; CHIU et al., 2009; JACOB-LOPEZ et al., 2008; YOO et al., 2010). Segundo Capuano et al. (2005) a fixação de carbono, através do cultivo massivo de microalgas, representa um avançado processo biológico, ambientalmente sustentável, que possibilita o uso direto do CO₂ encontrado em alguns efluentes gasosos concentrados.

Existem diversas vantagens que justificam o uso das microalgas para remoção de dióxido de carbono. O rápido crescimento destes microrganismos e a ampla tolerância das microalgas a fatores ambientais extremos, permitem o seu cultivo em poucos dias, em águas salobras, salgadas ou até mesmo impróprias para outras atividades, como a agricultura, não competindo com a produção de alimento e abastecimento de água (BENEMANN, 1997).

Apesar de diversas vantagens, o uso das microalgas para sequestro de carbono ainda possui um elevado custo de produção. Este

custo pode ser equacionado pelo emprego comercial da biomassa produzida em distintas finalidades. Entre elas pode-se citar a detoxificação biológica de efluentes; produção de biocombustíveis; produção de energia; extração de pigmentos e corantes; alimentação humana e animal; e obtenção de compostos farmacológicos (DERNER, 2006).

Entre os fatores que mais oneram a produção de microalgas está a adição de dióxido de carbono e outros nutrientes às culturas (SHEEHAN et al., 1998). Portanto, com a utilização do CO₂, concentrado em efluentes gasosos produzidos por diferentes processos, e dos nutrientes encontrados em efluentes tratados, pode-se reduzir, consideravelmente, os custos operacionais. Para isso, deve-se explorar o uso de espécies de microalgas adaptadas a altas concentrações de CO₂ e às condições de qualidade de água encontradas em efluentes tratados, objetivando uma maior produtividade e resistência a contaminação por outros microrganismos (KUMAR et al., 2010).

A presente pesquisa avaliou o crescimento, a produtividade e fixação de carbono através do cultivo de microalgas, do gênero *Chlamydomonas*. As espécies utilizadas foram provenientes de um sistema experimental de tratamento de lixiviado de aterro sanitário, situado na UFSC, e de um lago de drenagem ácida de mina de carvão, situado no sul de Santa Catarina. Elas foram então inoculadas em efluente doméstico tratado (efluente líquido), como meio de cultura alternativo, e submetidas a introdução de diferentes concentrações de CO₂. Também se avaliou o potencial da biomassa microalgal, produzida nos cultivos experimentais, para a produção de biodiesel.

1.1 Justificativa

O atual consenso da maioria da comunidade científica é que a concentração de CO₂ continuará aumentando proporcionalmente ao uso de combustíveis fósseis, com significativa consequência para o aquecimento global (HUNTLEY; REDALJE, 2006).

O provável aumento das concentrações de GEE provenientes das atividades humanas tem como resultados o derretimento das camadas polares, a redução de áreas agricultáveis, a redução de florestas tropicais e eventos climáticos atípicos.

Diferentes alternativas estão surgindo para mitigar o impacto causado pela queima de combustíveis fósseis, como na geração de

energia em usinas termoelétricas, as quais são responsáveis por 7% do total mundial de emissões de dióxido de carbono (KADAM, 1997).

Uma alternativa, considerada como uma das mais promissoras (KUMAR et al., 2010), é, através da fotossíntese, converter o CO₂ em biomassa de microalgas para ser utilizada, entre outras potencialidades, na produção de biodiesel. Assim, o sequestro de CO₂ acontece antes mesmo de este ser liberado na atmosfera (BENEMANN, 1997).

No entanto, alguns gargalos tecnológicos devem ser solucionados para tornar esta alternativa viável em larga escala, incluindo, o aumento da produtividade e do aproveitamento dos nutrientes; integração dos biosistemas com águas residuárias, sistemas de reaproveitamento de água; aumento da eficiência de transferência e mistura dos gases de combustão; melhoramento das técnicas de separação e secagem da biomassa; e análises de ciclo de vida (KUMAR et al., 2010). Sheehan et al. (1998) relatam que para atingir a viabilidade econômica do processo de fixação de CO₂ e utilização da biomassa para geração de biocombustíveis, em curto e médio prazos, o meio mais favorável seria a utilização de efluentes tratados como meio de cultura para os cultivos.

Segundo Sheehan et al. (1998) é fundamental selecionar espécies de microalgas do local específico, onde a tecnologia será aplicada e que apresentem bons resultados de produtividade. O autor sugere que se foquem as pesquisas na otimização de espécies nativas, pois, podem apresentar grande adaptação às condições encontradas nos ambientes de cultivo. A biodiversidade de microrganismos fotossintetizantes é enorme, sendo a maior parte ainda não explorada bioquimicamente e metabolicamente (HUNTLEY; REDALJE, 2006). O uso de espécies nativas possui a vantagem de não depender de inóculos exóticos, evitando problemas ambientais, com a introdução de microrganismos.

Portanto, pesquisas sobre microalgas nativas de Santa Catarina são importantes para o desenvolvimento de tecnologias de sequestro de carbono através do cultivo de microalgas que possam ser utilizadas por indústrias, companhias de saneamento, atividades rurais, entre outros, situados no estado.

Até o final do ano de 2011, havia na UFSC, no setor experimental do Laboratório de Efluentes Líquidos e Gasosos (LABEFLU) e do Laboratório de Resíduos Sólidos (LARESO), ambos do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (ENS), uma lagoa de tratamento de lixiviados de aterro sanitário. Nesta lagoa havia a predominância de microalgas do gênero *Chlamydomonas*, o que sugere

que esta espécie seja adaptada às condições apresentadas no tratamento de lixiviados de aterro sanitário (pH 9,09 – 9,23, Temperatura 23,80 – 29,52°C e DQO 2529 ± 603 mg L⁻¹) (FERNANDES, 2009). Para realizar o estudo de cultivo desta espécie, esta foi isolada da lagoa.

O Laboratório de Ficologia do Departamento de Botânica do CCB/UFSC, supervisionado pelo Dr. Leonardo Rörig, possui isolada outra espécie do gênero *Chlamydomonas*. Esta, isolada de lago de drenagem ácida de mina de carvão, situado no sul do estado de Santa Catarina (pH entre 1,5 e 3,0).

Esta pesquisa foi realizada com o intuito de avaliar o potencial de cultivo destas espécies para fixação de CO₂ utilizando efluente tratado como meio de cultura alternativo.

Uma vez que a adição de CO₂ diminui o pH do meio de cultivo, segundo Andersen (2005) deve-se monitorá-lo e controlá-lo para que não prejudique o desenvolvimento das microalgas, diminuindo a eficiência do sistema. Entretanto, a queda do pH pode ser benéfica se diminuir a incidência de outros organismos competidores e predadores das microalgas em cultivos abertos (ANDERSEN, 2005). Nesse caso, o cultivo de microalgas adaptadas a baixos pH e que apresentem boas relações de produtividade, crescimento e fixação de carbono, pode ser vantajoso.

1.2 Objetivos

Objetivo geral

- Avaliar o potencial de fixação de carbono através de microalgas nativas de Santa Catarina, cultivadas em efluente doméstico tratado como meio de cultura alternativo, sob a introdução de diferentes concentrações de CO₂.

Objetivos específicos

- Determinar o crescimento e produtividade no cultivo de duas espécies de *Chlamydomonas* spp. nativas de Santa

Catarina utilizando como meio de cultura efluente doméstico tratado;

- Determinar a influência da introdução de diferentes concentrações de CO_2 nos cultivos de duas espécies de *Chlamydomonas* spp. nativas de Santa Catarina sobre o crescimento, produtividade, perfil de ácidos graxos e teor de ésteres metílicos de ácidos graxos;
- Determinar a fixação de carbono através do cultivo de duas espécies de *Chlamydomonas* spp. sob a introdução de diferentes concentrações de CO_2 .

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Problemática

2.1.1 O aumento das emissões de GEE

Dois dos maiores problemas enfrentados pela humanidade nos últimos anos são a segurança energética e as mudanças climáticas (FAO, 2009).

Desde a revolução industrial, os níveis de dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4) e o óxido nitroso (N_2O) entre outros gases na atmosfera, têm aumentado consideravelmente. Estes gases, que naturalmente permitem a entrada da luz solar, mas retém na atmosfera uma quantia do calor produzido, impedindo que uma parcela da radiação absorvida escape para o espaço, são conhecidos como gases do efeito estufa (GEE) e contribuem com a permanência de uma temperatura ideal à vida no planeta. Entretanto, quando em excesso, podem causar uma intensificação do efeito estufa, alterando o clima na Terra, causando sérios danos ambientais em todo o globo (KIRSCHBAUM, 2003).

Em relação à concentração na atmosfera, o CO_2 é o GEE mais importante. A queima de combustíveis fósseis está entre as principais fontes de emissões deste gás. No entanto, de modo global, a geração de energia através de combustíveis fósseis continuará a representar um papel importante para atender a demanda energética mundial (SHEEHAN et al., 1998). Sendo assim, é necessário o desenvolvimento de tecnologias que tornem este processo mais sustentável e/ou que o substituam.

2.1.2 Soluções para mitigação do aumento da concentração de GEE

Segundo Van Harmelen e Oonk, (2006) para reduzir os GEE existe uma série de opções, tais como:

- Aumento da eficiência energética em todos os setores, através de inovações tecnológicas e por redução de demanda, através de incentivos, taxas e regulamentações;

- Redução de outros GEE que não o CO₂ através de diferentes métodos de mitigação, como por exemplo, o reaproveitamento de metano em aterros sanitários, e a redução térmica de N₂O em ácido nítrico;
- Preferência pela utilização de combustíveis de baixo carbono, como a substituição do carvão por gás natural;
- Redução de desmatamento e queimadas;
- Uso da energia nuclear, quando segura e com adequada disposição de resíduos;
- Captura de CO₂ e estoque em locais como poços de petróleo desativados, aquíferos e profundezas dos oceanos;
- Fixação de CO₂ por organismos fotossintetizantes;
- Desenvolvimento de tecnologias para o tratamento dos GEE de emissões industriais;
- Utilização de energia renovável como solar, eólica, hidroelétricas e biocombustíveis, os quais não aumentam as emissões de CO₂ na atmosfera.

Contudo, nenhuma das alternativas, se aplicada isoladamente, será capaz de solucionar o problema das mudanças climáticas. Os biocombustíveis de primeira geração, por exemplo, são produzidos de culturas agrícolas, as quais podem ser utilizadas para a alimentação humana e animal. Esta competição entre alimento e combustível torna impossível atender toda a demanda do setor de transportes apenas com o fornecimento de biocombustível de primeira geração (FAO, 2010).

Diversos projetos de pesquisas estão envolvidos com a utilização de algas, as quais são organismos fotossintetizantes, para a fixação de emissões de CO₂ e geração de biocombustíveis (FAO, 2010). Segundo Sheehan et al. (1998) este é um método de mitigação de GEE interessante, pois, quando integrado com processos de queima de combustíveis fósseis, permite reciclar o CO₂ residual, convertendo-o em biomassa de alto valor energético.

2.2 As microalgas como alternativa de mitigação de GEE

2.2.1 As microalgas

Entre os organismos fotossintetizantes encontram-se plantas, algas e algumas bactérias. No grupo das algas, é possível dividi-las em macroalgas e microalgas. As microalgas, como o nome sugere, são organismos microscópicos e são encontrados tanto em ambientes marinhos, quanto em água doce. Há uma grande variedade de espécies (estima-se a existência de mais de 300.000 espécies) com diferenciadas composições bioquímicas (ANDERSEN, 2005). Estes microrganismos contribuem com aproximadamente 40 a 50 % do oxigênio disponível na atmosfera, e são a fonte original do carbono fóssil encontrado no óleo e gás natural. Responsáveis pela produção primária em uma área equivalente a 71% da superfície do planeta Terra (os oceanos), as microalgas como base da cadeia alimentar, dão suporte a maior parte da vida nos ambientes aquáticos (ANDERSEN, 2005).

As microalgas possuem um mecanismo fotossintético muito similar ao dos vegetais superiores (vegetais com proteção do embrião), convertendo água e CO_2 em biomassa e O_2 . Em geral, as microalgas convertem a energia solar mais eficientemente, pois, possuem uma estrutura celular simples. A água, o CO_2 , e outros nutrientes ficam mais facilmente disponíveis devido ao fato dos microrganismos crescerem suspensos em meio líquido (LOURENÇO, 2006). Estes organismos microscópicos foram categorizados em variedades de classes, distinguidas principalmente por sua pigmentação, ciclo de vida, e estrutura celular. Segundo Sheehan et al. (1998) as quatro mais importantes classes de microalgas em termos de abundância são:

- Algas verdes (Chlorophyceae): Bastante abundante, especialmente em água doce. Na escala evolutiva, foram as que deram origem aos vegetais superiores. O principal composto de estoque é o amido, enquanto lipídios podem ser produzidos em certas condições;
- Diatomáceas (Bacillariophyceae): Estas microalgas dominam o fitoplâncton dos oceanos, mas também são encontradas em águas doce e salobra. Sabe-se que existem aproximadamente 100.000 espécies. Contém sílica em sua parede celular. Estocam carbono na forma de lipídios ou carboidratos;

- Cianobactérias (Cyanophyceae): Muito próximas às bactérias em questão a sua estrutura e organização. Desempenham um importante papel na fixação de nitrogênio atmosférico. Existem aproximadamente 2.000 espécies encontradas em diferentes habitats;
- Algas pardas (Chrysophyceae): Grupo muito similar às diatomáceas em pigmentação e composição bioquímica. Apresentam pigmentos bastante complexos, apresentando-se em coloração amarelo, marrom e alaranjado. Sabe-se da existência de aproximadamente 1.000 espécies, encontradas principalmente em água doce. Produzem como compostos de estoque, lipídios e carboidratos.

Os níveis de carboidratos, proteínas e lipídios, presentes na biomassa de microalgas, variam quantitativamente e qualitativamente entre diferentes espécies (Quadro 1).

Quadro 1- Composição química em percentual de peso seco total de diferentes microalgas de águas doce e marinha.

Espécie	Proteínas (%)	Carboidratos (%)	Lipídios (%)
Dulciaquícolas			
<i>Scenedesmus obliquous</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40
<i>Chlamydomonas reinhardii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9
<i>Spirulina máxima</i>	60-71	13-16	6-7
Marinhas			
<i>Isochrysis galbana</i>	41	5	21
<i>Pavlova lutheri</i>	49	31	12
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	33	17	10
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	33	24	10
<i>Skeletonema costatum</i>	37	21	7
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	29	17	10
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	9
<i>Tetraselmis suecica</i>	39	8	7

Fonte: Adaptado de Arredondo-Vega e Voltolina (2007).

2.2.2 Cultivo de microalgas

O desenvolvimento dos sistemas de cultivo em massa de microalgas teve início na década de 1950, quando foram realizadas pesquisas com o objetivo de oferecer à população mundial uma fonte de proteína alternativa. Mais tarde, iniciou-se o desenvolvimento do cultivo de microalgas para a extração de valiosos compostos que estes microorganismos produzem, bem como, para a transformação de CO₂ em O₂ durante as viagens espaciais. Em 1970, durante a crise energética, iniciaram-se as pesquisas de utilização de microalgas como fontes de energia renovável (FAO, 2009).

Atualmente, a indústria de produção de algas, apesar de pequena, cresce rapidamente em países como Japão, Estados Unidos, Índia, China, entre outros. Produziu-se, em 2006, aproximadamente 10.000 toneladas de biomassa microalgal seca no mundo. Quase toda produção foi realizada em tanques abertos (ver item 2.2.2.3) e destinada à produção de suplementos nutricionais. Alguns sistemas de produção de microalgas utilizam fotobiorreatores fechados, no entanto, representam uma pequena fração da produção total (VAN HARMELEN; OONK, 2006).

2.2.2.1 Condições de Cultivo

O crescimento de uma cultura de microalgas, bem como a produtividade e a composição bioquímica das células, estão relacionados com as condições de cultivo. Estas condições podem ser manipuladas com o objetivo de otimizar a produção da biomassa ou a produção de um composto (ANDESERSEN, 2005; MORAIS; COSTA, 2008; TREDICI, 2010). Além disso, conhecer as condições de cultivo de um determinado local possibilita selecionar a espécie de microalga mais adequada para ser cultivada. Entre os principais fatores que influenciam nas condições de cultivo de microalgas estão a iluminação, temperatura, movimentação das culturas, pH, características qualitativas e quantitativas de nutrientes, salinidade, concentração de oxigênio dissolvido e de compostos tóxicos, como alguns metais pesados (ANDERSEN, 2005; KUMAR et al., 2010). Entre os fatores biológicos que influenciam o crescimento de uma cultura de microalgas, estão a presença de predadores, vírus, competidores e crescimento de organismos epífitos (KUMAR et al., 2010).

Segundo Tredici (2010) a grande vantagem do cultivo de microalgas é a possibilidade de modificação da composição celular, através da manipulação das condições de cultivo.

Iluminação

Como a luz é a principal fonte de energia para as microalgas fotoautotróficas, a condição de luz, a qual deve ser considerada em termos de fotoperíodo (tempo de exposição à luz), intensidade e qualidade (comprimento de onda), é de fundamental importância (DUBINSKY, 1990; VOLTOLINA et al., 1998).

As microalgas necessitam de luz para realizar a fotossíntese e produzirem biomassa. A luz pode ser suprida aos cultivos continuamente ou em ciclos, variando entre um período claro e outro escuro. Algumas microalgas, quando submetidas à iluminação constante, não sobrevivem (ANDERSEN, 2005) enquanto outras podem apresentar um maior crescimento (DERNER et al., 1994, DERNER, 1995). Em cultivos laboratoriais de microalgas os regimes de fotoperíodos variam entre 12:12 a 16:8 horas (claro:escuro) (ANDERSEN, 2005).

Durante o período escuro, não ocorre fotossíntese, portanto, as microalgas consomem a energia estocada para o processo de respiração. Dependendo da temperatura e de outras condições de cultivo, acima de 25 % da biomassa produzida durante o dia pode ser perdida durante a noite (CHISTI, 2007).

Quanto à intensidade de luz, conforme a concentração celular se altera, modificam-se as necessidades de iluminação. Em geral, quanto maior a concentração celular menor é a profundidade em que a luz penetra nas culturas (FAO, 2009). O crescimento microalgal é limitado, tanto pela baixa disponibilidade de luz, como pela iluminação em excesso. Em culturas densas pode ocorrer o sombreamento pelas próprias células, impedindo que parte da cultura receba luz, o que, apesar de diminuir o crescimento, pode aumentar o conteúdo de pigmentos (FÁBREGAS et al., 2001). Já a iluminação em excesso pode resultar em estresse foto-oxidativo em algumas microalgas, bem como resultar em um aquecimento localizado, submetendo as culturas a altas temperaturas (BARBOSA et al, 2003).

Em cultivos de microalgas para utilização em aquicultura, recomenda-se para volumes de 250 mL a 2L, 18L e 500L intensidade de luz na faixa de 40, 80 e 95 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente. Para cultivos maiores pode-se utilizar até 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (SILVA et al., 2003).

A luz utilizada pelos cultivos pode ser natural, proveniente da luz solar, ou artificial, geralmente suprida com luzes do tipo “luz do dia e “branca-fria”. Quando utilizada a luz solar, o cultivo fica dependente do fotoperíodo natural, e da localização geográfica. No entanto, há um decréscimo no custo de produção (FAO, 2010).

As fontes de luz artificial têm espectros que não são, necessariamente, idênticos à luz do sol. Sabe-se também que a qualidade da luz pode afetar o crescimento, metabolismo, reprodução e morfologia de cada microalga cultivada (SILVA et al., 2003).

A fixação de carbono também pode ser afetada pela luminosidade. Apenas cerca de 45% do total espectro de luz pode ser utilizado pela fotossíntese (faixa de luz visível entre 400 – 700 nm.). Como a captura do dióxido de carbono pelo processo de fotossíntese possui uma eficiência máxima de 27% (MORITA et al., 2000), multiplicando estes dois fatores, Gao et al. (2007) relatam que a conversão teórica máxima da energia luminosa em energia química pela fotossíntese, é de 11%.

Temperatura

A temperatura deve ser cuidadosamente controlada e/ou monitorada. Em condições laboratoriais onde se deseja preservar cepas de microalgas, é interessante que a temperatura esteja estabilizada em condições que não oscilem mais do que 2 °C. Cepas de microalgas de água doce, em geral, são mais tolerantes a variações na temperatura que cepas marinhas. Muitas microalgas de água doce podem ser mantidas em laboratório sob temperaturas da ordem de 20°C (ANDERSEN, 2005). No entanto algumas cepas permitem a utilização de temperaturas menores, diminuindo a frequência de manutenção nas culturas (ARREDONDO-VEGA; VOLTOLINA, 2007).

Para que haja um rápido desenvolvimento microalgal, é interessante manter uma faixa de temperatura ótima, conforme os limites de tolerância de cada espécie. Segundo Colla et al.(2002) a temperatura pode influenciar a produção de biomassa e sua composição de proteínas e lipídios. Os mesmos autores relatam que cultivos da microalga *Scenedesmus platensis* realizados a 35 °C, apesar de obterem uma menor taxa de crescimento de biomassa do que quando cultivadas à 30 °C, apresentam maiores concentrações de lipídios e proteínas.

Costa et al. (2006) estudando as microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* verificaram que estas espécies, quando cultivadas à 35 °C, apresentam as concentrações máximas de biomassa e maior

conteúdo de lipídios. Ainda, Sakai et al. (1995) relatam que, a temperaturas elevadas, certos tipos de microalgas continuam se desenvolvendo, como a *Chlorella*, que é tolerante à temperaturas em torno de 42 °C.

A temperatura ótima varia entre as diferentes espécies de microalgas e é influenciada por outros parâmetros ambientais como, por exemplo, a intensidade luminosa (KUMAR et al., 2007). Segundo Kumar et al. (2007) têm sido relatado temperaturas ótimas para o crescimento microalgal entre 15° C e 26° C, com a densidade celular máxima obtida a 23° C.

Segundo Vonshak (1997) a temperatura pode influenciar a atividade fotossintética e a respiração. A taxa de respiração aumenta conforme a temperatura, o que pode diminuir a produtividade do cultivo, devido a maior perda noturna de biomassa (RICHMOND; GROBBELAAR, 1986).

Agitação

Uma agitação moderada nos cultivos de microalgas é importante para assegurar uma iluminação ótima aos microrganismos, adequada troca gasosa e contribuir com a manutenção da temperatura e pH. Uma boa homogeneização previne a sedimentação das células e evita o surgimento de estratificação térmica no tanque e de zonas anóxicas que favoreçam a produção de gases indesejáveis ao cultivo. Por outro lado, uma agitação em excesso pode comprometer o cultivo, através do choque entre as células (RICHMOND, 2004; ANDERSEN, 2005).

Na maior parte dos sistemas de cultivo de microalgas a agitação ocorre através do borbulhamento de ar. A introdução de ar nos sistemas de cultivo, além de servir como fonte de CO₂, proporciona adequada mistura do meio, evitando a formação de um gradiente de concentrações de nutrientes. Ele também propicia adequada exposição das microalgas à luz, evitando o autosombreamento, adequada remoção de oxigênio dissolvido do meio, e controle do pH, com a introdução do dióxido de carbono (KUMAR et al., 2010).

pH

A maioria das microalgas são tolerantes a grandes variações do pH. Em geral, microalgas eucarióticas de água doce preferem ambientes

levemente ácidos (pH 5-7), enquanto cianobactérias preferem ambientes levemente alcalinos (pH 7-9) (ANDERSEN, 2005).

O pH do meio de cultivo determina a solubilidade de CO₂ e dos minerais, bem como a distribuição das formas inorgânicas de carbono, influenciando direta e indiretamente no metabolismo das microalgas (ARREDONDO-VEGA; VOLTOLINA, 2007).

A remoção de CO₂ da água provoca um aumento do pH. As microalgas retiram o dióxido de carbono dissolvido e ainda liberam metabólitos, que contribuem com um ambiente mais alcalino. Valores altos de pH limitam a disponibilidade de carbono e outros nutrientes para as algas. A concentração muito alta ou muito baixa de íon hidrogênio pode diminuir o crescimento algal por interrupção dos processos celulares (SILVA et al., 2003).

Uma estratégia para controlar o pH do cultivo é controlar o uso de dióxido de carbono, já que a adição de CO₂ acidifica o meio de cultura (BABCOCK et al., 2002).

Nutrientes

Para que as microalgas tenham um crescimento ótimo, além dos fatores já relacionados, é necessária a presença de determinados elementos químicos e vitaminas no meio de cultivo. Os nutrientes, em função de sua importância e das concentrações necessárias, são classificados em macro ou micro nutrientes. Os macronutrientes incluem nitrogênio, fósforo, além de outros como C, H, O, Mg, S, K, Si e Ca. Já os micronutrientes consistem de vários metais-traço (B, Fe, Cu, Co, Mn, Zn, Mo) e vitaminas (MORALES, 1991). Os três nutrientes mais importantes para o crescimento autotrófico são o carbono, o nitrogênio e o fósforo, sendo seu fornecimento essencial para o metabolismo microalgal (RICHMOND, 2004).

Segundo Abalde et al. (1995) as necessidades nutricionais são dependentes das condições ambientais e variam entre as espécies. Não há um número universal e exato de elementos químicos essenciais para microalgas. Certos elementos são essenciais para determinados grupos taxonômicos ou espécies e não o são para as outras. Portanto, os diferentes elementos e nutrientes são necessários em concentrações altamente variáveis (LOURENÇO, 2006).

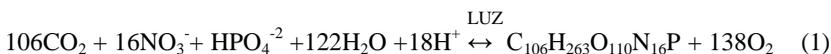
A proporção de nitrogênio pode variar de 1 a 10% do peso seco da célula. Esta variação não ocorre apenas entre diferentes grupos de microalgas, mas entre diferentes populações de uma mesma espécie, dependendo do fornecimento e disponibilidade deste nutriente

(RICHMOND, 2004). O papel do nitrogênio no metabolismo celular é fundamental, pois, é componente de todos os aminoácidos, nucleotídeos e pigmentos. A assimilação de nitrogênio se produz à base de nitratos, nitritos e amônia (RICHMOND, 1990). No entanto, a amônia e o íon amônio (NH_3 e NH_4^+ , respectivamente) são formas nitrogenadas utilizadas preferencialmente pelo fitoplâncton, dispensando as etapas de redução verificadas para todas as demais formas químicas do nitrogênio. Nos meios de cultura, as principais formas de nitrogênio empregadas são sais de nitrato (NaNO_3 , HNO_3), sais de amônio (NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e ureia (LOURENÇO, 2006). Entretanto, a amônia, quando empregada em cultivos com pH elevado, pode ser perdida do meio de cultura devido a sua volatilização nestas condições (RICHMOND, 2004).

Apesar de o fósforo apresentar menos de 1% da composição celular microalgal, é geralmente um dos mais importantes fatores de limitação do crescimento em cultivos já que pode se associar com outros íons como, carbonato e ferro, resultando em sua precipitação e, conseqüentemente, tornando-o não disponível para as microalgas (RICHMOND, 2004). O fósforo desempenha um importante papel em muitas biomoléculas, como os ácidos nucléicos, proteínas e fosfolipídios. Sua atuação é fundamental na transferência de energia através do ATP, e em outros componentes energéticos da fotossíntese e respiração. O fosfato inorgânico, como o ortofosfato (HPO_4^{3-}), é a principal forma das células de microalgas adquirirem fósforo. Já o fosfato orgânico é utilizado como fonte primária de fósforo, o qual é hidrolisado por enzimas extracelulares resultando em fósforo inorgânico (RICHMOND, 1990). Em cultivos, o fósforo tende a ser adicionado aos meios de cultura, em altas concentrações, como fosfatos ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , entre outros) (LOURENÇO, 2006).

A relação nitrogênio-fósforo (N:P) é bastante importante no meio de cultura já que além de determinar a produtividade, contribui com a manutenção da dominância de certas espécies no cultivo. A relação de Redfield (106C:16N:1P) é amplamente utilizada como um ponto de referência para quantificar as possíveis limitações de nutrientes (RICHMOND, 2004).

Através do balanço estequiométrico da equação da fotossíntese (Equação 1) é possível estimar a demanda de nitrogênio e fósforo em cultivo de microalgas:



Exemplo para o nitrogênio:

- Massa molecular do $\text{NO}_3^- = 62$
- Massa atômica do N = 14
- Portanto, são necessários 992 g (16 x 62) de NO_3^- para a fixação de 224g (16 x 14) de nitrogênio.
- Considerando a concentração de nitrogênio na biomassa seca próxima a 10%, tem-se que, para a produção de 2.240g de biomassa existe uma demanda de 992g de NO_3^- . Ou para cada 1kg de biomassa produzida a uma demanda de 442g de NO_3^- .

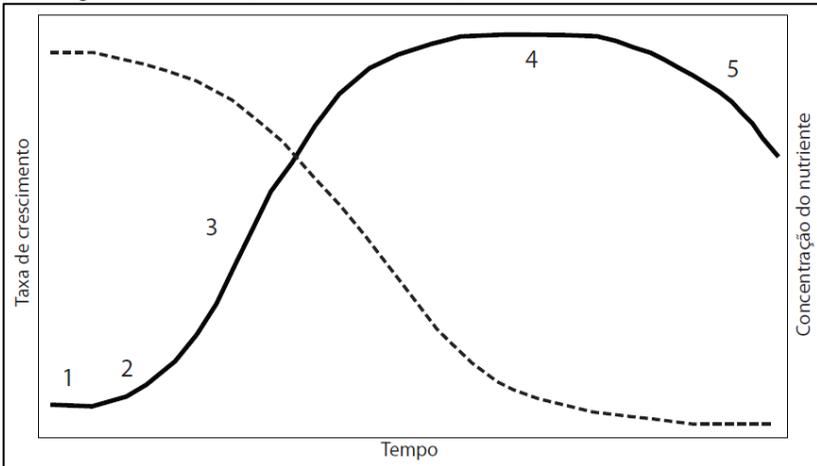
Com o balanço estequiométrico da equação acima estima-se que para a produção de 1g de biomassa microalgal necessita-se de 0,44g de nitrato (NO_3^-) e 0,03g de fosfato (HPO_4^{2-}). Entretanto, geralmente o meio de cultura utilizado no cultivo de microalgas possui nitrogênio e fósforo em excesso para garantir que não seja o fator limitante ao crescimento (RICHMOND, 2004).

O custo da utilização de nutrientes no cultivo pode variar entre 10 a 30% do custo total de produção. Para manter um baixo custo, é possível recircular o meio, ou, para algumas microalgas, pode-se aproveitar efluentes tratados como fonte de nutrientes (ASLAN; KAPDAM, 2006; PEREZ-GARCIA et al., 2011). Ambientalmente, este aproveitamento pode ser favorável já que a assimilação dos nutrientes pelas microalgas diminuirá a concentração destes nos efluentes despejados (ANDERSEN, 2005).

Segundo Sheehan et al. (1998) o estresse causado pela deficiência de nutrientes, apesar de acarretar em um menor crescimento microalgal, pode aumentar o acúmulo de lipídios na biomassa. Por isso, em função do propósito do cultivo (manutenção das culturas no banco de cepas; alto rendimento de biomassa; favorecimento da biossíntese de biocompostos de alto valor, etc.) necessita-se formulações de meio de cultura bastante variadas (RICHMOND, 2004).

Segundo Richmond (2004), tipicamente, em sistemas de cultivos em batelada, o crescimento microalgal, frente à concentração de nutrientes, comporta-se conforme apresentado na Figura 1.

Figura 1 - Relação da curva de crescimento microalgal (curva contínua) com a curva de concentração de nutrientes (curva tracejada) em um cultivo de microalgas em batelada (RICHMOND, 2004).



Fonte: (RICHMOND, 2004).

Quando determinado nutriente é limitante, sua concentração determinará a produtividade do cultivo. Entretanto, a taxa fotossintética determinará a taxa em que esta produtividade é alcançada (RICHMOND, 2004).

2.2.2.2 O Carbono no cultivo de microalgas

Entre os macronutrientes, o carbono é considerado o mais importante, uma vez que constitui ao redor de 50% da biomassa microalgal, compondo todas as substâncias orgânicas sintetizadas pelas células. O CO_2 é a fonte de carbono para o crescimento fotossintético, autotrófico, das algas. O crescimento das microalgas comumente encontra-se limitado por este composto (RICHMOND, 1990).

As microalgas fotoautotróficas, no período de iluminação, convertem a energia solar, durante a fase clara da fotossíntese, em energia química na forma de adenosina tri-fosfato (ATP) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH). Com estes compostos como fonte de energia, fixam e reduzem o CO_2 para sintetizar carboidratos e outros compostos orgânicos celulares durante a fase escura da fotossíntese (LEHNINGER, 1990).

A enzima Ribulose Difosfato Carboxilase (Rubisco) está envolvida na fixação do carbono inorgânico, do qual uma parte é usada para a manutenção celular e para o crescimento, enquanto outra parte é estocada. A forma de armazenamento do carbono é altamente variada entre as classes de microalgas e a quantidade é dependente das condições ambientais (FALKOWSKI; RAVEN, 1997). Entre as diferentes via metabólicas possíveis, o carbono pode ser estocado na forma de lipídios ou carboidratos (SHEEHAN et al., 1998)

O carbono inorgânico apresenta-se na forma de dióxido de carbono (CO_2), ácido carbônico (H_2CO_3), bicarbonato (HCO_3^-) e carbonato (CO_3^{2-}). O CO_2 reage com a água formando ácido carbônico, o qual pode ser dissociado em íons bicarbonato e H^+ . O bicarbonato, por sua vez, pode ser dissociado em íons carbonato e H^+ . Estas reações dependem do pH do cultivo. Quanto mais ácido estiver o meio, maior a proporção de CO_2 (livre), enquanto conforme aumenta-se o pH eleva-se as concentrações de HCO_3^- e CO_3^{2-} (ESTEVES, 1988).

Segundo Raven (1988) o CO_2 é a fonte de carbono preferida pelas microalgas, uma vez que se difunde rapidamente (difusão passiva) da água para o interior das células e é usado diretamente nos processos de fixação. Já o bicarbonato, é incorporado ativamente, gerando um gasto energético para suportar este processo.

O ar atmosférico contém apenas 0,038% de dióxido de carbono. Apenas a difusão natural do ar atmosférico para o meio de cultura não satisfaz os requerimentos de carbono para alta produtividade em cultivos intensivos de microalgas, sendo necessária a adição deste gás às culturas. A disponibilização de CO_2 aos cultivos pode ser feita pela injeção de ar atmosférico ou ainda de ar enriquecido, utilizando cilindros pressurizados de dióxido de carbono puro, o que pode aumentar consideravelmente a produtividade (MORAIS; COSTA, 2008; JACOB-LOPEZ et al., 2008; CHIU et al., 2008; CHIU et al., 2009; BILANOVIC et al., 2009).

No caso de introdução de ar atmosférico, geralmente utiliza-se sopradores (blowers) e compressores. A diferença básica entre eles está no requerimento de pressão e volume de ar fornecido. Os blowers fornecem grandes volumes de ar em baixa pressão, enquanto que os compressores fornecem pequenos volumes de ar em alta pressão. A pressão requerida é determinada através das necessidades de o gás resistir à pressão da coluna d'água na profundidade do difusor, das perdas de carga nos tubos e da resistência imposta pelo difusor ao fluxo de ar. O volume de ar requerido é determinado através da demanda de

dióxido de carbono e da eficiência do sistema de transferência de gás (TIMMONS; EBELING, 2007).

Apesar da importância do CO₂ para cultivos autotróficos, em cultivos heterotróficos e mixotróficos algumas microalgas podem crescer empregando diferentes rotas nutricionais, utilizando compostos orgânicos como fonte de carbono (DERNER, 2006).

Dióxido de Carbono Dissolvido

A atmosfera é composta por 20,946% oxigênio, 78,084% nitrogênio, 0,934% argônio, 0,038% dióxido de carbono e outros gases traços (Quadro 2) (TIMMONS; EBELING, 2007).

Quadro 2 - Componentes do Ar Seco.

Gás	Volume(%)	Massa (%)	Massa Molecular
Nitrogênio	78,084	75,600	28,0
Oxigênio	20,946	23,200	32,0
Argônio	0,934	1,300	44,0
Dióxido de Carbono	0,038	0,048	39,9
Ar	100,000	100,000	29,0

Fonte: Timmons e Ebeling (2007).

Entende-se por pressão atmosférica a soma das pressões parciais exercidas por cada gás presente na atmosfera. A pressão parcial de cada gás é diretamente proporcional a sua fração molar (LEKANG, 2007).

Na água, a Pressão Total dos Gases (PTG) é a soma das pressões parciais de cada gás dissolvido, a qual pode ser maior ou menor que a pressão atmosférica. Quando a taxa da PTG é maior que a pressão atmosférica a água é considerada supersaturada (LEKANG, 2007).

A solubilidade dos gases na água (mg L⁻¹) depende da temperatura, salinidade, composição dos gases, e pressão total, e é apresentada no Quadro 3, a qual faz referência aos gases presentes em maior quantidade no ar. Com o aumento da fração molar e/ou de sua pressão absoluta, a solubilidade do gás aumenta (TIMMONS; EBELING, 2007).

Quadro 3 - Solubilidade em água a 15 °C dos quatro gases presentes no ar em maior quantidade

Gás	Solubilidade Natural (mg L ⁻¹)	Solubilidade do Gás Puro 100% (mg L ⁻¹)
O ₂	10,08	48,14
N ₂	16,36	20,95
Ar	0,62	65,94
CO ₂	0,69	1992,00

Fonte: Timmons e Ebeling (2007).

A concentração de saturação de um gás dissolvido em um líquido é função da pressão parcial do gás sobre o líquido. Esta relação é demonstrada pela lei de Henry (Equação 2) (METCALF; EDDY, 1991):

$$P_g = H \cdot X_g \quad (2)$$

Onde:

P_g = Pressão parcial do gás (atm);

H = Constante da lei de Henry;

X_g = fração molar de equilíbrio do gás dissolvido.

Os níveis de saturação de um gás são calculados em função da temperatura e da pressão, baseado na lei de Henry e demonstrado na Equação 3 (COLT, 1984 apud TIMMONS; EBELING, 2007):

$$C_{s,i} = 1000 \cdot K_i \cdot \beta \cdot K_i \cdot \frac{P_{BP} - P_{wv}}{760} \quad (3)$$

Onde:

$C_{s,i}$ = Concentração de saturação do gás dissolvido (mg L⁻¹);

K_i = relação peso molecular-volume (mg L⁻¹);

β_i = Coeficiente de Bunsen para o gás “i” (L L-atm⁻¹);

X_i = Fração molar do gás (adimensional);

P_{BP} = Pressão barométrica (mm de Hg);

P_{wv} = Pressão de vapor d'água (mm de Hg).

A concentração de saturação do dióxido de carbono pode ser alterada proporcionalmente a alteração da pressão, mantendo a mesma fração molar, ou, proporcionalmente a fração molar, dentro de uma mesma pressão (Quadro 4) (TIMMONS; EBELING, 2007).

Quadro 4 - Concentração de saturação do CO₂ em diferentes concentrações no ar, considerando a temperatura da água em 20°C.

Concentração de CO ₂ no ar (%)	Concentração de saturação do CO ₂ (mg L ⁻¹)
0,038	0,71
5	94,3
10	188,6
15	282,9
20	377,2
100	1.886

Fonte: Adaptado de Timmons e Ebeling, (2007).

A tolerância à concentração de CO₂ é bastante variável entre as espécies de microalgas. No entanto, a concentração de dióxido de carbono, na fase gasosa, não necessariamente representa a concentração de CO₂ em que a microalga está exposta durante o cultivo, a qual depende do pH e do gradiente de concentração de dióxido de carbono criado pela resistência à transferência de massa (KUMAR et al., 2010).

Quando o ar está em contato com a água, os gases dissolvidos na água tendem a entrar em equilíbrio com a pressão parcial dos gases na atmosfera. Dois fatores que impactam diretamente a taxa de transferência de gases são: a área da interface gás-líquido e a diferença entre a concentração de saturação e a concentração do gás existente na água. Portanto, se a água estiver supersaturada com determinado gás, este sairá da solução, já quando estiver insaturada, o gás entrará. A taxa de transferência dos gases depende do déficit do gás dissolvido e o coeficiente de transferência de gases. O coeficiente de transferência de gases representa a condição em um determinado sistema de transferência de gases, o qual varia conforme o coeficiente de difusão do gás, a tensão superficial do líquido e a interface gás-líquido. Otimizando estes fatores é possível aumentar a taxa de transferência de gases. Esta otimização pode ser alcançada, por exemplo, com a diminuição da tensão superficial do líquido, através do aumento da turbulência; com o aumento da interface gás-líquido, através da formação de bolhas de ar menores; ou com o aumento do gradiente de concentração (TIMMONS; EBELING, 2007).

A transferência de CO₂ do ar para a água ocorre devido ao fato de haver uma diferença de pressão entre o CO₂ no ar e o CO₂ dissolvido. Um gás pode ser transferido de um ambiente com baixa pressão total de gases para um de maior (PTG) caso a pressão parcial deste gás seja maior que a pressão parcial encontrada no ambiente para o qual está

sendo transferido. Os designs e os métodos operacionais influenciam e controlam a resistência na transferência de gases. A diferença entre as pressões parciais determinarão o potencial de equilíbrio dos gases dissolvidos, conforme demonstrado na Equação 4 (TIMMONS; EBELING, 2007).

$$Q_{1\frac{massa}{tempo}} = \frac{1}{R_{press\tilde{a}o}} \cdot (P_{CO_2\text{alta}} - P_{CO_2\text{baixa}}) \quad (4)$$

Onde:

Q_1 = taxa do fluxo gasoso;

$R_{press\tilde{a}o}$ = Resistência a transferência de gás;

$P_{CO_2\text{alta}}$ = Pressão Parcial do Gás no estado em que se encontra maior;

$P_{CO_2\text{baixa}}$ = Pressão Parcial do Gás no estado em que se encontra menor.

A eficiência de transferência de gases depende do tipo e porosidade do difusor, do tamanho das borbulhas produzidas, da profundidade de submersão, etc (METCALF; EDDY, 1991). Entre os diversos equipamentos disponíveis para transferência de gases, o borbulhamento de ar enriquecido com CO_2 no fundo do reator, através de difusores porosos de borbulhas, tem sido o método mais utilizado nos cultivos de microalgas (KUMAR et al., 2010). Através deste método de distribuição de gases pode-se alcançar uma moderada eficiência de transferência de gases, variando entre 10 e 30% (METCALF; EDDY, 1991).

Ciclo do Ácido Carbônico; Bicarbonato; Carbonato

O dióxido de carbono é altamente solúvel na água (ver item 2.4.2.1), mas sua concentração natural na água é baixa ($0,54 \text{ mg L}^{-1}$ a $20 \text{ }^\circ\text{C}$) devido a sua baixa concentração na atmosfera (TIMMONS; EBELING, 2007).

Dissolvido em meio líquido, o dióxido de carbono difere de outros gases, como o oxigênio e o nitrogênio, pois, a sua concentração na água é determinada tanto pela relação de equilíbrio gás-líquido, quanto por reações ácido-base (Quadro 5). O equilíbrio gás-líquido influencia na transferência de CO_2 entre o ar e a água. Já as reações ácido-base determinam a forma química na qual o carbono inorgânico dissolvido está presente na água. A concentração de dióxido de carbono dissolvido está em função do pH e da alcalinidade presente na água (Figura 2) (TIMMONS; EBELING, 2007).

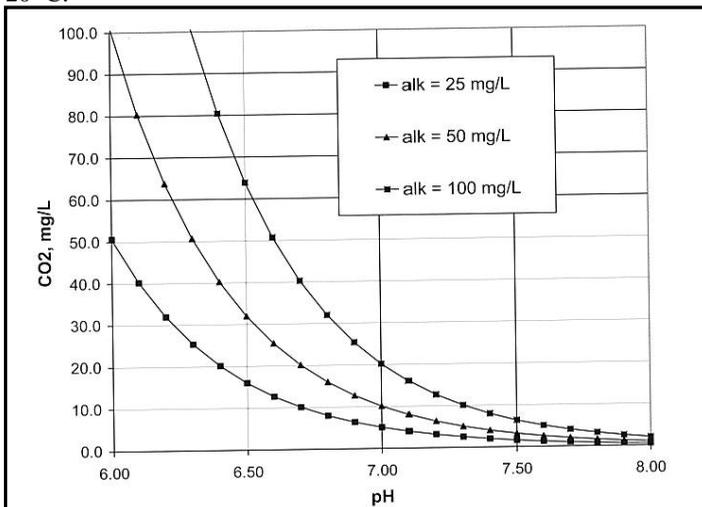
Quadro 5 - Reações de equilíbrio ácido-base do sistema carbonato.

Tipo de equilíbrio	Relações de equilíbrio
Gás-líquido	$\text{CO}_2 (\text{g}) \leftrightarrow \text{CO}_2 (\text{aq})$
Hidratação-desidratação	$\text{CO}_2 (\text{aq}) + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$
Ácido-base	$\text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$
Ácido-base	$\text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_3^{2-} + \text{H}^+$
Ácido-base	$\text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{OH}^- + \text{H}^+$
Dissolução-precipitação	$\text{CaCO}_3 \leftrightarrow \text{CO}_3^{2-} + \text{Ca}^{2+}$

Fonte: Adaptado de Timmons e Ebeling (2007).

O pH, a alcalinidade e a concentração de carbono inorgânico total (CtCO_3) influenciam a concentração de dióxido de carbono na água. A partir do conhecimento de dois destes três parâmetros é possível determinar a concentração de equilíbrio deste gás (TIMMONS; EBELING, 2007).

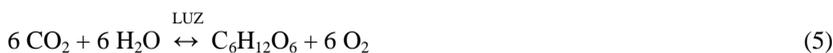
Figura 2 - Relação do pH, da alcalinidade e da concentração de CO_2 em situações de alcalinidade 25, 50 e 100 mg L^{-1} em água com 0 ppt de salinidade e 20 °C.



Fonte: (TIMMONS; EBELING, 2007).

Fixação de Carbono Através de Microalgas

Assim como qualquer organismo fotossintético, as microalgas fotoautotróficas utilizam o CO₂ como fonte de carbono. Não há crescimento na ausência de CO₂, enquanto um suprimento insuficiente deste gás é, geralmente, o fator limitante de produtividade (FAO, 2009). A quantidade de dióxido de carbono capturado depende da espécie de microalga. Baseando-se na composição química média da biomassa microalgal, aproximadamente 1,8 toneladas de CO₂ são necessárias para a produção de 1 tonelada de biomassa (CHISTI, 2007). Esta demanda de CO₂ é estimada através do balanço estequiométrico da equação simplificada da fotossíntese (Equação 5), conforme demonstrado a seguir:



- Massa molecular do CO₂ = 44;
- Massa atômica do carbono = 12;
- Portanto, são necessários 264 g (6 x 44) de CO₂ para a fixação de 72g (6 x 12) de carbono;
- Como a concentração de carbono na biomassa seca é próxima a 50%, tem-se que para a produção de 144g de biomassa existe uma demanda de 264g de CO₂. Esta relação é equivalente a 1,8g CO₂: 1g biomassa.

A dissolução natural do ar para a água não é o suficiente. Esta concentração pode ser aumentada borbulhando ar na água. Contudo, como a concentração de dióxido de carbono no ar é de aproximadamente 0,038%, seria necessário todo o CO₂ contido em 37.000 m³ de ar para produzir uma tonelada de biomassa microalgal seca (FAO, 2009).

Existem outras opções para aumentar o suprimento de CO₂ para as culturas, como o uso de dióxido de carbono puro, o qual tem um elevado custo, ou o uso de um fluido gasoso residual de um determinado processo. Todas as opções que envolvem a queima de combustíveis para gerar energia podem ser fontes potenciais de CO₂ (SHEEHAN et al., 1998).

Os efluentes gasosos, como os de usinas termoeletricas, podem conter entre 4 a 20% de CO₂ e não apresentar custo algum para uso como fonte de carbono em cultivo de microalgas. Caso haja a disponibilidade de um recurso financeiro, através de incentivos, para a prevençao das emissões de gases do efeito estufa, o uso destes efluentes pode gerar renda adicional à comercializaçao da biomassa. O dióxido de carbono, nos sistemas de cultivos de microalgas fotoautotróficas, apenas é necessário enquanto haver disponibilidade de luz. Em sistemas de cultivos que utilizam luz natural, a fim de evitar perdas de CO₂ emitidos durante a noite, é possível dissolver-lo em sua máxima concentraçao, e adicionar esta água ao sistema de cultivo durante o dia. Em tanques de cultivo abertos, parte do CO₂ inoculado ao cultivo e de outros gases (NO_x e SO_x) presentes no fluido gasoso não serão absorvidos. Estes gases irão para a atmosfera, como aconteceria normalmente (FAO, 2009).

Alguns autores têm reportado que os fluidos gasosos de processos de combustao podem ser utilizados para cultivar microalgas sem comprometer o cultivo (MORAIS; COSTA, 2008; BILANOVIC et al., 2009; CHIU et al., 2009). Pedroni et al. (2001) relatam que uma fazenda de produçao comercial de microalgas situada no Hawaii, EUA, utiliza dióxido de carbono proveniente de uma pequena termoeletrica. Além disso, o gás NO_x, também gás de efeito estufa, pode servir como fonte de nitrogênio, quando dissolvido no sistema de cultivo (MORAIS; COSTA, 2008).

A quantidade de fluido gasoso necessário por área depende da espécie de microalga, da intensidade luminosa ao longo do dia e da temperatura do cultivo. Portanto, deve ser otimizada para cada aplicaçao específica. Altas concentrações de dióxido de carbono dissolvido irão afetar o pH, logo, pode ser necessário o seu controle (FAO, 2009).

Além da biofixaçao pelo processo fotossintético, o sequestro de carbono pode ocorrer também através da mineralizaçao e precipitaçao de carbonatos e bicarbonatos. Isto ocorre devido a alcalinizaçao do meio, durante o desenvolvimento do cultivo e através de algumas microalgas que produzem ao redor de suas células carbonato de cálcio (CaCO₃) (MOHEIMANI; BOROWITZKA, 2007).

Jacob-Lopes et al. (2010) relatam que entre as rotas de fixaçao de CO₂ estão a secreçao de biopolímeros no meio de cultura, a emissao de compostos orgânicos voláteis (COV) para a atmosfera e pela precipitaçao química, através da reaçao dos íons bicarbonato e carbonato com elementos presentes no meio de cultivo, como cálcio e magnésio. Os mesmos autores estudando a biotransformaçao do CO₂ através do

cultivo da microalga *Aphanotece microscópica Nägeli* em fotobiorreatores, relatam que apenas 3,1% do total de CO₂ sequestrado foi convertido em biomassa microalgal, sendo que, do restante a maior parte pode ter sido transformado em COV e biopolímeros. Jacob-Lopes et al. (2007) relatam que esta mesma cianobactéria, *Aphanotece microscópica Nägeli*, cultivada em fotobiorreatores de 3,2 L de volume, com temperatura de 30° C, intensidade luminosa de 80 $\mu\text{mol s}^{-1}$, sob injeção de ar (1 L min⁻¹) enriquecido com dióxido de carbono em concentrações de 3, 25 e 62% (v v⁻¹) obtiveram taxas de remoção de CO₂ de 0,8; 1,4 e 5,3 mg L⁻¹ min⁻¹, respectivamente.

A influência da concentração do CO₂ do ar, introduzido no cultivo, sobre o crescimento e fixação de carbono, varia conforme a espécie e as condições de cultivo. Morais e Costa (2007) determinaram a fixação de CO₂ através do cultivo em fotobiorreatores das microalgas *Scenedesmus obliquus* e *Spirulina* sp. a uma temperatura de 30° C, com injeção de ar enriquecido com dióxido de carbono em concentrações de 6 e 12% (v v⁻¹), a uma vazão de 0,3 L min⁻¹. Estes autores adicionaram o ar enriquecido com CO₂ por 15 minutos a cada 2 horas durante o período de iluminação. A maior taxa de fixação de carbono verificada neste experimento foi de 37,9% no cultivo de *Spirulina* sp. sob a introdução de 6% de dióxido de carbono.

Chiu et al. (2009) avaliaram o crescimento da microalga marinha *Nannochloropsis oculata* e a produção de lipídios, quando cultivadas sob introdução de diferentes concentrações de dióxido de carbono no ar (2, 5, 10 e 15%). A máxima concentração celular e a maior produtividade de lipídios foram alcançadas nos cultivos em que foi introduzido ar contendo 2% de CO₂. As quantidades de CO₂ removidas pelas culturas foram de 0,211, 0,234, 0,350 e 0,393 g h⁻¹ para as proporções de dióxido de carbono no ar de 2, 5, 10 e 15%, respectivamente.

Ho et al. (2010) determinaram o consumo de dióxido de carbono através do cultivo de *Scenedesmus obliquus* nativas de suas regiões (sul de Taiwan), o qual foi de 390,2 mg L⁻¹ dia⁻¹ quando cultivada sob a introdução contínua de ar contendo 20% (v v⁻¹) de CO₂, obtendo uma produtividade de 2,63 g L⁻¹. Segundo estes autores, uma alta produtividade é importante economicamente para o processo de fixação de carbono através do cultivo de microalgas, pois além de possibilitar mais biomassa para o uso comercial (ver item 2.2.5), pode diminuir o tempo de cultivo.

Jacob-Lopes et al. (2009) cultivando a microalga *Aphanotece microscópica Nägeli* em fotobiorreatores de 2,4L sob a introdução

contínua de ar contendo 15% (v v⁻¹) de CO₂ (vazão de 1 L min.⁻¹) obtiveram uma capacidade de eliminação de CO₂ de 12,217g_{carbono} m⁻³ reator .dia⁻¹ e uma eficiência de remoção de dióxido de carbono de 52,5%.

Segundo resultados apresentados por Jacob-Lopes et al. (2010), a quantificação de CO₂ removido, tanto na fase líquida, quanto gasosa, é possível, apresentando resultados muito similares, obtendo um coeficiente de determinação (r²) de 0,95. Nesta pesquisa, os autores relatam uma remoção líquida de dióxido de carbono de 25,7g_{co2} L⁻¹ durante 168 horas de cultivo em batelada, com fotoperíodo (12:12).

Com o intuito de gerar créditos de carbono a partir de microalgas, é necessária uma metodologia para determinar como calcular a exata quantidade de gases do efeito estufa que foram biofixadas. Segundo relatório da FAO (2009) tal metodologia ainda não existe, impossibilitando estimar precisamente os custos de mitigação de CO₂ através do cultivo destes microrganismos.

De acordo com Benemann (1997) em comparação com vegetais superiores utilizados para a captação de CO₂, as microalgas apresentam algumas vantagens como:

- Microalgas podem ser cultivadas utilizando diretamente os gases de combustão, enquanto os vegetais superiores apenas captam o CO₂ atmosférico;
- Microalgas podem conter maiores concentrações de determinado produto final desejado, pois, diferentemente dos vegetais superiores, apresentam uma biomassa uniforme;
- As microalgas, por apresentarem uma biomassa uniforme, não apresentando raízes, frutos, tronco, entre outras partes, podem ser inteiramente processadas;
- Apesar de o crescimento das microalgas ser dependente das condições climáticas, este não apresenta um ciclo anual de produção, como os vegetais superiores, que são semeados em uma estação e colhidos em outra;
- Pesquisas com microalgas apresentam resultados mais rápidos em comparação com outros sistemas de produção de biomassa, devido à elevada taxa de crescimento destes microrganismos.

2.2.2.3 Sistemas de cultivo

Conforme descrito no Item 2.2.2.1, para cultivar microalgas é necessário que sejam ajustadas algumas condições relativamente simples como luz, fonte de carbono, água, temperatura e nutrientes. Diferentes sistemas de cultivos, capazes de oferecer tais condições, têm sido desenvolvidos nas últimas décadas (OSWALD, 1988; RICHMOND, 1990; MOLINA GRIMA et al., 1995; TREDICI; ZITELLI, 1998; MAZZUCA SOBCZUCK et al., 2000; PULZ, 2001; JANSSEN et al., 2002; UGWU et al., 2002; BARBOSA et al., 2003; HALL et al., 2003; LEBEAU; ROBERT, 2003; CHISTI, 2007; KUMAR et. al., 2011; ZHAO et. al., 2011; VASUMATHI, et. al., 2012). No entanto, é difícil ajustar tais parâmetros em sistemas de cultivos de larga escala, os quais podem variar desde sistemas muito simples, em tanques abertos, expondo a alga ao meio ambiente, a sistemas fechados, com alta capacidade de controle e com altos custos de instalação e operação. Tratando-se de produção de microalgas para geração de biocombustíveis, o sistema de cultivo necessário para o desenvolvimento viável desta tecnologia ainda está sendo desenvolvido. Para este propósito, nenhuma das opções de sistemas de cultivo descritos abaixo é praticada em larga escala (CHISTI, 2013).

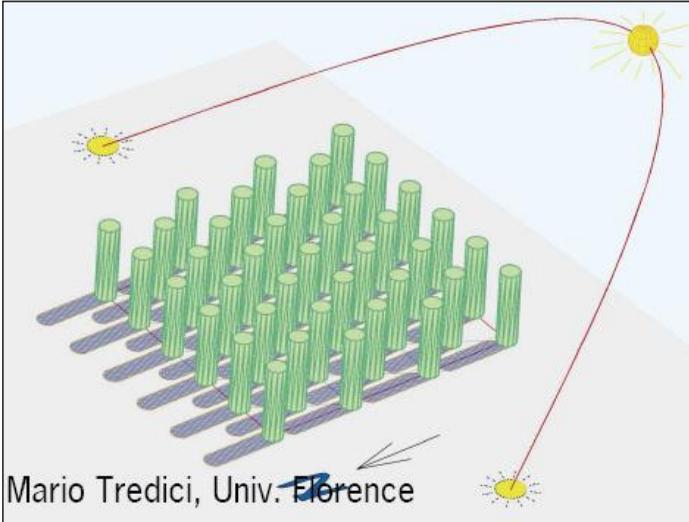
Cultivo em fotobiorreatores fechados

Existem diferentes configurações de fotobiorreatores fechados (Reator Vertical de Coluna de Bolhas; Reator Tubular Horizontal; Reator Plano etc.). Em geral, utiliza-se um material plástico transparente (geralmente tubos) que contêm as culturas e as expõem à luz. Quando comparados a sistemas de cultivo abertos (ver próximo Sub Item), os fotobiorreatores fechados apresentam um custo maior de implantação e operação, e demandam altas quantidades de energia para a homogeneização e resfriamento das culturas. Contudo, alguns microorganismos que não se adaptam às condições de cultivo em sistemas abertos, devido a problemas com competição por outros organismos, variação de temperatura, entre outros, podem ser produzidos em sistemas fechados já que estão sob condições controladas. Normalmente, nestes sistemas se alcançam altas concentrações celulares e produtividades (5 g L^{-1}) otimizando as condições de cultivo (FAO, 2010).

O reator de coluna de bolhas, um fotobiorreator vertical (Figura 3), pode apresentar problemas quando utilizado em larga escala, uma

vez que vários sistemas próximos um ao outro podem auto-sombrear as culturas.

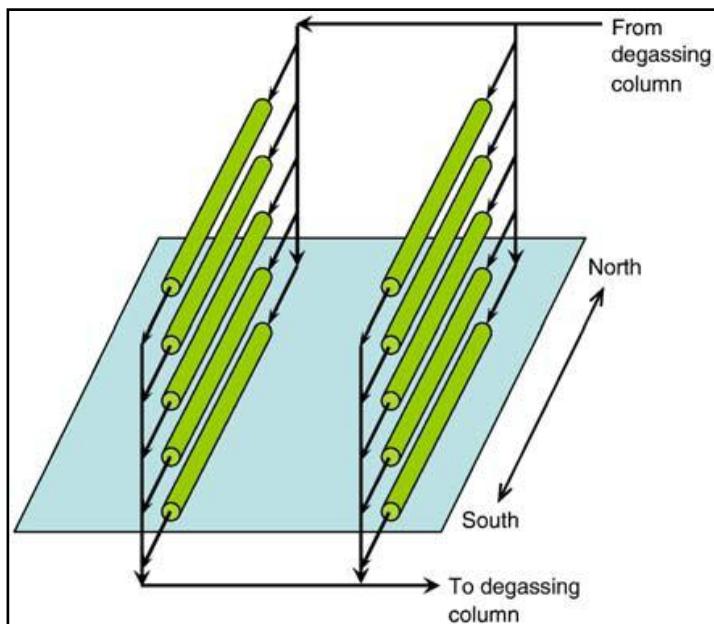
Figura 3 - Representação de um Fotobiorreator Vertical



Fonte: (WIJFFELS, 2007 apud FAO, 2009).

Os fotobiorreatores tubulares horizontais (Figura 4) diminuem o problema com autosombreamento. No entanto, em tubos muito longos, o acúmulo do oxigênio produzido pela fotossíntese pode prejudicar o crescimento das microalgas, devido ao aumento da fotorrespiração (FAO, 2009). Alguns fotobiorreatores planos estão sendo desenvolvidos para um maior aproveitamento da radiação solar através da área superficial, diminuindo a reflexão e refração ocorrida com os tubos, mas ainda existem problemas com a homogeneização das culturas (RODOLFI et al., 2009).

Figura 4 - Representação de um Fotobiorreator Horizontal



Fonte: (CHISTI, 2007).

Em geral, embora tenham um alto custo, os fotobiorreatores fechados proporcionam uma maior produtividade e controle da produção. Alguns fotobiorreatores, principalmente os tubulares horizontais, existem em escala comercial para produção de compostos de alto valor de mercado (ver Item 2.2.5). Os maiores sistemas de cultivo cobrem uma área de poucos hectares (FAO, 2009).

Cultivo em tanques abertos

O cultivo de microalgas em sistemas abertos apresenta diferentes configurações. A mais simples consiste em viveiros calmos e rasos com tamanhos variando entre alguns metros quadrados a 250 ha (Figura 5). Nesses casos, a fonte de carbono é o CO₂ atmosférico e sua dissolução do ar para água limita o crescimento das microalgas, tornando-o um sistema de baixa produtividade. A baixa difusão de nutrientes, e a flotação e sedimentação dos microrganismos, dificultam a disponibilização de luz (FAO, 2009).

Figura 5 - Tanques abertos para a produção extensiva da microalga *Dunaliella salina* no noroeste da Austrália



Fonte: (ANDERSEN, 2005).

Alguns tanques, com profundidade de 50 cm ou mais e, geralmente, menores que 10 m³, homogêneos por aeração, são utilizados para a produção em pequena escala de microalgas para serem oferecidas como alimento vivo em atividades aquícolas (Figura 6). Estes sistemas, embora pouco eficientes, são fáceis de operar, possuem baixo custo e, devido as microalgas serem utilizadas como alimento vivo, a separação da biomassa (ver item 2.2.3) não é um problema (ANDERSEN, 2005).

Um sistema de cultivo circular, com um agitador rotativo central e com 30 cm de profundidade, é utilizado no Japão e em Taiwan, para a produção da microalga *Chlorella* (Figura 7). Estes tanques circulares são os mais antigos sistemas de larga escala e são similares a alguns sistemas utilizados para tratamento de efluentes. Estes sistemas são limitados a um tamanho de no máximo 10.000m², devido à limitação do comprimento do agitador rotativo central (ANDERSEN, 2005).

Figura 6 - Tanques para produção de microalgas no Laboratório de Camarões Marinhos do Departamento de Aquicultura da UFSC.



Fonte: Prof. Dr. Roberto Bianchini Derner.

Entre os sistemas abertos de cultivo de microalgas, os chamados tanques tipo carrossel, ou também chamados “tanques raceway”, apresentam as melhores produtividades e mantém o custo de implantação baixo. Alguns autores relatam que para obtenção de biocombustíveis da biomassa microalgal (ver Item 2.2.4), o tanque raceway é o único sistema de produção viável em larga escala (CARVALHO et al., 2006; CHISTI, 2007).

Figura 7 - Tanque aberto utilizado para produção da microalga *Chlorella* em Taiwan



Fonte: (ANDERSEN, 2005).

Os tanques tipo carrossel são construídos em formato elipsal, pelo qual a água é mantida em movimento através de um rotor de eixo horizontal. O tanque geralmente possui uma profundidade de 20 a 30 cm e é construído de concreto ou terra compactada, e coberto com geomembrana de cor clara (Figura 8). É projetado para a maior incidência de luz e baixo custo de construção (CHISTI, 2007)

Figura 8 - Tanques raceway utilizados para a produção da microalga *Spirulina* na Califórnia.



Fonte: (FAO, 2009).

Em tanques abertos, como as microalgas estão em contato direto com o ambiente, estas ficam bastante susceptíveis a variações de temperatura, de volume do cultivo, e de contaminação por predadores e competidores. É importante cultivar uma microalga que permaneça dominante durante todo o ano. Por isso, para manter algumas monoculturas em sistemas de produção abertos utiliza-se condições de cultivo extremas, como alta salinidade, alto pH, ou alta concentração de nitrogênio (PULZ, 2001; RODOLFI et al., 2009).

O cultivo em larga escala em tanques abertos é eficiente para um número limitado de espécies de microalgas. O sucesso deste sistema depende, entre outros fatores, de um bom conhecimento fisiológico e ecológico da espécie de microalga cultivada (ANDERSEN, 2005).

2.2.3 Métodos de separação da biomassa

Segundo o relatório da FAO (2009) geralmente as proporções (de biomassa) de microalgas em cultivo, apresentam-se relativamente baixas, sendo em torno de 0,02 a 0,05 % de biomassa seca em tanques tipo raceway e entre 0,1 a 0,5 % de biomassa seca em fotobiorreatores tubulares. Este aspecto, em conjunto com o tamanho das microalgas, dificulta a separação da biomassa, o que segundo Molina-Grima et al. (2003) pode representar entre 20 a 30% do custo total de produção.

Há diferentes maneiras de realizar a separação da biomassa. Os processos mais comuns são: sedimentação, centrifugação e filtração. A sedimentação, considerada a opção mais simples, pode reter 85% da biomassa, sendo o percentual de biomassa seca por volta de 3%, dependendo da espécie utilizada. No entanto, este processo requer um significativo espaço adicional. O método mais eficiente para separação da biomassa é a centrifugação, mas representa uma significativa elevação dos custos de produção, sendo assim, é bastante utilizado quando o produto extraído possui alto valor. Já a filtração pode ser realizada, principalmente, para separação de biomassa de microalgas filamentosas, mas é um processo lento e em sistemas de larga escala demanda uma grande infraestrutura (FAO, 2009).

2.2.4 Biocombustíveis a partir de microalgas

Recentemente, a produção de biocombustíveis a partir de biomassa de microalgas tem recebido grande atenção como uma nova fonte de energia renovável. Este interesse pode ser explicado pela maior preocupação global a respeito da depleção de reservas de combustíveis fósseis e das mudanças climáticas, além da busca por maior disponibilidade e segurança energética. Apesar da existência de diversas iniciativas de geração de energia a partir de algas, sendo algumas em estágio piloto, não existe aplicação do processo em escala comercial (CHISTI, 2013).

Quando comparado com a produção de biocombustíveis através de cultivares convencionais (soja, cana-de-açúcar, girassol etc.), as microalgas apresentam algumas vantagens. O cultivo de microalgas não necessita de terras agricultáveis, e requer uma quantidade inferior de água doce. As microalgas apresentam um grande rendimento de biomassa por unidade de área, a qual pode apresentar elevados conteúdos de óleo ou amido. Podem ser produzidas durante todo o ano e seu conteúdo bioquímico, bem como as características químicas do óleo presente na biomassa, podem ser manipulados através das condições de cultivo. Os nutrientes necessários para a produção podem ser supridos através de efluentes líquidos tratados e CO₂ contido em gás de combustão (PEDRONI, 2001). Segundo Brennan e Owende (2010) para cultivar microalgas não se faz necessário a utilização de herbicidas e pesticidas. Conforme relatório da FAO (2010) estima-se que é possível produzir entre 40 a 80 toneladas de matéria seca de microalgas por hectare por ano dependendo da tecnologia utilizada e o local de produção. Esta produtividade é substancialmente superior aos níveis atingidos pela maior parte das oleaginosas cultivadas.

Diferentes biocombustíveis podem ser produzidos a partir de biomassa de microalgas. O que requer um processo mais simples é o Biogás uma vez que não é tão sensível ao conteúdo da biomassa, não necessitando a extração de determinados compostos. É possível produzir Biodiesel pela extração da fração lipídica, enquanto o conteúdo de carboidratos pode ser convertido em Bioetanol. Algumas combinações destes três combustíveis podem ser utilizadas (SHEEHAN et al., 1998).

Um dos principais grupos de compostos presentes nas microalgas são os lipídios, os quais podem atingir entre 2 a 80 % de toda biomassa seca, dependendo das cepas e das condições de cultivo. Tal componente pode ser extraído da biomassa e convertido a biodiesel (FAO, 2009).

Segundo Sheehan et al. (1998) para produzir eficientemente biodiesel a partir de microalgas, faz-se necessário que a espécie cultivada apresente altas taxas de crescimento e/ou um alto rendimento de lipídios.

Uma maior acumulação de lipídios em microalgas geralmente está associada a períodos de estresse e depleção de nutrientes. Isto implica em menores conteúdos de lipídios sob condições ótimas de crescimento (FAO, 2009).

Algumas espécies de microalgas podem conter uma quantidade em torno de 50% de amido em sua composição celular, que pode ser hidrolisado e posteriormente fermentado e transformado em Bioetanol,

de modo similar ao que é realizado com a cana-de-açúcar e o milho. Também, as microalgas possuem celulose e hemicelulose, que podem ser hidrolisadas à açúcar, com a vantagem de não possuírem lignina, sendo assim mais facilmente degradáveis que a biomassa de madeira, por exemplo (FAO, 2010).

Uma via bioquímica para processar toda biomassa sem necessidade de secá-la é a digestão anaeróbia, produzindo biogás. Este pode ser utilizado para gerar calor, energia ou substituir o uso de gás natural. Em alguns casos, pode ser necessário um pré-tratamento para quebrar a parede celular, facilitando a biodegradação. Este processo pode ser utilizado como um segundo passo após a extração de compostos, que serão utilizados para outros fins (FAO, 2009).

Como resultado da digestão anaeróbia, produz-se 60 a 70% metano e, a outra parte é principalmente dióxido de carbono, pode retornar ao cultivo de microalgas (FAO, 2010).

Algumas microalgas são capazes de serem manipuladas para produzirem gás hidrogênio a partir da energia solar. No entanto, para esta tecnologia se tornar viável, é necessário ter mais conhecimento sobre os organismos que realizam esta rota metabólica e as condições necessárias para otimizar a produção de hidrogênio. Como é despendida energia pelas células para formar gás hidrogênio, neste processo se atinge uma baixa produtividade, o que prejudica a utilização da biomassa para outros fins (FAO, 2009).

Segundo relatório da FAO (2009) é possível extrair hidrocarbonetos de culturas de uma espécie de microalga, conhecida através do nome científico *Botryococcus braunii*. Esta microalga de água doce pode produzir cerca de 60% de hidrocarbonetos da biomassa seca, os quais podem ser transformados em gasolina, querosene e diesel, do mesmo modo que o petróleo.

É possível queimar a biomassa de microalgas seca para gerar calor e eletricidade. Este processo torna-se interessante no caso de necessitar secar a biomassa como um primeiro passo para a extração de determinado composto. Ainda, através de processos de alta pressão e altas temperaturas, como gaseificação e pirólise, pode-se produzir gás e óleo combustível (FAO 2010).

2.2.5 Outros produtos originados das microalgas

Uma vez que as microalgas pertencem a um grupo com mais de 300.000 espécies, com as mais variadas composições, diversos produtos podem ser extraídos e produzidos através destes microrganismos (ANDERSEN, 2005). Segundo o relatório da FAO (2010) a extração de produtos de alto valor econômico, em conjunto com a produção de biocombustíveis, pode ser um passo interessante para tornar o processo viável economicamente. Entre os produtos de alto valor comercial encontram-se a própria biomassa, como alimento ou suplemento alimentar, bem como extração de compostos da biomassa para serem utilizados pelas indústrias de cosméticos, alimentícia, farmacêutica, agrícola e de químicos.

É importante que se pesquise novos produtos extraídos de microalgas, pois, a maior parte da produção das indústrias alimentícias, agrícolas e de químicos, necessita de processos mais sustentáveis (MATA et al., 2010).

O uso das microalgas para consumo humano se evidencia na utilização de diversos ingredientes derivados de algas e utilizados em alimentos processados. Como exemplos, estão gorduras, ácidos graxos, pigmentos, antioxidantes e compostos bioativos (MATA et al., 2010). Atualmente, são comercializadas microalgas em pó, barras, cápsulas ou em meio líquido, como fontes de proteínas, tendo em vista que algumas espécies podem conter até 60% de proteínas em sua biomassa, além de conter vitaminas, minerais e substâncias bioativas (FAO, 2010).

Uma grande variedade de microalgas e seus produtos têm apresentado aplicações nutricionais e medicinais, como nutracêuticos, vacinas etc. (PULZ; GROSS, 2004). Alguns pigmentos são utilizados como antioxidantes, corantes de alimentos, corantes naturais da carne de alguns animais e como precursores de vitaminas.

As microalgas são as reais fontes de ácidos graxos insaturados, como os da série ômega-3, nutriente de extrema importância e que deve ser suprido por fontes externas uma vez que não é sintetizado pelo organismo (FAO, 2010). Estes micro-organismos, quando utilizados como alimento animal, podem substituir as convencionais fontes de proteína, como por exemplo, a farinha de peixe, farelo de arroz, etc., utilizadas na alimentação de suínos, aves, peixes, e pela indústria de animais domésticos (BECKER, 2007).

A produção de moluscos, camarões e peixes em aquicultura, está essencialmente relacionada com culturas de microalgas, já que estas

servem de alimento direto ou indireto às fases iniciais de produção desses organismos (POLI et al., 2004). Geralmente, são oferecidas vivas em meio líquido ou em um concentrado pastoso (SPOLAORE et al., 2006).

Algumas empresas de cosméticos produzem suas próprias microalgas com o intuito de extrair substâncias utilizadas em cremes e loções para a pele. Estas substâncias podem ser encontradas em cremes pós-sol e bloqueadores solar, produtos com um mercado em grande expansão (FAO, 2010).

Após alguns processos, como a extração de carboidrato ou lipídios, a maior parte dos nutrientes continua presente na biomassa residual e, esta biomassa pode ser utilizada como biofertilizante em atividades agrárias ou no próprio sistema de cultivo de microalgas. Quando utilizada a biomassa úmida em biodigestores para a geração de biogás, o resíduo líquido e sólido também tem potencial para ser utilizado como biofertilizante. Quando comparado à produção de fertilizantes sintéticos, os biofertilizantes requerem menos energia, diminuindo as emissões de gases do efeito estufa durante o processo produtivo (FAO 2010).

Pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de produzir papel a partir de celulose de microalgas (VERVERIS; GEORGHIOU, 2007). Apesar de interessante do ponto de vista ambiental e econômico, ainda trata-se de uma potencialidade (FAO, 2010).

2.2.5 Cultivo integrado com sistemas de tratamento de efluentes

Utilizar técnicas de produção que possibilitem um ótimo uso dos múltiplos benefícios (co-processos e co-produtos) que as microalgas podem oferecer é essencial para tornar a atividade de cultivo destes microrganismos mais sustentável. Como os biocombustíveis são produtos de baixo valor, quando comparados a produtos como nutracêuticos e fármacos, para tornar os biocombustíveis de algas, economicamente viáveis, a co-produção torna-se uma forma de equacionar os custos de produção, com o aumento da rentabilidade (DERNER et al., 2006).

Outra forma de equacionar os custos de produção pode ser atingido com co-processos, como tratamento de efluentes e redução de emissões atmosféricas, os quais podem trazer uma renda adicional ao processo.

Alguns sistemas de tratamento de efluentes baseiam-se, entre outros fatores, em reações catalisadas pelas microalgas. De maneira bastante simplificada, pode-se explicar a interação alga-bactéria que ocorre nestes sistemas. As bactérias aeróbias consomem a matéria orgânica encontrada nos efluentes e liberam subprodutos, como o CO_2 e nutrientes solúveis, como o nitrogênio e o fósforo. Estes subprodutos são consumidos pelas microalgas fotoautotróficas, que por sua vez liberam oxigênio como subproduto. O oxigênio favorece a remoção da demanda bioquímica de oxigênio. A principal vantagem destes tipos de sistemas é a utilização da energia solar, através da fotossíntese microalgal, diminuindo a necessidade de compressores elétricos para fornecer oxigênio às bactérias (WOERTZ et al., 2009).

Segundo Lourenço (2006) apesar de existir grande conhecimento dos processos e estágios de tratamento de efluentes, o tratamento terciário, caracterizado principalmente pela remoção de nutrientes, não é realizado na maioria das estações por envolver custos altos. Como exemplos de sistemas terciários de tratamento de efluentes com utilização de microalgas encontram-se as lagoas de alta taxa microalgal (VON SPERLING, 2005). Estes tanques foram desenvolvidos na década de 50, na Califórnia, pelo pesquisador William Oswald (SHEEHAN et al., 1998).

As lagoas de alta taxa são projetadas para maximizar a produção de microalgas, em um ambiente totalmente aeróbio. Nestes tanques, por promover uma atividade fotossintética elevada, predomina um ambiente com altas concentrações de oxigênio dissolvido e pH elevado. Tais fatores contribuem para o aumento da taxa de mortalidade de microrganismos patogênicos e para a remoção de nutrientes. Nestes sistemas além da assimilação de nutrientes pelas microalgas, a remoção da amônia também se dá por meio da volatilização da amônia livre (NH_3) já que em pH elevado aumenta a sua concentração, enquanto que o fósforo, também em função do pH elevado, é removido através da precipitação de fosfatos na forma de hidroxiapatita ou estruvita (VON SPERLING, 2005).

Olguín et al., (2003) descrevem um sistema onde 84 a 96% de nitrogênio, e 72 a 87% de fósforo foram removidos de um efluente de reator anaeróbio utilizado para tratar dejetos suínos, através do uso de lagoas de alta taxa, diminuindo a eutrofização do ambiente.

Milhares de lagoas de alta taxa são utilizadas ao redor do mundo como parte do tratamento de esgotos municipais e agrícolas (Figura 9). A biomassa microalgal, nestas lagoas, nem sempre é retirada, acarretando em restrições para o descarte do efluente, ou quando é

retirada, não é utilizada benéficamente. Em efluentes pobres em dióxido de carbono, conforme a relação de Redfield (ver Item 2.2.2.1), a introdução de CO_2 proveniente do processo de combustão, entre outras fontes, é possível que aumente a concentração de microalgas, uma vez que aumenta a disponibilidade de carbono para a fotossíntese, com possibilidade de tornar o sistema mais eficiente (VAN HARMELEN; OONK, 2006; BRENNAN; OWENDE, 2010; PARK et al., 2011).

Figura 9 - Sistema de lagoas para tratamento de efluentes na Califórnia. Entre as diferentes variedades de lagoas há uma Lagoa de Alta Taxa com área de 6 há..



Fonte: (VAN HARMELEN; OONK, 2006).

WOERTZ et al. (2009), em escala laboratorial, avaliaram a remoção de nitrogênio e fósforo de efluentes doméstico em lagoas de alta taxa microalgal suplementadas com efluente gasoso rico em CO_2 , e relatam uma remoção maior que 98% de nitrogênio e maior que 96% de fósforo. Segundo Park et al. (2011) a remoção de amônia por volatilização e a remoção de fósforo por precipitação pode diminuir com a introdução de CO_2 em lagoas de alta taxa, devido a diminuição do pH causada pela maior concentração de dióxido de carbono dissolvido. Entretanto, segundo os mesmos autores, esta redução pode ser compensada pelo aumento da produtividade algal e a maior assimilação de nutrientes na biomassa. Segundo esta hipótese, a incorporação da

amônia na biomassa ao invés da volatilização para a atmosfera, pode ser ambientalmente mais sustentável.

2.2.5.1 Aproveitamento de efluentes como meio de cultura

No tratamento do efluente líquido objetiva-se diminuir a concentração de nutrientes, patógenos, e outros compostos tóxicos, proporcionando o surgimento natural de diversos microrganismos predominantes (entre eles microalgas). Entretanto, quando se cultiva, comercialmente uma determinada espécie de microalga objetiva-se otimizar a produção deste microrganismo, removendo-o no momento em que atingir a característica desejada (alta produtividade, alta concentração de lipídios, etc.), independente da concentração dos nutrientes disponíveis. Portanto, ao aproveitar o despejo de estações de tratamento de efluentes, o cultivo de microalgas não objetiva tratar os efluentes, mas sim obter um ótimo crescimento e/ou composição bioquímica destes microrganismos.

Como descrito anteriormente, além de dióxido de carbono e luz, as microalgas requerem nutrientes para crescerem e, nitrogênio e fósforo são os mais importantes. Estes nutrientes podem ser supridos com fertilizantes químicos, mas, apesar de ser bastante simples a sua utilização, apresentam um elevado custo, alta demanda de energia em seu processo de fabricação e, no caso de fósforo extraído de minas, prevê-se um esgotamento futuro (CHISTI, 2008).

Segundo a Resolução nº 430 de 13 de maio de 2011 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), a qual dispõe sobre as condições e padrões de lançamentos de efluentes, é permitido uma concentração de até 20 mg L⁻¹ de nitrogênio amoniacal total em efluentes. No entanto, de acordo com a mencionada resolução, este valor não é exigível em efluentes sanitários, não havendo limites neste sentido. Já em relação ao fósforo total, de acordo com a Lei Estadual 14675/2009, do estado de Santa Catarina, é necessário observar o limite de 4 mg L⁻¹ em despejos em trechos de lagunas, lagoas e estuários, ou uma eficiência mínima de 75% de remoção pela estação de tratamento desde que não altere as características dos corpos de água previstas em lei. Além disso, estes resultados nem sempre são alcançados nas estações de tratamento de efluentes comumente utilizadas (Quadro 6) demonstrando um potencial para aproveitamento em cultivos de microalgas.

A possível minimização dos usos de água e fertilizantes químicos, na produção de biomassa microalgal, é o principal argumento para o aproveitamento dos despejos finais de sistemas de tratamento de efluentes no cultivo de microalgas com o propósito de produção de biocombustíveis. Esta solução é considerada a mais plausível para aplicações comerciais em um curto prazo (BRENNAN; OWENDE, 2010; PARK et al., 2011).

Quadro 6 - Concentrações efluentes reportadas na literatura em estações de tratamento de despejos com duas diferentes composições.

Parâmetro	Lodos Ativados	UASB + Pós Tratamento	Referência
Nitrogênio Total (mg L⁻¹)	> 20	15 a > 30	VON SPERLING, 2005
	9 a 40	29 a 85	FORNARI-FILHO, 2009
Fósforo Total (mg L⁻¹)	>4	1 a >4	VON SPERLING, 2005
	1 a 19	13 a 30	FORNARI-FILHO, 2009

O aproveitamento de despejos por cultivos de microalgas pode encontrar dificuldades devido a possíveis características dos efluentes finais, tais como: serem muito diluídos, necessitando do acréscimo de fertilizantes; estarem poluídos com patógenos; apresentarem compostos não facilmente biodegradáveis; conterem metais pesados e outros micropoluentes medicinais; e introduzirem uma alta concentração de bactérias e outros organismos não desejáveis no cultivo. Alguns contaminantes podem diminuir as taxas de crescimento microalgais e, também, inviabilizar a extração de produtos de alto valor. Quando utilizados efluentes líquidos oriundos de ETE como fontes de nutrientes, os sistemas de cultivo de microalgas e as espécies a serem produzidas são significativamente limitadas (FAO, 2009; FAO, 2010).

Outra preocupação quanto ao uso de efluentes tratados como fonte de nutrientes para cultivos de microalgas é que para otimizar a

produção de determinados compostos, geralmente, manipula-se a disponibilidade de nutrientes. No entanto, o controle da concentração de nutrientes em tratamento de efluentes é mais difícil quando comparado ao uso de fertilizantes artificiais.

Mesmo que seja difícil manipular os organismos e as espécies químicas que chegam ao sistema de cultivo de microalgas através dos efluentes líquidos tratados, comprometendo a estabilidade das culturas, segundo Andersen (2005) algumas ferramentas de manejo podem mitigar este efeito. Um exemplo é a eliminação de rotíferos¹ do gênero *Brachionus*, microrganismos predadores de microalgas, encontrados tanto em águas doces quanto marinhas, através da diminuição do pH do meio para 3,0 durante duas horas, podendo em seguida retomar ao pH inicial (geralmente próximo a neutralidade) sem causar danos as microalgas.

Segundo Sheehan et al. (1998) uma das grandes vantagens das tecnologias baseadas em microalgas, em um mundo com recursos cada vez mais limitados, é a oportunidade de utilização de terras e água inapropriadas para outros usos. Complementando, Edwards (2008) comenta que o maior problema relacionado à fome no mundo é a distribuição de alimentos e não a produção. Portanto, sendo desenvolvido o cultivo de microalgas aproveitando efluentes líquidos para gerar combustíveis e alimentos, muitas comunidades ao redor do mundo poderiam ser beneficiadas, mesmo em locais com difícil acesso e sem terras agricultáveis (FAO, 2010).

2.3 Necessidades de pesquisa e desenvolvimento

Apesar do alto potencial da utilização de microalgas para fixação de carbono e geração de biocombustíveis, tanto em produtividade, quanto em sustentabilidade, ainda não existe produção em escala comercial (FAO, 2009). Há um grande desafio em conhecer o real balanço de energia do sistema e estabelecer a viabilidade econômica, sendo necessários mais investimentos em pesquisa e desenvolvimento (P&D) (FAO, 2010).

¹ Rotíferos são animais aquáticos microscópicos que constituem o filo rotífera.

Pesquisas devem ser conduzidas no intuito de reduzir custos de produção, através do aumento da produtividade, aumento da substância desejada na composição celular, reciclagem de nutrientes e água, utilização de co-produtos, aproveitamento de efluentes tratados como meio de cultura e utilização de gases residuais ricos em CO₂ como fonte adicional de carbono (FAO, 2010). Segundo Kumar et al. (2010) são necessárias pesquisas para determinar a exata quantidade de CO₂ introduzida nos cultivos para a real demanda metabólica das microalgas.

A seleção de espécies de microalgas apropriadas representa um efeito significativo sobre a eficácia e os custos envolvidos, sendo fundamental para o sucesso dos processos de mitigação das emissões de CO₂ através do cultivo destes microrganismos. Entre os atributos desejáveis em uma espécie ideal encontram-se: alta taxa de crescimento e produtividade; possibilidade de geração de co-processos e co-produtos geradores de valor; possibilidade de ser cultivada em efluentes líquidos tratados como meio de cultura; ser resistente e dominante em sistemas de cultivo abertos; tempo de cultivo curto; limitada necessidade de nutrientes; tolerância a variações ambientais em parâmetros como pH e temperatura; e alta fixação de carbono (BRENNAN; OWENDE, 2010). Segundo estes autores, até o momento não se conhece uma espécie de microalga capaz de atender todos estes atributos.

Segundo Tredici (2010) atualmente não existe uma cepa de microalga capaz de ser produzida em larga escala comparável em rendimento com a cana-de-açúcar. Sheehan et al., (1998) sugerem que se façam pesquisas com novas espécies isoladas do local onde se deseja cultivar, pois, estas podem apresentar bons rendimentos, além de não apresentarem uma ameaça ambiental em relação a introdução de novas espécies. Geralmente, algas adaptadas em laboratório não são resistentes às condições de cultivo encontradas no campo. Sheehan et al., (1998) também relatam que focar em pesquisas de pequena-escala é claramente mais eficiente em termos econômicos que demonstrações em larga-escala.

Para manter cultivos monoalgais é necessário uma espécie competitiva, característica que deve ser experimentada em laboratório manipulando parâmetros como CO₂, meio de cultura, pH, temperatura etc. (SHEHHAN et al., 1998).

3 MATERIAIS E MÉTODO

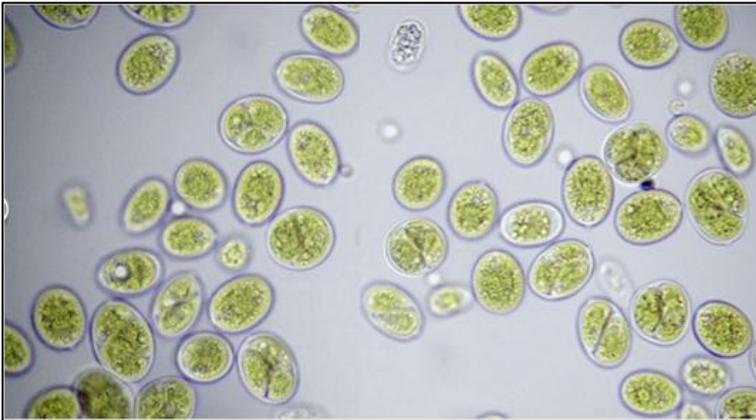
3.1 Material Biológico

Foram utilizadas duas diferentes espécies de microalgas do gênero *Chlamydomonas* (Figura 10). Uma espécie (denominada sp.1) foi proveniente de uma lagoa utilizada para experimentos de tratamento de lixiviado de aterro sanitário, situada no setor experimental do Laboratório de Efluentes Líquidos e Gasoso (LABEFLU) e Laboratório de Resíduo Sólidos (LARESO) do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (ENS) da Universidade Federal de Santa Catarina, na cidade de Florianópolis (SC) (Figura 11). A outra espécie, uma microalga ácido-tolerante (denominada sp.2), foi proveniente de um lago ácido, oriundo de drenagem de mina de carvão, situado no sul de Santa Catarina (Figura 12). Estas diferentes espécies de *Chlamydomonas* sp. foram estudadas para avaliar o potencial de serem cultivadas com o propósito de fixar dióxido de carbono e produzirem matéria prima para biocombustíveis. Apesar de serem microalgas de um mesmo gênero (Quadro 7), o fato de serem provenientes de diferentes ambientes isto pode indicar que estejam adaptadas a crescer em diferentes condições, como por exemplo em diferentes pH. Neste sentido, a microalga *Chlamydomonas* sp. 1 encontra-se naturalmente em um ambiente com pH em torno de 9,0, e a sp.2 em um ambiente com variação de pH entre 1,85-3,55 (Tabela 1).

Quadro 7 - Classificação taxonômica da microalga *Chlamydomonas* sp.

REINO	Plantae
DIVISÃO	Chlorophyta
CLASSE	Chlorophyceae
ORDEM	Chlamydomonadales
FAMÍLIA	Chlamydomonadaceae
GÊNERO	<i>Chlamydomonas</i>

Figura 10 - Imagem em microscópio da microalga *Chlamydomonas* sp.1 em aumento de 400x.



O propósito de ter estudado a espécie 1 foi devido ao fato desta ser predominante em um ambiente aberto, instável, exposto a diferentes microrganismos, com alta concentração de matéria orgânica e outros compostos (Tabela 2) (FERNANDES, 2009). Já a espécie 2, por ser do mesmo gênero, mas proveniente de um ambiente ácido, acredita-se que possa obter uma boa produtividade em cultivos com introdução de altas concentrações de CO_2 em consequência da provável diminuição do pH. Isto pode ser vantajoso em escala comercial por diminuir gastos com o monitoramento e controle do pH e por inibir o crescimento de organismos contaminantes.

Figura 11 - Sistema experimental de tratamento e polimento final de lixiviado pertencente ao Laboratório de Efluentes Líquidos e Gasosos (LABEFLU – ENS/UFSC). A espécie 1 foi isolada da lagoa demarcada em vermelho.



Fonte: (FERNANDES, 2009).

Tabela 1 - Características físico-químicas do lago onde a espécie 2 foi isolada.

Parâmetros	
pH	1,85 - 3,55
Turbidez (UNT)	28 - 70
Oxigênio Dissolvido (mg L^{-1})	0,0 - 6,5
Salinidade	0,80 - 0,31

Valores expressos como mínimos e máximos.

A espécie 2 foi fornecida pelo Laboratório de Ficologia do Departamento de Botânica do Centro de Ciências Biológicas da UFSC, supervisionado pelo Dr. Leonardo Rörig. As microalgas foram transferidas para o Laboratório de Cultivo de Algas (LCA) do Departamento de Aquicultura, UFSC, onde foram mantidas em Câmara de Germinação até o início dos experimentos.

Figura 12 - (A e B) Lago de drenagem ácida de mina de carvão, de onde a espécie 2 foi isolada pela equipe do Laboratório de Ficologia BOT/UFSC.



Fonte: Prof. Dr. Leonardo Rörig.

Tabela 2 - Valores médios obtidos no afluente da lagoa onde a espécie 1 foi isolada. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=20).

Parâmetros	Concentração mg L ⁻¹
DQO total	2529 \pm 603
DQO filtrada	2136 \pm 589
DBO	820 \pm 300
N-NH ₄ ⁺	920 \pm 94

Fonte: Adaptado de Fernandes (2009).

O gênero *Chlamydomonas* sp. compreende ao redor de 500 espécies que ocorrem no fitoplâncton das águas continentais de quase todo o mundo. As células microalgais deste gênero apresentam, em vista frontal, grande diversidade de formas, das quais a elipsoide (espécies 1 e 2) e a ovoide são as mais comuns (BICUDO; MENEZES, 2006). Possuem coloração amarelo esverdeado e tamanho aproximado de 12 μ m e 7,5 μ m (espécies 1 e 2 respectivamente). Este gênero apresenta células individuais (não formando cadeias) (FERNANDES, 2009). A identificação das microalgas utilizadas, a nível de espécie, ainda não foi possível.

3.1.1. Isolamento de *Chlamydomonas* sp.

Para realizar o isolamento das microalgas *Chlamydomonas* sp. 1, foram coletadas amostras da lagoa apresentada na Figura 11. Estudos prévios indicaram que há a predominância desta espécie neste local, fato que facilitou o isolamento (FERNANDES, 2009).

Após a coleta de água, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Ficologia do Departamento de Botânica, CCB, UFSC. Ao microscópio, as amostras foram examinadas para uma avaliação preliminar das microalgas presentes. Em seguida, as amostras foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio de cultura apropriado para as espécies (Quadro 8) e incubadas a 20°C sob uma iluminação de 35 $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 horas luz, 12 horas escuro conforme indicado por COSTA et al. (2006).

A cada 24 horas foi examinado o crescimento algal nos tubos, utilizando um microscópio óptico. A espécie foi isolada através da técnica de diluição seriada e plaqueamento em meio sólido (ágar 1,5%). Diversas diluições em meio de cultura foram realizadas a fim de alcançar uma concentração de 1 célula por 50 μl . Subculturas foram feitas inoculando 50 μl em placas de Petri contendo o meio de cultura solidificado com 1,5% de Agar. Estes procedimentos foram feitos com cada uma das amostras originais.

As placas de Petri foram incubadas nas mesmas condições dos tubos por 10 dias. Após este prazo, colônias de *Chlamydomonas* das placas de Petri foram inoculadas em tubos de ensaios e em béqueres de vidros de 250ml, contendo o meio de cultura Chu#10 (ANDERSEN, 2005).

Após o isolamento, a microalga *Chlamydomonas* foi conservada em culturas monoespecíficas em pequenos volumes. A espécie foi cultivada em placas de Petri em meio sólido (ágar 1,5%) e em tubos de ensaio contendo meio líquido e, mantidas em câmaras de germinação sob condições controladas de luz (24h luz, 35 $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$), temperatura (20 °C) e assepsia (Figura 13).

Figura 13 - Microalgas isoladas e mantidas em câmara de germinação.



Quadro 8 - Meio de cultura Chu #10 ajustado com solução de metais traço e de vitaminas, utilizado para *Chlamydomonas*, descrito por Andersen (2005). Cada composto foi dissolvido individualmente em 950mL de água destilada. Posteriormente, completou-se para 1 L e se autoclavou o meio.

Composto	Diluição (g.L ⁻¹ H ₂ O _d)	Quantidade e Utilizada	Concentração Final
Ca(NO ₃) ₂	20,0	1mL	1,22 x 10 ⁻⁴
K ₂ HPO ₄	2,5	1mL	1,44 x 10 ⁻⁵
MgSO ₄ .7H ₂ O	12,5	1mL	5,07 x 10 ⁻⁵
Na ₂ CO ₃	10,0	1mL	9,43 x 10 ⁻⁵
Na ₂ SiO ₃	12,5	1mL	1,02 x 10 ⁻⁴
FeCl ₃	0,4	1mL	2,47 x 10 ⁻⁶
Solução de Metais	(ver Quadro 9)	1mL	-
Traço			
Solução de Vitaminas	(ver Quadro 10)	1mL	-

Quadro 9 - Solução de metais traço a ser adicionada ao meio de cultura Chu#10. Cada composto foi dissolvido individualmente em 950mL de água destilada. Posteriormente, completou-se para 1 L.

Composto	1º Diluição (g.L ⁻¹ H ₂ Od)	Quantidade Utilizada	Concentração Final
H ₃ BO ₃	2,48	1mL	4,01 x 10 ⁻⁸
MnSO ₄ .H ₂ O	1,47	1mL	8,70 x 10 ⁻⁹
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,23	1mL	8,00 x 10 ⁻¹⁰
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,10	1mL	4,01 x 10 ⁻¹⁰
(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,07	1mL	5,66 x 10 ⁻¹¹
CO(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,14	1mL	4,81 x 10 ⁻¹⁰

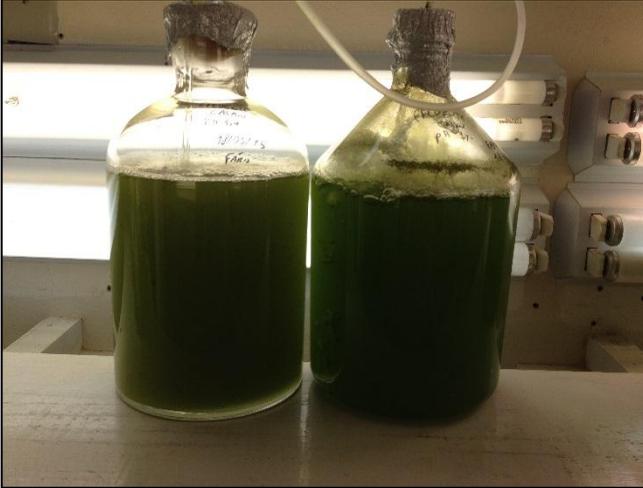
Quadro 10 - Solução de vitaminas a ser adicionada ao meio de cultura Chu#10. Em 950 mL de água destilada, dissolveu-se a Tiamina.HCl, posteriormente, adicionou-se 1 mL de cada composto e completou para 1 L. Esterilizou-se e manteve-se a solução resfriada.

Composto	1º Diluição (g.L ⁻¹ H ₂ Od)	Quantidade Utilizada	Concentração Final
Tiamina.HCl (Vitamina B ₁)	-	50mg	1,48 x 10 ⁻⁷
Biotina (Vitamina H)	2,5	1mL	1,02 x 10 ⁸
Cianocobalamina (Vitamina B ₁₂)	2,5	1mL	1,84 x 10 ⁻⁹

3.2 Aclimação Prévia

Para aclimação do inóculo, na semana precedente ao início dos experimentos, as microalgas foi cultivada no meio de cultura utilizado conforme cada tratamento e experimento (ver Item 3.3), sob a injeção de ar enriquecido com 1% CO₂ (v v⁻¹). As unidades experimentais foram inoculadas em fase exponencial da curva de crescimento (Figura 14).

Figura 14 - Produção de inóculo para início do Experimento E3.



3.3 Condições Experimentais

Foram realizados quatro experimentos (Figura 15). No primeiro (experimento E1), foi avaliada a influência do uso de efluente doméstico tratado, como meio de cultura, sobre os parâmetros de crescimento (curva de crescimento, densidade celular máxima, tempo de cultivo, taxa de crescimento específico, tempo de duplicação e velocidade de crescimento) e produtividade (g L^{-1}) no cultivo da microalga ácido-tolerante *Chlamydomonas* sp.2 isolada de lago de drenagem ácida de mina de carvão.

O segundo experimento (E2) avaliou os mesmos parâmetros sob as mesmas condições de cultivo do experimento E1, mas, desta vez, com a produção de *Chlamydomonas* sp.1, isolada da lagoa experimental de tratamento de lixiviado de aterro sanitário da UFSC.

No terceiro experimento (E3) foram avaliados os parâmetros de crescimento, a produtividade, a fixação de carbono, o perfil de ácidos graxos e teor de ésteres metílicos de ácidos graxos da microalga *Chlamydomonas* sp.1 (isolada da lagoa de tratamento de lixiviado de aterro sanitário da UFSC), cultivadas em efluente doméstico tratado,

como meio de cultura, sob a introdução de diferentes concentrações de CO_2 . Também foram verificadas as concentrações iniciais e finais de nutrientes (nitrogênio e fósforo) presentes nos cultivos.

O quarto experimento (E4), avaliou os mesmos parâmetros anteriores, sob as mesmas condições de cultivo do experimento E3, mas, desta vez, com a produção da microalga ácido-tolerante *Chlamydomonas* sp.2 (isolada de lago de drenagem ácida de mina de carvão).

Figura 15 - Resumo do planejamento experimental realizado.

FLUXOGRAMA – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL



3.3.1 Experimento 1: Efeito do uso de efluente doméstico tratado, como meio de cultura alternativo, sobre o crescimento e produtividade da microalga ácido-tolerante *Chlamydomonas* sp.2 isolada de lago de drenagem ácida de mina de carvão.

Este experimento foi realizado no Laboratório de Cultivo de Algas (LCA) do departamento de Aquicultura da UFSC com o cultivo da microalga ácido-tolerante *Chlamydomonas* sp.2. Frascos Erlenmeyers foram utilizados no experimento. Cada frasco possuía uma capacidade de 2.000 mL, sendo utilizado o volume de 1.000 mL para a cultura, o qual foi considerado como uma unidade experimental. O experimento foi realizado em sala com temperatura controlada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), sob aeração constante, com fluxo de $0,3 \text{ L min}^{-1}$ ($0,3 \text{ vvm}$ - volume de gás por volume de meio de cultura por minuto) de ar atmosférico enriquecido com CO_2 ($1\% \text{ v v}^{-1} \text{ CO}_2$), conforme padrão utilizado no LCA. A iluminação foi constante, com uma intensidade de irradiância de $150 \mu\text{mols m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, proporcionada por lâmpadas fluorescentes tipo Luz do Dia 80W.

O efluente, coletado no estágio final do processo de tratamento da Estação de Tratamento de Esgoto doméstico (ETE) da Lagoa da Conceição em Florianópolis/SC, foi utilizado como meio de cultura alternativo. Esta ETE é composta por reator UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket), seguido por sistema de lodos ativados e desinfecção final com hipoclorito de sódio. A estação opera com uma vazão média de 50 L s^{-1} e é projetada para atender uma população de 36.000 habitantes (Figura 16). Os parâmetros de qualidade de água do efluente tratado pela ETE, apresentados na Tabela 3, são referentes à média de duas avaliações: a primeira do mês que precedeu o início do experimento; e a segunda do mês em que o experimento foi executado. Estes dados foram fornecidos pela companhia que opera a estação. Entretanto, o efluente utilizado no experimento foi proveniente de uma coleta pontual.

Três tratamentos foram avaliados. No Tratamento 1 (T1), o controle, as microalgas foram cultivadas em meio de cultura TAP ($93 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NH}_4$; $81,7 \text{ mg L}^{-1} \text{ P-PO}_4$) (GORMAN; LEVINE, 1965), já estabelecido para o cultivo de *Chlamydomonas* spp., descrito no Quadro 11. No Tratamento 2 (T2) cultivou-se em um meio composto pela mistura de 50% de efluente e meio TAP. No Tratamento 3 (T3) as microalgas foram cultivadas diretamente no efluente (100% efluente). Em cada tratamento procedeu-se quatro repetições, distribuídas ao

acaso, totalizando 12 unidades experimentais. Os meios de cultura utilizados em cada tratamento foram clorados 24 horas antes do início do experimento, com o objetivo de desinfecção, e, imediatamente antes da adição do inóculo, o cloro foi neutralizado com tiosulfato de sódio.. O pH e a turbidez dos meios de cultivos foram monitorados diariamente. O experimento teve duração de dez dias, momento em que as culturas atingiram a Densidade Celular Máxima (DCM).

Tabela 3 - Valores médios obtidos no efluente da ETE utilizado como meio de cultura alternativo (Experimento E1).

Parâmetro	Efluente	Meio TAP
Temperatura (°C)	26,1 ± 0,3	nd.
DBO (mg L ⁻¹)	28,0 ± 4,2	nd.
DQO (mg L ⁻¹)	43,7 ± 6,5	nd.
Fósforo Total (mgP L ⁻¹)	6,10 ± 2,3	81,7
Sólidos Suspensos (mg L ⁻¹)	19,5 ± 7,8	nd.
Nitrogênio-NH ₄ (mg L ⁻¹)	34,2 ± 0,4	93,0
Nitrogênio-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	0,5 ± 0,1	nd.
Nitrogênio-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	2,3 ± 0,5	nd.
Nitrogênio Total (mg L ⁻¹)	36,0 ± 5,8	nd.
Alcalinidade Total (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	193,4 ± 11,7	nd.
pH	7,4 ± 0,1	nd.
Razão Molar N:P	14:1	-

onde nd. = valor não determinado.

Valores expressos como média ± desvio padrão. Os valores de nitrogênio amoniacal e fósforo encontrados no meio TAP foram determinados através das concentrações de reagentes P.A. utilizados no preparo do meio de cultura, segundo Gorman e Levine (1965).

Figura 16 - Estação de Tratamento de Esgotos da Lagoa da Conceição / Florianópolis. (A) Tratamento preliminar; (B) Vista geral da ETE com o reator UASB ao fundo; (C) Vista geral da ETE com o valo de oxidação ao fundo; (D) Vista geral da ETE com decantador ao fundo; (E) Sistema para desinfecção final com hipoclorito de sódio; (F) Efluente tratado pela ETE e utilizado como meio de cultura alternativo nos experimentos.



Quadro 11 - Meio de cultura TAP utilizado para o cultivo de *Chlamydomonas* spp. (GORMAN; LEVINE, 1965).

Solução Estoque	Vol.	Componente	Conc. na SL	Conc. final no meio
Base Tris	2,42 g	H ₂ NC(CH ₂ OH) ₃		2,00.10 ⁻² mol L ⁻¹
Sais-TAP	25mL	NH ₄ Cl	15 g L ⁻¹	7,00.10 ⁻³ mol L ⁻¹
		MgSO ₄ .7H ₂ O	4 g L ⁻¹	8,30.10 ⁻⁴ mol L ⁻¹
		CaCl ₂ .2H ₂ O	2 g L ⁻¹	4,50.10 ⁻⁴ mol L ⁻¹
Solução Fosfato	1 mL	K ₂ HPO ₄	28,8 g100mL ⁻¹	1.65.10 ⁻³ mol L ⁻¹
		KH ₂ PO ₄	14,4 g100mL ⁻¹	1.65.10 ⁻³ mol L ⁻¹
Solução de elementos traço	1 mL	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	5,00 g100mL ⁻¹	1,34.10 ⁻⁴ mol L ⁻¹
		ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,20 g100mL ⁻¹	1,36.10 ⁻⁴ mol L ⁻¹
		H ₃ BO ₃	1,14 g100mL ⁻¹	1,38.10 ⁻⁴ mol L ⁻¹
		MnCl ₂ .4H ₂ O	0,50 g100mL ⁻¹	4,00.10 ⁻⁵ mol L ⁻¹
		FeSO ₄ .7H ₂ O	0,50 g100mL ⁻¹	3,29.10 ⁻⁵ mol L ⁻¹
		CoCl ₂ .6H ₂ O	0,16 g100mL ⁻¹	1,23.10 ⁻⁵ mol L ⁻¹
		CuSO ₄ .5H ₂ O	0,16 g100mL ⁻¹	1,00.10 ⁻⁵ mol L ⁻¹
		(NH ₄) ₆ MoO ₃	0,11 g100mL ⁻¹	4,44.10 ⁻⁶ mol L ⁻¹
Ácido acético	1mL	CH ₃ COOH		

3.3.2 Experimento 2: Efeito do uso de efluente doméstico tratado, como meio de cultura alternativo, sobre o crescimento e produtividade da microalga *Chlamydomonas* sp.1 isolada de lixiviado de aterro sanitário.

O Experimento 2 teve duração de 10 dias (momento em que as culturas atingiram a DCM) e foi realizado nas mesmas condições utilizadas no Experimento E1, descrita no item 3.3.1. Contudo, a microalga utilizada nesse experimento foi a *Chlamydomonas* sp. 1 (Figura 17). Já os parâmetros de qualidade de água do efluente tratado pela ETE são apresentados na Tabela 4. Estes dados são referentes à média de duas avaliações: a primeira referente ao mês que precedeu o início do experimento e a segunda do mês em que o experimento foi executado. Da mesma maneira que o Experimento E1, estes dados foram fornecidos pela companhia que opera a estação.

Figura 17 - Unidades experimentais (experimento E2) dispostas em sala de cultivo.



Tabela 4 - Valores médios obtidos no efluente da ETE utilizado como meio de cultura alternativo (Experimento E2). Valores expressos como média \pm desvio padrão.

Parâmetro	Efluente	Meio TAP
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	$21,7 \pm 4,7$	nd.
DBO (mg L^{-1})	$10,7 \pm 3,0$	nd.
DQO (mg L^{-1})	$106,3 \pm 5,3$	nd.
Fósforo Total ($\text{mg L}^{-1}\text{P}$)	$6,1 \pm 2,0$	81,7
Sólidos Suspensos (mg L^{-1})	$41,0 \pm 9,9$	nd.
Nitrogênio- NH_4 (mg L^{-1})	$44,2 \pm 6,5$	93,0
Nitrogênio- NO_2^- (mg L^{-1})	$0,2 \pm 0,1$	nd.
Nitrogênio- NO_3^- (mg L^{-1})	$1,9 \pm 0,2$	nd.
Nitrogênio Total (mg L^{-1})	$57,0 \pm 9,8$	nd.
Alcalinidade Total ($\text{mg L}^{-1}\text{CaCO}_3$)	$200,6 \pm 66,3$	nd.
pH	$7,3 \pm 0,1$	nd.
Razão Molar N:P	18:1	-

onde nd. = valor não determinado.

Os valores de nitrogênio amoniacal e fósforo encontrados no meio TAP foram determinados pelas concentrações de reagentes P.A. utilizadas no preparo do meio segundo Gorman e Levine (1965).

3.3.3 Experimento 3: Efeito da introdução de diferentes concentrações de CO₂ nos cultivos de *Chlamydomonas* sp.1, isolada de lixiviado de aterro sanitário.

O Experimento 3 foi realizado no Laboratório de Cultivo de Algas, do Departamento de Aqüicultura da UFSC, com a microalga *Chlamydomonas* sp.1. Cada unidade experimental consistiu em colunas de vidro (dimensão de 70 mm de comprimento por 70 mm de largura por 1.200 mm de altura). O volume utilizado para o cultivo foi de 5.000 mL (1.020 mm de altura de coluna d'água). As unidades experimentais foram dispostas em sala com temperatura controlada de 25 ± 2 °C. A iluminação foi constante com intensidade luminosa de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 18).

Figura 18 - Unidades experimentais dispostas em sala com temperatura controlada de 25 ± 2 °C e iluminação constante.



Foi avaliado o efeito da introdução de diferentes concentrações de CO₂ às culturas (Figura 19). Cinco tratamentos experimentais foram testados: um tratamento com aeração constante, com fluxo de $0,5 \text{ L min}^{-1}$ (0,1 vvm - volume de gás por volume de meio de cultura por minuto)

de ar atmosférico (0,038% CO₂ v v⁻¹), denominado T-0%; e outros quatro tratamentos com a adição de ar atmosférico enriquecido com CO₂ puro, resultando em proporções de 5, 10, 15 e 20% de dióxido de carbono (v v⁻¹) com fluxo de 0,1 vvm, denominados T-5, T-10, T-15 e T-20%, respectivamente.

Foi utilizado como meio de cultura o efluente coletado no estágio final do processo de tratamento na mesma Estação de Tratamento de Esgoto doméstico (ETE) descrita nos experimentos E1 e E2. A Tabela 5 apresenta as características químicas do efluente utilizado como meio de cultura. Estas análises seguiram os protocolos do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005).

O efluente utilizado como meio de cultura em cada tratamento foi clorado 24 horas antes do início do experimento e, após, neutralizado. O pH das culturas foi monitorado diariamente. Cada tratamento experimental teve três repetições, distribuídas ao acaso, totalizando 15 unidades experimentais. O experimento teve duração de 14 dias, momento em que as culturas atingiram a DCM (Figura 20).

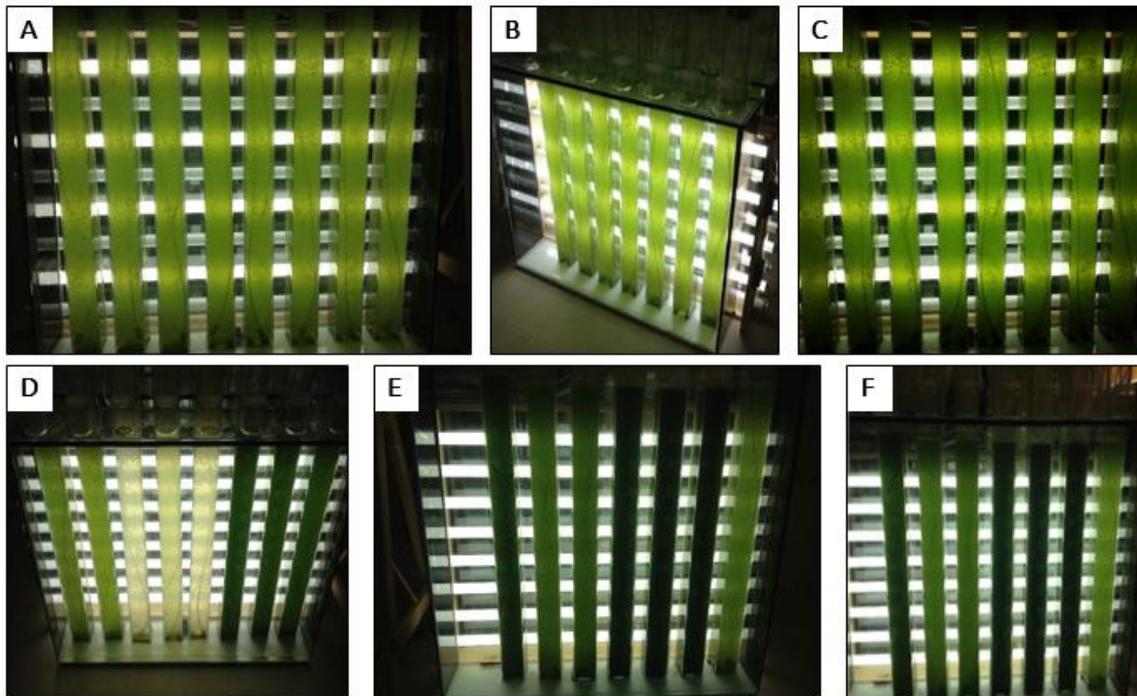
Tabela 5 - Valores médios obtidos no efluente da ETE utilizado como meio de cultura alternativo (Experimento E3).

Parâmetro	
Temperatura (°C)	27,4
DBO ₅ (mg L ⁻¹)	40,0
DQO (mg L ⁻¹)	114,0
Fósforo Total (mg L ⁻¹)	9,58
Sólidos Suspensos (mg L ⁻¹)	64,0
Nitrogênio-NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	17,74
Nitrogênio-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	0,218
Nitrogênio-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	0,92
Alcalinidade Total (mg L ⁻¹ CaCO ₃)	213,33
pH	7,6
Razão Molar N:P	5:1

Figura 19 - Procedimentos de coleta de dados sendo realizados. (A) Ajuste de concentração de CO_2 ; (B) monitoramento da temperatura do meio de cultura; (C, D e E) coleta de amostras dos cultivos.



Figura 20 - Experimento E3. (A, B e C) Dias iniciais do experimento E3; (D, E e F) dias finais do experimento E3.



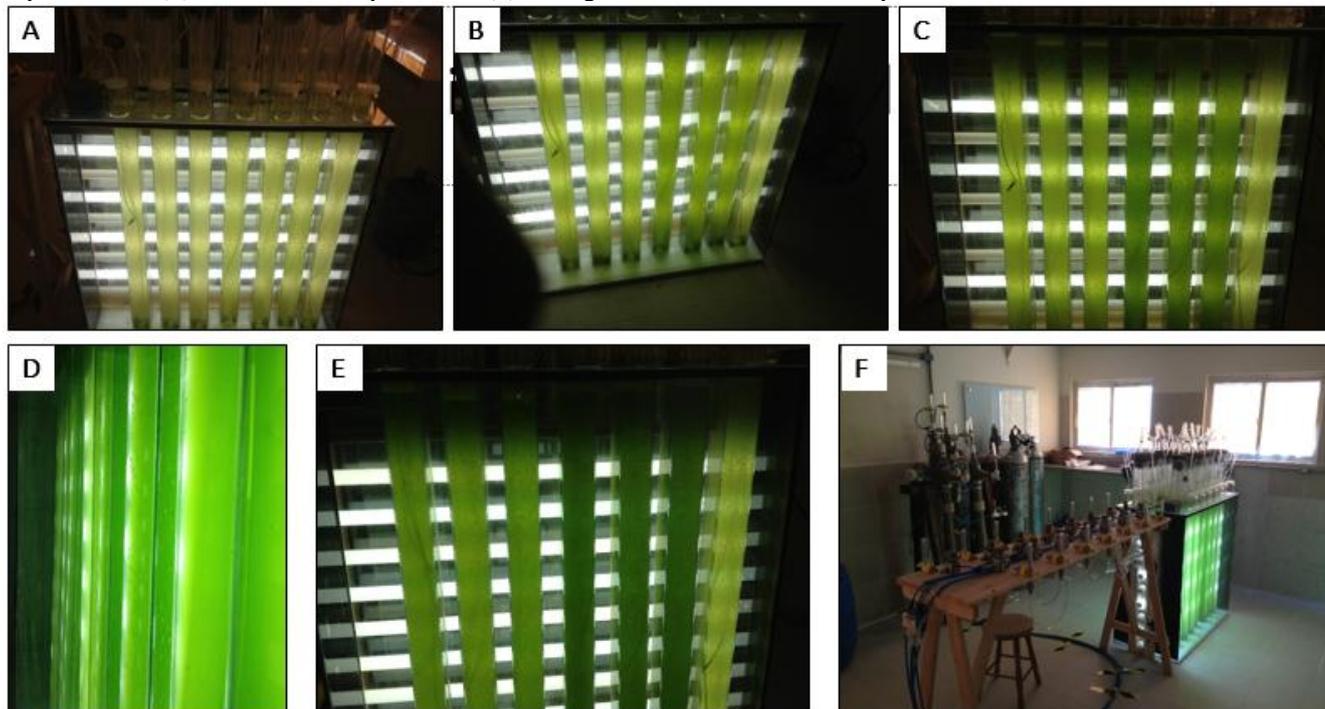
3.3.4 Experimento 4: Efeito da introdução de diferentes concentrações de CO₂ nos cultivos da microalga ácido-tolerante *Chlamydomonas* sp.2, isolada de lago de drenagem ácida de mina de carvão.

O Experimento 4 teve duração de 10 dias (momento em que as culturas atingiram a DCM) e, igualmente aos outros experimentos, foi realizado no Laboratório de Cultivo de Algas, do Departamento de Aquicultura da UFSC. Neste experimento foi utilizado a micralga *Chlamydomonas* sp.2. Foram utilizadas as mesmas condições utilizadas no Experimento E3, descrita no item 3.3.2. (Figura 21). Já o efluente utilizado como meio de cultura, analisado segundo os protocolos do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005), estão descritos na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**

Tabela 6 - Valores médios obtidos no efluente da ETE utilizado como meio de cultura alternativo (Experimento E4).

Parâmetro	
Temperatura (°C)	25,8
DBO ₅ (mg L ⁻¹)	14,0
DQO (mg L ⁻¹)	78,0
Fósforo Total (mg L ⁻¹)	3,94
Sólidos Suspensos (mg L ⁻¹)	53,0
Nitrogênio-NH ⁺ (mg L ⁻¹)	57,9
Nitrogênio-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	1,7
Nitrogênio-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	6,2
Alcalinidade Total (Mg L ⁻¹ CaCO ₃)	165,4
pH	7,8
Razão Molar N:P	38:1

Figura 21 - Experimento E4. (A) Início do experimento; (B e C) Após início do experimento; (D) Vista lateral das unidades experimentais; (E) Dias finais do experimento; (F) Vista geral da infra-estrutura do experimento E4.



3.4 Delineamento Experimental

Foram realizados quatro experimentos com delineamento unifatorial. Os dois primeiros experimentos (E1 e E2) foram compostos por três tratamentos. No Tratamento Experimental 1 (T1) foi utilizado o meio de cultura TAP; no Tratamento Experimental 2 (T2) foi utilizado como meio de cultura uma mistura entre 50% do efluente e 50% do meio de cultura TAP; e no Tratamento Experimental 3 (T3) o meio de cultura TAP foi substituído pelo efluente doméstico tratado. Cada tratamento teve quatro repetições, totalizando 12 unidades experimentais em cada experimento (E1 e E2), conforme demonstrado no Quadro 12.

Quadro 12 - Modelo do desenho experimental aplicado nos experimentos E1 e E2.

Tratamento Experimental	Meio de Cultura	Repetições
T1	TAP	4
T2	50% TAP + 50% Efluente	4
T3	100% Efluente	4

Os dois outros experimentos (E3 e E4), foram compostos por 5 tratamentos, cada uma com uma diferente concentração de CO₂ injetado no cultivo (Quadro 13). Cada tratamento teve 3 repetições, totalizando em 15 unidades experimentais.

Quadro 13 - Modelo do desenho experimental aplicado nos experimentos E3 e E4.

Tratamento Experimental	Concentração de CO ₂	Repetições
T-0%	0,038%*	3
T-5%	5%	3
T-10%	10%	3
T-15%	15%	3
T-20%	20%	3

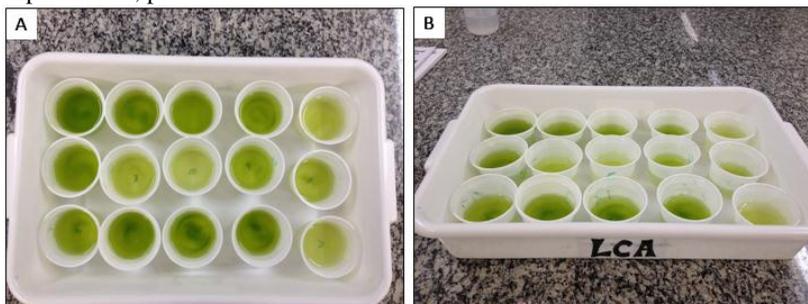
* O tratamento T-0% apenas recebeu ar atmosférico proveniente do compressor.

3.5 Avaliação do Crescimento

Através da elaboração de curvas de crescimento representadas pelo incremento celular diário, determinou-se o crescimento das culturas de microalgas. Foram avaliados em cada unidade experimental, a Densidade Celular Máxima (DCM), o Tempo de Cultivo (TEMPO), a Taxa de Crescimento Específico (μ), a Velocidade de Crescimento (K), e o Tempo de Duplicação (T_2).

Após o início do experimento, a cada 24 horas foi retirada uma amostra (10 mL) para quantificar a densidade celular (Figura 22). A contagem das células foi realizada em microscópio, com auxílio de câmara de Neubauer, sendo o número de células equivalente a média de três contagens (Figura 23).

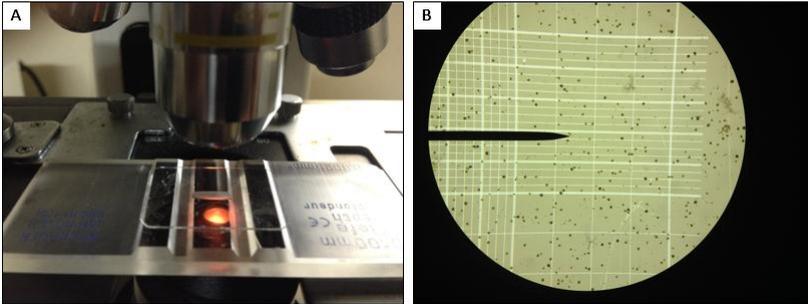
Figura 22 - (A e B) Amostras retiradas diariamente, de cada unidade experimental, para coleta de dados.



3.5.1 Curvas de Crescimento

As curvas de crescimento para cada espécie em cada tratamento foram elaboradas com a densidade celular diária média entre as três repetições.

Figura 23 - (A) Câmera de Neubauer disposta em microscópio; (B) quadrantes da câmara de Neubauer utilizados para contagem de células nos cultivos da espécie 1.



3.5.2 Densidade Celular Máxima (DCM)

Este parâmetro é o valor máximo obtido de densidade celular ao longo do cultivo. A Densidade Celular Máxima é descrita em células por mililitro..

3.5.3 Tempo de Cultivo (TEMPO)

O Tempo de Cultivo é definido pelo tempo transcorrido, em dias, entre o início do cultivo (adição do inóculo) e o alcance da Densidade Celular Máxima (DCM).

3.5.4 Taxa de Crescimento Específico (μ)

Em cada unidade experimental, foi determinada a Taxa de Crescimento Específico no dia em que a cultura atingiu a Densidade Celular Máxima. Este parâmetro foi determinado através da Equação 6, citada em Lourenço (2006):

$$\mu = \frac{\ln(N_t - N_0)}{\Delta t} \quad (6)$$

Onde:

μ = taxa de crescimento específico;
 ln = logaritmo natural;
 t = tempo em dias;
 N_0 = densidade celular inicial;
 N_t = densidade celular final.

3.5.5 Velocidade de Crescimento e Tempo de Duplicação

Para comparação do crescimento entre os diferentes tratamentos, também foram calculados a velocidade de crescimento e o tempo de duplicação, este também conhecido como tempo de geração.

Estes parâmetros foram determinados através das equações 7 e 8, conforme Derner (2006):

$$k = \left(\frac{3,322}{\Delta t} \right) \times \text{Log} \left(\frac{N_t}{N_0} \right) \quad (7)$$

Onde:

k = velocidade de crescimento;
 3,322 = fator de conversão do logaritmo em base 2 a base 10;
 t = tempo em dias;
 N_0 = densidade celular inicial;
 N_t = densidade celular final;
 Log = logaritmo em base 10.

$$T_2 = \frac{1}{k} \quad (8)$$

Onde:

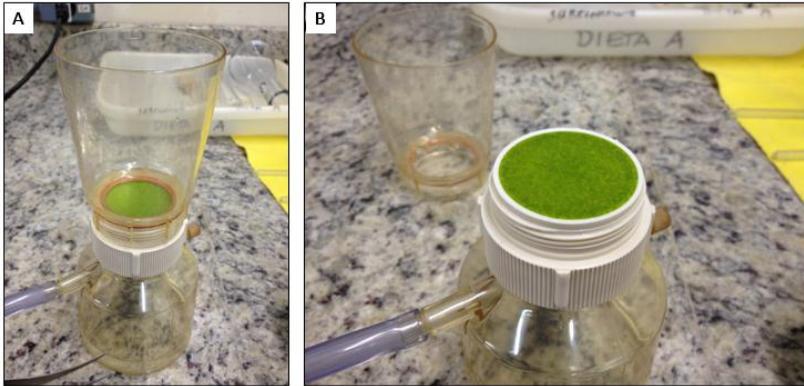
T_2 = tempo de duplicação;
 k = velocidade de crescimento.

3.6 Determinação da Produtividade

Para obterar a produtividade dos cultivos, a massa seca foi determinada no início de cada experimento e a cada dois dias após o seu início. Alíquotas foram coletadas (20 mL), filtradas (Figura 24) e secas

em estufa bacteriológica, a 50 °C, até atingirem peso constante, conforme Arredondo-Vega e Voltolina (2007). A produtividade, em $\text{g L}^{-1} \text{dia}^{-1}$, foi calculada a partir dos dados de massa seca final e do tempo de cultivo atingido em cada unidade experimental.

Figura 24 - (A e B) Alíquotas coletadas dos cultivos, e filtradas em filtros de fibra de vidro GF-1, porosidade de 0,7 μm .



3.7 Avaliação da Fixação de Carbono

Nos experimentos E3 e E4 foram avaliadas a fixação de carbono. Para isso, foram calculados os seguintes parâmetros: taxa de biofixação de CO_2 (RF_{CO_2}); quantidades de CO_2 removido pelos cultivos; e quantidade de CO_2 biofixado pelos cultivos.

A mistura gasosa (ar enriquecido com CO_2), injetada em cada unidade experimental, foi propiciada com o uso de um compressor de ar e um cilindro de CO_2 puro. Para atingir as proporções de dióxido de carbono desejadas em cada tratamento (5, 10, 15 e 20% CO_2 (v v^{-1})), foi controlada a vazão proveniente do compressor e a vazão proveniente do cilindro de CO_2 puro, através de rotâmetros (Figura 25). A vazão final da mistura (ar atmosférico enriquecido com CO_2) foi ajustada para 0,1 vvm (volume de ar por volume de meio de cultura) em cada unidade experimental, através de um rotâmetro posicionado imediatamente antes da entrada do ar enriquecido (Figura 26). O ar enriquecido foi injetado no fundo das unidades experimentais, através de difusor de ar com 1,5 cm de diâmetro .

Figura 25 - Esquema simplificado da instalação do Experimento E3 e E4 com ênfase no sistema de inoculação da mistura (ar atmosférico x CO_2).

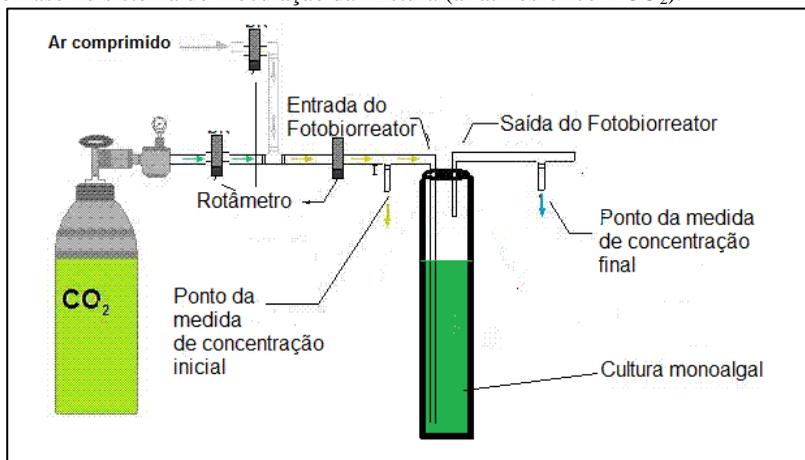


Figura 26 - (A) Mesa com rotômetros para controle da vazão na entrada das unidades experimentais; (B) Entrada e saída de ar das unidades experimentais; (C) Misturador de gases com rotômetros para controle de vazão do compressor de ar e do cilindro de CO_2 .



Nas entradas das unidades experimentais dos tratamentos T-5%, T-10%, T15% e T-20%, foram quantificadas as concentrações de dióxido de carbono presentes no ar injetado, e ajustadas diariamente, após o início do experimento, através do equipamento GEM 2000, da marca Landtec (Precisão de 0,1%) (Figura 27).

Figura 27 - Medidor de gases GEM 2000.



Fonte: Google Imagens.

A taxa de biofixação de CO_2 (RF_{CO_2}) em $\text{g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ foi calculada utilizando a Equação 9 (MORAIS; COSTA, 2007).

$$\text{RF}_{\text{CO}_2} = C_c \cdot \left(\frac{X_{t_1} - X_t}{t_1 - t} \right) \cdot \left(\frac{M_{\text{CO}_2}}{M_c} \right) \quad (9)$$

Onde:

C_c = conteúdo de carbono orgânico na biomassa (%);

X_{t_1} = massa seca contida na cultura no dia t_1 (g L^{-1})

X_t = massa seca no dia t (g L^{-1})

M_{CO_2} = peso molecular do dióxido de carbono

M_c = peso molecular do carbono

O conteúdo de carbono orgânico na biomassa de microalgas foi adotado como 50% (CHISTI, 2007).

Para determinar as concentrações de dióxido de carbono na saída das unidades experimentais, a partir do início do experimento, a cada 24 horas foi retirada uma amostra de gás e quantificada através do aparelho portátil GEM 2000, da marca Landtec (Precisão de 0,1%) (Figura 28) disponível no Laboratório de Efluentes Líquidos e Gasosos (LABEFLU). Estas análises somente ocorreram nos tratamentos experimentais T-5%, T-10%, T-15% e T-20%.

Figura 28 - Análise da concentração de CO_2 na saída (A e B); e na entrada de cada unidade experimental (C).



Para determinar a quantidade de dióxido de carbono removido ao longo do cultivo, diariamente, calculou-se a eficiência de remoção de CO₂, conforme Jacob-Lopes et al.(2009) e demonstrado na Equação 10. Ao final dos experimentos E3 e E4 foi calculada a média das eficiências de remoção obtidas e estimado a quantidade de CO₂ removido, em quilogramas por unidade experimental.

$$ER_{CO_2} = \frac{(CO_{2i} - CO_{2f})}{CO_{2i}} \quad (10)$$

Onde:

ER_{CO₂} = eficiência de remoção de CO₂ (%);

[CO_{2f}] = concentração de CO₂ na saída do reator (%);

[CO_{2i}] = concentração de CO₂ na entrada do reator (%).

A partir dos dados de massa seca final e inicial (massa seca acumulada), foi determinado a quantidade de CO₂ biofixado ao longo do cultivo, em quilogramas, por unidade experimental. Com estes resultados foi possível determinar os percentuais de remoção do CO₂ introduzido ao longo dos cultivos, e que foram biofixados na biomassa microalgal.

3.8 Avaliação da Concentração de Nitrogênio e Fósforo

Nos experimentos E3 e E4 foram avaliadas as concentrações iniciais e finais de nitrogênio amoniacal (N-NH₄⁺), nitrogênio nitrito (N-NO₂⁻), nitrogênio nitrato (N-NO₃⁻), e ortofosfato (P-PO₄³⁻) de cada unidade experimental.

Para a análise dos parâmetros apontados acima foram coletadas amostras do meio de cultura no início (meio de cultura sem a inoculação das microalgas) e no final do experimento (após separação da biomassa do meio de cultura) e, então, mantidas em congelador. As análises foram feitas no Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) da UFSC. O Quadro 14 resume os parâmetros analisados, e as metodologias que foram empregadas, baseadas no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005).

Quadro 14 - Métodos analíticos para avaliação de remoção de nitrogênio e fósforo.

Parâmetro	Metodologia
Nitrogênio amoniacal	Método de Nessler com kit Hach e amostras lidas em espectrofotômetro Hach modelo DR/2010.
Nitrito	Método da Alfa-naftilamina e leitura em espectrofotômetro HachR modelo DR/2010.
Nitrato	Método da Brucina e leitura em espectrofotômetro HachR modelo DR/2010.
Fósforo dissolvido reativo	Método colorimétrico do ácido vanadomolibdofosforico com kit Hach e amostras lidas em espectrofotômetro Hach modelo DR/2010

3.9 Avaliação do Perfil de Ácidos Graxos e Teor de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos (FAME) Presentes na Biomassa Microalgal

Ao final do cultivo, a biomassa microalgal foi liofilizada². Para isto, as culturas foram centrifugadas em centrífuga refrigerada (Marca: Nova Técnica; Modelo: 250), a 3.500 rpm e temperatura por volta de 10 °C durante 10 minutos, para a separação da biomassa do meio de cultura. Este procedimento foi repetido duas vezes, empregando água destilada para a retirada de restos do meio de cultura. A biomassa úmida foi congelada em tubos de ensaio, em um freezer a aproximadamente - 20 °C, e, então, foram transferidas ao liofilizador (Marca: Terroni Favel; Modelo: LT 1000/8) (Figura 29).

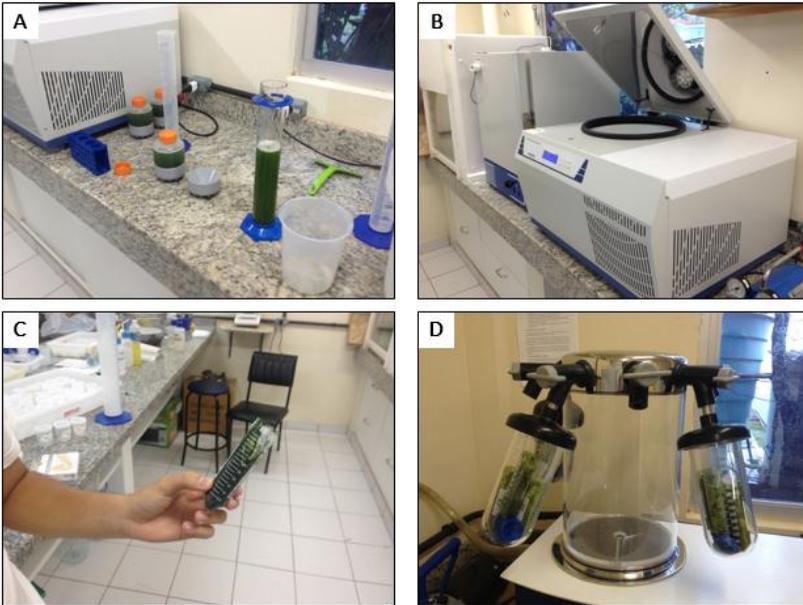
Para a avaliação do perfil de ácidos graxos e teor de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) foi utilizada a biomassa seca (liofilizada) separada de cada unidade experimental no final dos experimentos, quando atingiram a fase estacionária de crescimento (Figura 30). As análises foram realizadas no Laboratório de Métodos de

² Liofilização é um processo de desidratação usado para preservar a biomassa. Esta é congelada e a água retirada, por sublimação, sem que passe pelo estado líquido.

Extração e Separação (LAMES), da Universidade Federal de Goiás (UFGO).

O procedimento de transesterificação direta da biomassa coletada nos experimento E3 e E4 em ésteres metílicos de ácidos graxos foi feito conforme descrito por Menezes et al. (2013). Para o cálculo do teor de éster da biomassa microalgal foi retirado 1 mL da fase heptânica, obtida via transesterificação direta, e transferido para frasco eppendorf® previamente pesado. As amostras foram deixadas em dessecador, para evaporação do solvente, até a massa de FAME atingir peso constante. O teor de éster de cada microalga foi obtido pela relação entre a massa de FAME e a massa inicial utilizada no procedimento de transesterificação direta.

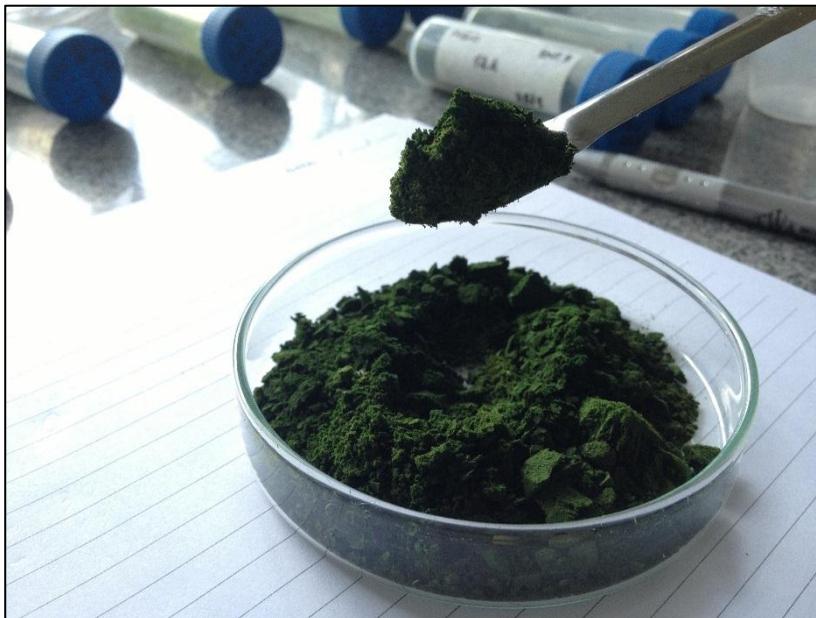
Figura 29 - (A) Amostras coletadas ao final do cultivo prontas para serem centrifugadas; (B) centrifuga; (C) biomassa centrifugada; (D) biomassa sendo liofilizada.



A análise da composição de FAME foi realizada em Cromatógrafo a Gás (Agilent 7890), equipado com detector FID e injetor split/splitless empregando coluna capilar DB-WAX (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). O forno foi operado sob temperatura inicial de 70 $^{\circ}\text{C}$ e aquecido a 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 240 $^{\circ}\text{C}$, mantido nesta temperatura por 13

min, sendo novamente aquecido a $5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até $250\text{ }^{\circ}\text{C}$. O injetor foi mantido a temperatura de $310\text{ }^{\circ}\text{C}$, com volume de injeção de $2\text{ }\mu\text{L}$, no modo split, com razão de split de 10:1. A temperatura do detector foi mantida a $310\text{ }^{\circ}\text{C}$. Foi utilizado hidrogênio 5.0 como gás de arraste, à velocidade linear de 42 cm s^{-1} , e nitrogênio como gás make-up auxiliar a 20 mL min^{-1} . Os FAME foram identificados pela comparação direta com amostras de oleaginosas de composição conhecida, por injeção de padrões de referência de FAME (NuCheckPrep®) e por análises via Cromatografia Gasosa de Alta Resolução acoplada a Espectrometria de Massas (HRGC-MS).

Figura 30 - Biomassa liofilizada sendo pesada e separada para posterior análise de ésteres.



3.10 Análise Estatística

Para a análise estatística, cada recipiente de cultivo (Erlenmeyer, nos experimentos E1 e E2, e Coluna de Vidro nos experimentos E3 e E4) foi considerado como uma unidade experimental (U.E.). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA, $\alpha < 0,05$). Quando detectadas diferenças significativas foi aplicado o teste de Tukey, para comparação entre as médias dos tratamentos. Os resultados de turbidez e massa seca nos experimentos E1 e E2 foram correlacionados e comparados por análise de regressão linear (ZAR, 1996). As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do Software STATISTICA 7.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento1: Efeito do uso de efluente doméstico tratado, como meio de cultura, sobre o crescimento e produtividade do cultivo de *Chlamydomonas* sp.2, isolada de lago de drenagem ácida de mina de carvão.

Os resultados deste experimento foram submetidos a publicação na Revista Interciência (Qualis B1 na área Engenharias I).

4.1.1 Parâmetros de Crescimento

Na Figura 31 são demonstrados os valores de densidade celular, ao longo dos dias de cultivo, para cada tratamento experimental (média entre quatro repetições de cada tratamento). Os Tratamentos T2 e T3 (50% e 100% de efluente doméstico tratado, respectivamente) geraram a maior densidade celular, porém sem diferença estatisticamente significativa entre eles. Ambos os valores foram maiores que aquele proveniente do tratamento T1 (controle).

O tempo de cultivo, considerado o tempo entre o início do cultivo e o alcance da densidade celular máxima, não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (Tabela 7). O mesmo ocorreu para os outros parâmetros de crescimento (taxa de crescimento específico - μ , velocidade de crescimento - k , e tempo de duplicação). Apesar destes parâmetros não terem apresentado diferenças significativas, os melhores resultados de crescimento tenderam para os cultivos que utilizaram 100% efluente doméstico tratado (T3), uma vez que este tratamento obteve a máxima média de DCM e mínima média de tempo de cultivo (Tabela 7).

A espécie isolada na presente pesquisa (*Chlamydomonas* sp.2) apresentou crescimento satisfatório, quando comparada com dados encontrados na literatura para outras microalgas. Tang et al. (2011), utilizando meio de cultura sintético, com temperatura de 25°C e pH 7, sem adição de CO₂, relatam uma taxa de crescimento específico (μ) de 0,5 e 0,6 dia⁻¹ ao cultivar as também Chlorophyta, *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella pyrenoidosa*, respectivamente. Já com a adição de 5% (v v⁻¹) de CO₂ nas culturas, ambas apresentam uma taxa de crescimento específico de 0,9 dia⁻¹. Radmann et al. (2011) cultivaram

microalgas isoladas de lagoas de tratamento de efluentes com alta alcalinidade e pH 10. Entre estas microalgas encontram-se *S. obliquus* e *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta), as quais apresentaram melhores resultados de crescimento quando cultivadas com a adição de 12% (v v⁻¹) de CO₂ em temperatura de 30 °C, em pH entre 8 e 9. Ambas tiveram taxas de crescimento específico de 0,2 dia⁻¹, e tempo de duplicação próximo a 3 dias. Desse modo, é possível que a espécie de *Chlamydomonas* sp. cultivada neste trabalho, possa crescer mais eficientemente com o aumento da concentração de CO₂ introduzido nos cultivos. Contudo, os dados alcançados neste trabalho com adição de 1% (v v⁻¹) de CO₂ são satisfatórios.

Figura 31 - Aumento da densidade celular (10⁴ células mL⁻¹) durante o cultivo de *Chlamydomonas* sp.2. Cada linha refere-se a média entre quatro repetições de cada tratamento. T1 - Meio TAP; T2 - 50% Efluente; T3 - 100% Efluente.

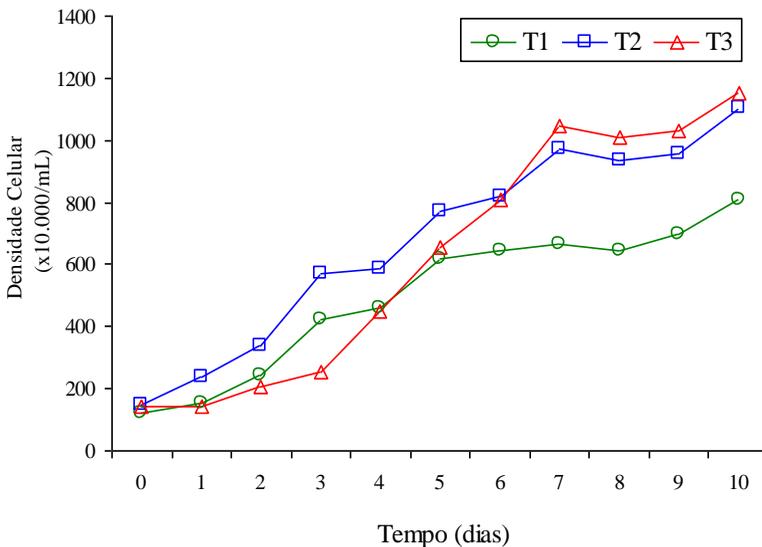


Tabela 7 - Valores de Densidade Celular Máxima (DCM), Tempo de Cultivo, Velocidade de Crescimento (k), Tempo de Duplicação, Taxa de Crescimento Específico (μ) e Produtividade nos diferentes tratamentos (Experimento E1).

Parâmetro de Crescimento	Tratamento1 (Meio TAP)	Tratamento2 (50% Eflu.)	Tratamento 3 (100% Eflu.)
DCM (10^4 cél. mL ⁻¹)	819 ± 230 a	1136 ± 122 b	1151 ± 80 b
Tempo de Cultivo (dias)	8,75 ± 1,50 a	9,50 ± 1,00 a	8,75 ± 1,50 a
Velocidade de Crescimento - K	0,30 ± 0,04 a	0,33 ± 0,03 a	0,37 ± 0,07 a
Tempo de Duplicação (dias)	3,3 ± 0,5 a	3,0 ± 0,3 a	2,8 ± 0,4 a
Taxa de Crescimento Específico- μ (dia ⁻¹)	0,75 ± 0,11 a	0,73 ± 0,08 a	0,80 ± 0,14 a
Produtividade (g L ⁻¹ dia ⁻¹)	0,13 ± 0,02 a	0,10 ± 0,01 ab	0,08 ± 0,01 b

Valores expressos como média ± desvio padrão.

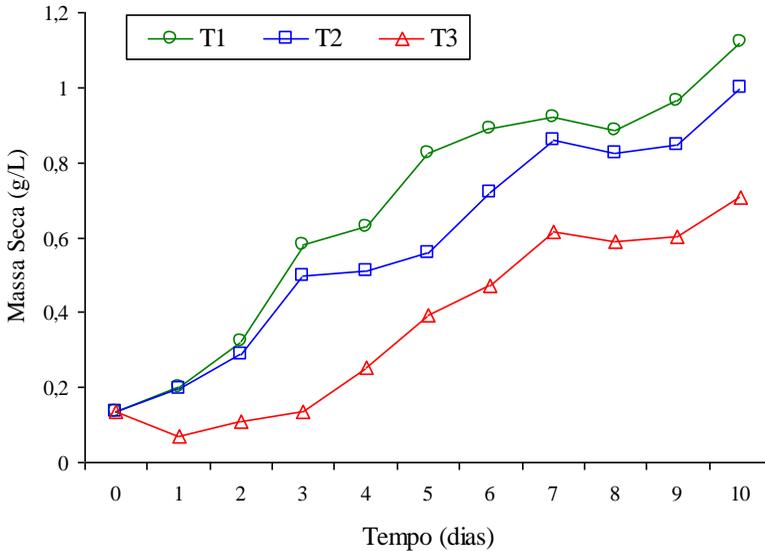
Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas.

4.1.2 Produtividade

As unidades experimentais foram inoculadas com uma massa seca inicial média de $0,13 \pm 0,02$ g L⁻¹. A Figura 32 apresenta os valores de massa seca, ao longo dos dias de cultivo, para cada tratamento experimental (média entre quatro repetições de cada tratamento). Contrapondo os dados de densidade celular apresentados na Figura 31, os tratamentos T1 e T2 atingiram maior massa seca, alcançando as médias de $1,12 \pm 0,17$ e $1,00 \pm 0,11$ g L⁻¹, respectivamente, as quais não apresentaram diferenças significativas entre si. Já o tratamento T3 (100% de efluente doméstico tratado) atingiu um valor médio de massa seca inferior ($0,7 \pm 0,05$ g L⁻¹). Este resultado sugere que o meio de cultura tenha influência sobre o volume celular. No entanto, na presente

pesquisa não foi realizada a avaliação deste parâmetro. Quanto à produtividade em $\text{g L}^{-1} \text{dia}^{-1}$, considerando o tempo de cultivo alcançado em cada tratamento, o cultivo da microalga ácido-tolerante *Chlamydomonas* sp.2 em efluente doméstico tratado como meio de cultura alternativo, foi inferior ao cultivo em meio de cultura TAP. Já a adição de 50% de efluente doméstico tratado ao meio de cultura TAP não mostrou diferença estatística com os demais tratamentos, apresentando um valor intermediário (Tabela 7).

Figura 32 - Aumento da massa seca (g L^{-1}) durante o cultivo de *Chlamydomonas* sp.2. Cada linha refere-se a média entre quatro repetições de cada tratamento. T1 - Meio TAP; T2 - 50% Efluente; T3 - 100% Efluente.



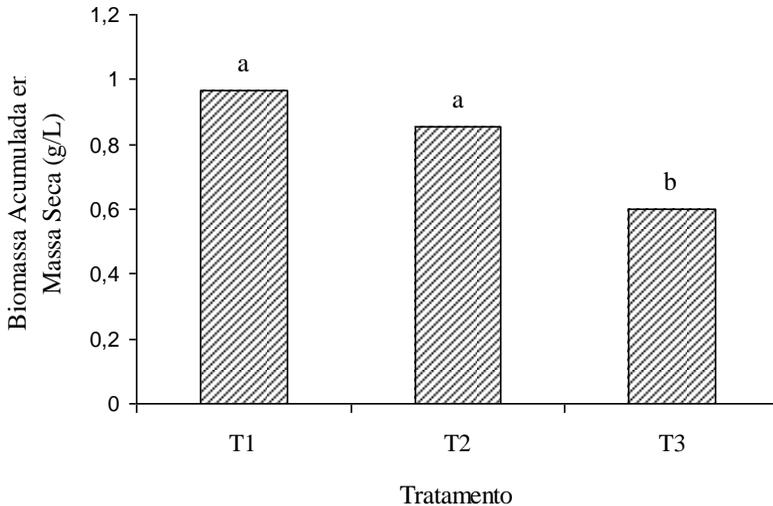
A biomassa acumulada, em gramas de massa seca por litro de cultura, não apresentou diferença significativa entre os tratamentos T1 e T2, ambos superiores ao cultivo em 100% do efluente como meio de cultura alternativo (T3) (Figura 33). Estes resultados sugerem que a menor concentração de nutrientes, encontrada no efluente doméstico tratado, tenha limitado o acúmulo de biomassa, sendo que para evitar esta situação é necessário manter ao menos 50% do meio TAP.

Tang et al. (2011), relatam uma concentração máxima de biomassa em massa seca de $1,05 \pm 0,02$ e $1,80 \pm 0,02$ g L⁻¹ em cultivos de *S. obliquus* e $0,87 \pm 0,01$ e $1,44 \pm 0,01$ g L⁻¹ em cultivos de *C. pyrenoidosa*, o primeiro resultado sem a adição de CO₂ (0,03% v v⁻¹) e o segundo com a adição de 5% (v v⁻¹) de CO₂. A produtividade alcançada nestes cultivos foi de 0,08 g L⁻¹ dia⁻¹ (0,03% v v⁻¹ CO₂), 0,15 g L⁻¹ dia⁻¹ (5% v v⁻¹ CO₂) para *S. obliquus* e 0,06 g L⁻¹ dia⁻¹ (0,03% v v⁻¹ CO₂), 0,13 g L⁻¹ dia⁻¹ (5% v/v CO₂) para *C. pyrenoidosa* (TANG et al., 2011). Radmann et al. (2011), nas condições descritas acima, relatam produtividades de 0,05 g L⁻¹ dia⁻¹ e 0,08 g L⁻¹ dia⁻¹ nos cultivo de *S. obliquus* e *C. vulgaris*, respectivamente. Já a microalga *C. vulgaris* quando cultivada em meio sintético (BG11), 25°C, sob a introdução de 10% (v v⁻¹) CO₂ apresentou produtividade de 0,10 g L⁻¹ dia⁻¹ (YOO et al., 2010). Ainda, a microalga marinha *Nannochloropsis oculata*, divisão Heterokontophyta, quando cultivada em meio de cultura sintético, 26°C, sob a introdução de 2% (v v⁻¹) de CO₂, atingiu concentração máxima de massa seca de 1,2 g L⁻¹ (CHIU et al., 2009).

Com base nestes resultados encontrados na literatura, apesar do cultivo da microalga ácido-tolerante *Chlamydomonas* sp.2 em 100% efluente doméstico tratado ter sido prejudicado quanto aos resultados de produtividade, o uso deste meio de cultura alternativo tem potencial para a produção de biomassa microalgal de baixo custo. A adição de 50% de efluente doméstico tratado ao meio de cultura sintético TAP se mostrou adequado como alternativa para baixar custos com adição de nutrientes e água, além de manter os resultados de produtividade.

Jiang et al. (2011) ao estudar o cultivo de *Nannochloropsis* sp. em meio de cultura sintético convencional e em meio de cultura alternativo, composto pela adição de 50% de efluente doméstico à água salgada, relatam uma maior biomassa final atingida no segundo (0,16 e 0,21 g L⁻¹, respectivamente). Estes autores atribuem este resultado à presença de maior concentração de carbono orgânico no meio alternativo. Contudo, o mesmo não ocorre nesta pesquisa, o que sugere que a microalga ácido-tolerante *Chlamydomonas* sp.2, nas condições testadas, não é favorecida pelo crescimento mixotrófico (utilização simultânea de CO₂ e substrato orgânico como fonte de carbono).

Figura 33 - Biomassa acumulada durante o cultivo de *Chlamydomonas* sp.2, representada em massa seca (g L^{-1}). Cada barra refere-se a média entre quatro repetições de cada tratamento. T1-Meio TAP; T2-50% Efluente; T3-100% Efluente. Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas.



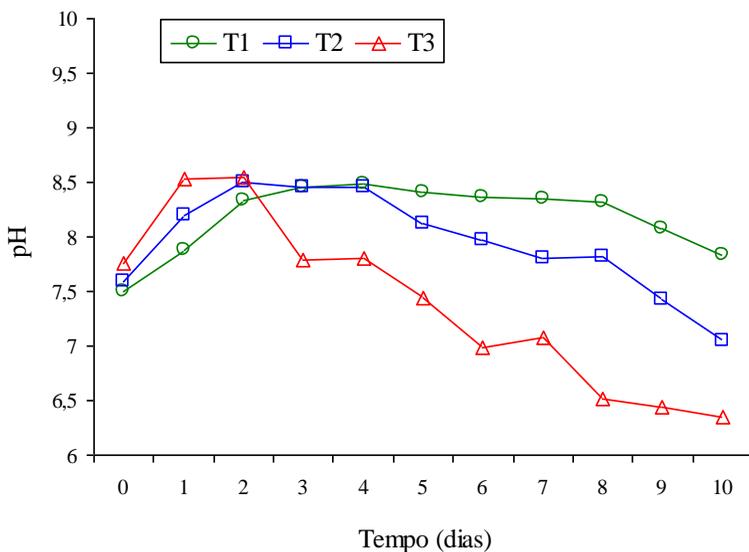
4.1.3 pH

Os valores médios do pH, medidos diariamente, após o início dos cultivos, são apresentados na Figura 34. Houve variação dos valores de pH ao longo do cultivo. Os três tratamentos iniciaram com pH de $7,6 \pm 0,1$, enquanto que ao final do cultivo, foram observados valores de $7,8 \pm 0,3$, $7,0 \pm 0,4$ e $6,3 \pm 0,1$ para os tratamentos T1, T2 e T3, respectivamente. O valor médio de pH durante os 10 dias de cultivo foi de $8,9 \pm 0,1$ para o T1, $7,9 \pm 0,1$ para o T2 e $7,4 \pm 0,1$ para o T3. Nesta pesquisa, a microalga ácido-tolerante *Chlamydomonas* sp.2 foi cultivada sem que houvesse a acidificação do efluente doméstico tratado, haja vista o interesse em utilizá-lo nas condições em que o mesmo é descartado. Entretanto, estudos devem ser conduzidos com o meio de cultura alternativo acidificado, o que pode elevar os resultados aqui

atingidos. A acidificação do meio de cultura pode ser feita através da introdução de ar enriquecido com elevadas concentrações de CO_2 (BABCOCK et al., 2002). Isto foi realizado no experimento E4.

Apesar da adição de ar enriquecido contendo 1% (v v^{-1}) de CO_2 , o valor mínimo de pH atingido foi 6,3 no tratamento T3, provavelmente, devido ao elevado poder tampão encontrado nos meios de cultura utilizados na presente pesquisa. A Figura 34 demonstra que os tratamentos que continham meio de cultura TAP (T1 e T2) apresentaram uma menor oscilação do pH, provavelmente, devido a presença de Base Tris no meio, aumentando o seu poder tampão. Já a elevação do pH nos primeiros dias de cultivo sugere o aumento da produtividade fotossintética.

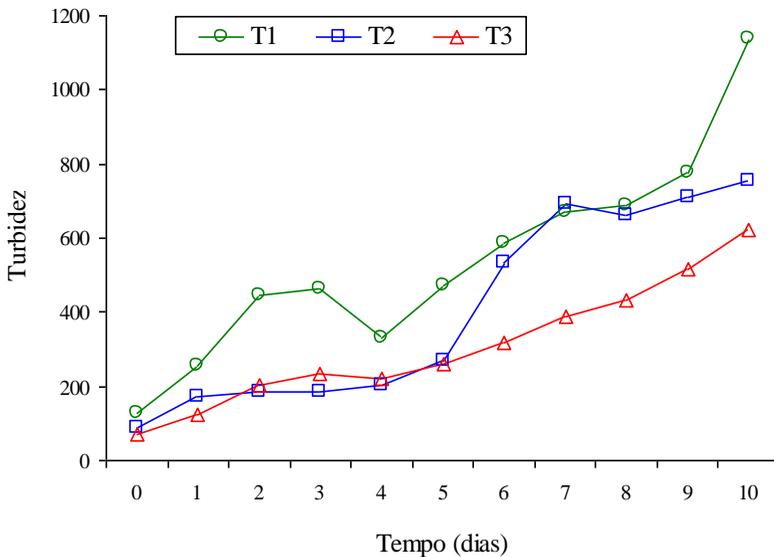
Figura 34 - Variação do pH durante o desenvolvimento das culturas (Experimento E1). Cada linha refere-se a média entre quatro repetições de cada tratamento. T1-Meio TAP; T2-50% Efluente; T3-100% Efluente.



4.1.4 Turbidez

Os valores médios de turbidez, medidos diariamente após o início dos cultivos, são apresentados na Figura 35. Estes resultados estão de acordo com os apresentados no gráfico de variação da massa seca durante o desenvolvimento das culturas, apresentado na Figura 32.

Figura 35 - Variação da turbidez em unidades nefelométricas durante o desenvolvimento das culturas (Experimento E1). Cada linha refere-se a média entre quatro repetições de cada tratamento. T1-Meio TAP; T2-50% Efluente; T3-100% Efluente.



Através da análise de regressão das linhas geradas pela relação entre a massa seca e a turbidez, as seguintes equações foram encontradas:

$$y=955,38x - 91,067 \quad (r^2 = 0,8495) \quad (11)$$

$$y=781,93x - 73,058 \quad (r^2 = 0,9419) \quad (12)$$

$$y=921,96x - 53,359 \quad (r^2 = 0,9807) \quad (13)$$

As equações 11, 12 e 13 são referentes aos tratamentos T1, T2 e T3, respectivamente. Nas equações, y equivale à massa seca (g L^{-1}) e x equivale à turbidez. Através do coeficiente de regressão linear (r^2), presume-se que a utilização dos dados de turbidez para acompanhamento da produtividade nos cultivos da microalga ácido-tolerante *Chlamydomonas* sp.2 isolada nesta pesquisa é confiável.

4.2.5 Conclusões referentes ao Experimento E1.

A microalga ácido-tolerante *Chlamydomonas* sp.2, isolada de lagos de drenagem ácida de mina de carvão situados no sul do estado de Santa Catarina, Brasil, quando cultivada em efluente doméstico tratado, como meio de cultura alternativo, apresentou adequado crescimento e produtividade. Porém, a produtividade em gramas por litro por dia foi inferior se comparada ao cultivo em meio de cultura sintético convencional para *Chlamydomonas* spp. (meio TAP).

A adição de 50% do meio de cultura alternativo ao meio TAP se mostrou potencial para diminuir o uso de fertilizantes e água no cultivo da microalga ácido-tolerante, estudada na presente pesquisa, sem prejudicar o acúmulo de biomassa. Isto sugere a possibilidade de diminuir os impactos e custos envolvidos durante a produção.

4.2 Experimento 2: Efeito do uso de efluente doméstico tratado, como meio de cultura, sobre o crescimento e produtividade do cultivo de *Chlamydomonas* sp.1, isolada de lixiviado de aterro sanitário.

Os resultados deste experimento foram publicados na Revista Tecno-lógica (Qualis B4 na área Engenharias I). O artigo pode ser acessado através do link abaixo:

<http://online.unisc.br/seer/index.php/tecnologica/article/view/3573/2589>

4.2.1 Parâmetros de Crescimento

A Figura 36 demonstra os valores de densidade celular ao longo dos dias de cultivo para cada tratamento (média entre quatro repetições de cada tratamento). Foram determinados os seguintes parâmetros de crescimento: densidade celular máxima (DCM), tempo de cultivo, velocidade de crescimento, tempo de duplicação e taxa de crescimento específico. O gráfico sugere que o Tratamento 2, contendo 50% de efluente doméstico tratado, alcançou a maior densidade celular, seguida do Tratamento 3, culturas cultivadas em 100% do efluente doméstico tratado. Ambos valores são maiores que aquele proveniente do Tratamento 1 (controle). Entretanto, esta diferença não é significativa estatisticamente. O tempo de cultivo foi de $9,25 \pm 1,5$ dias para o T1, $8,75 \pm 1,5$ dias para o T2 e $8 \pm 1,6$ dias para o T3. Quanto menor o tempo de cultivo, maior será a velocidade do crescimento, possivelmente aumentando a produtividade e diminuindo gastos operacionais envolvidos. Contudo, o tempo de cultivo não apresentou diferenças estatisticamente significativas.

Durante os primeiros cinco dias de cultivo, as culturas em 100% de efluente doméstico tratado (T3) apresentaram aumento mais expressivo da densidade celular, seguido das culturas com 50% de efluente doméstico tratado adicionado ao meio TAP (T2). A velocidade de multiplicação celular durante os dias iniciais foi influenciada pelo meio de cultura, estabilizando ao final do cultivo e não resultou em diferença na DCM atingida nos três tratamentos. Jiang et al. (2011) relatam que a microalga marinha *Nannochloropsis* sp., quando cultivada em água salgada com a adição de 10%, 30%, 50% e 80% de efluente doméstico, e quando cultivada em 100% de efluente doméstico apresenta maior crescimento durante os primeiros dias, conforme

aumentou a adição do efluente ao meio, atribuindo este resultado à concentração dos nutrientes. O efluente tratado utilizado no presente trabalho não contém uma maior concentração de nitrogênio e de fósforo do que a concentração inserida no meio de cultura TAP. É possível que a maior concentração de carbono orgânico e/ou a presença de outros compostos que estão presentes no efluente, tenham influenciado o crescimento nos primeiros dias de cultivo. Outra hipótese, é que tenha ocorrido a remineralização do efluente em decorrência da decomposição da matéria orgânica, aumentando a concentração dos nutrientes dissolvidos ao longo do tempo. No entanto, uma caracterização mais apurada do efluente utilizado se faz necessária para a confirmação dessas hipóteses.

Uma vez que a DCM e o tempo de cultivo foram estatisticamente similares para os três tratamentos, os outros parâmetros de crescimento (taxa de crescimento específico $-\mu$, número de duplicações por dia e tempo de duplicação) também não diferiram estatisticamente (Tabela 8).

Figura 36 - Aumento da densidade celular (células mL^{-1}) durante o cultivo de *Chlamydomonas* sp.1. Cada linha refere-se a média entre quatro repetições de cada tratamento. T1-Meio TAP; T2-50% Efluente; T3-100% Efluente.

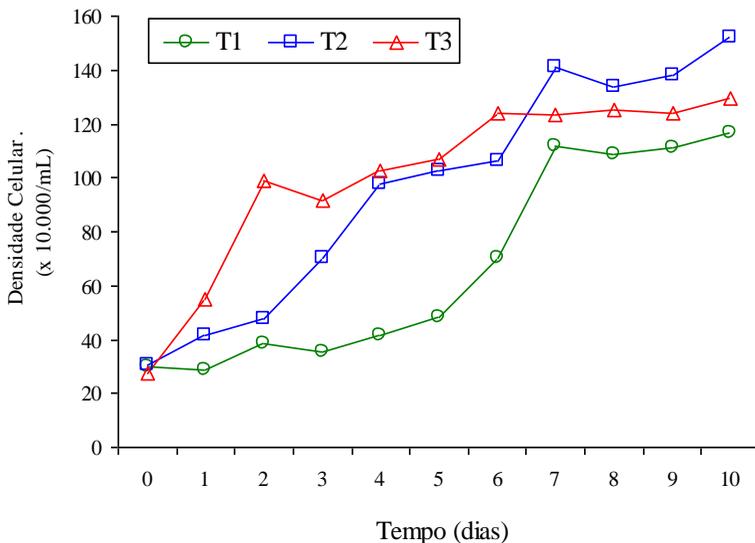


Tabela 8 - Valores de Densidade Celular Máxima (DCM), Tempo de Cultivo, Velocidade de Crescimento (k), Tempo de Duplicação, Taxa de Crescimento Específico (μ) e Produtividade nos diferentes tratamentos (Experimento E2).

Parâmetro de Crescimento	Tratamento1 (Meio TAP)	Tratamento2 (50% Eflu.)	Tratamento 3 (100% Eflu.)
DCM (10^4 cél. mL^{-1})	$121 \pm 28,4$ a	$154 \pm 12,6$ a	$134 \pm 17,8$ a
Tempo de Cultivo (dias)	$9,25 \pm 1,5$ a	$8,75 \pm 1,5$ a	$8 \pm 1,6$ a
Velocidade de Crescimento – k	$0,23 \pm 0,04$ a	$0,27 \pm 0,04$ a	$0,28 \pm 0,09$ a
Tempo de Duplicação (dias)	$4,4 \pm 0,98$ a	$3,7 \pm 0,53$ a	$3,8 \pm 1,27$ a
Taxa de Crescimento Específico- μ (dia^{-1})	$0,50 \pm 0,09$ a	$0,56 \pm 0,09$ a	$0,60 \pm 0,15$ a
Produtividade ($\text{g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$)	$0,14 \pm 0,01$ a	$0,17 \pm 0,02$ b	$0,14 \pm 0,02$ a

Valores expressos como média \pm desvio padrão.

Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas.

Em comparação com dados encontrados na literatura, a espécie isolada na presente pesquisa apresentou crescimento compatível. Tang et al. (2011), ao cultivar *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella pyrenoidosa*, também Chlorophyta, em meio de cultura sintético, em temperatura de 25°C e pH 7, sem adição de CO_2 , relatam uma taxa de crescimento específico (μ) de 0,5 e 0,6 respectivamente. Os mesmos autores relatam que as mesmas espécies (*S. obliquus* e *C. pyrenoidosa*), quando cultivadas nas mesmas condições descritas acima, mas com a adição de 5% (v v^{-1}) de CO_2 nas culturas, apresentam, ambas, uma taxa de crescimento específico de 0,9 (TANG et al., 2011). Já Chiu et al. (2009), cultivando a microalga marinha da divisão Heterokontophyta, *Nannochloropsis oculata*, em meio F/2, em uma temperatura de 26°C e

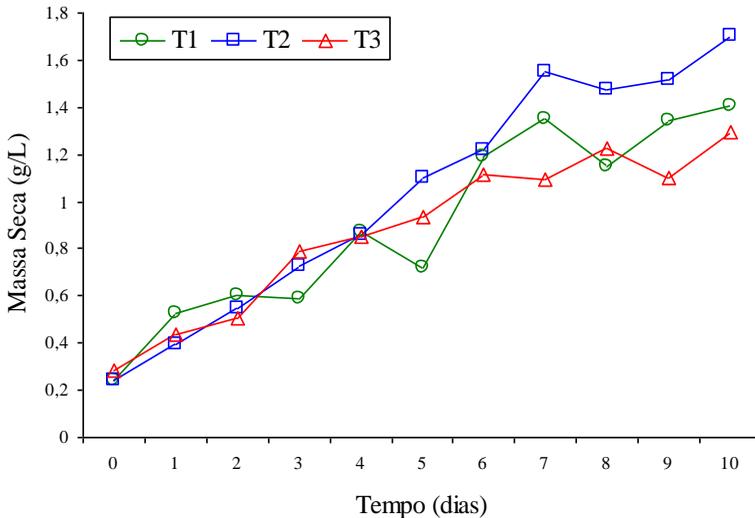
pH 7,8, sem enriquecimento de CO₂ e com adição de 2% (v v⁻¹) CO₂, apresentou uma taxa de crescimento específico de 0,19 e 0,57, respectivamente. No Brasil, Radmann et al. (2011) cultivaram microalgas isoladas de lagoas de tratamento de efluentes com alta alcalinidade e pH 10. Esses autores relatam que as microalgas que apresentaram melhor resultado de crescimento foram cultivadas com a adição de 12% (v v⁻¹) de CO₂ em temperatura de 30°C em pH entre 8 e 9. Essas microalgas foram: *Spirulina* sp., *S. obliquus* e *Chlorella vulgaris*, as três alcançando uma taxa de crescimento específico de 0,2, e um tempo de duplicação próximo a 3 dias. Sendo assim, é possível que a *Chlamydomonas* sp.1 isolada neste trabalho possa crescer mais eficientemente com o aumento da introdução de CO₂ nos cultivos. Contudo, os dados alcançados neste trabalho com adição de 1% (v v⁻¹) de CO₂ são satisfatórios comparados com os dados descritos acima.

4.2.2 Produtividade

As unidades experimentais foram inoculadas com uma massa seca inicial média de 0,25 ± 0,02 g L⁻¹. O Tratamento 2 (T2) foi o que apresentou maior massa seca, alcançando a média de 1,7 ± 0,07g L⁻¹. Já os tratamentos 1 (T1) e 3 (T3) não apresentaram diferença significativa, alcançando a média de 1,4 ± 0,14 g L⁻¹ e 1,3 ± 0,19 g L⁻¹ respectivamente (Figura 37). Quanto à produtividade em g L⁻¹ dia⁻¹, considerando que todos os tratamentos apresentaram estatisticamente o mesmo tempo de cultivo, a adição de 50% de efluente doméstico ao meio de cultura TAP resultou no maior valor, conforme descrito na Tabela 8.

Contrapondo os dados apresentados na Figura 36, a Figura 37 demonstra que durante os primeiros dias de cultivo não houve diferença na velocidade de aumento da massa seca, indicando que pode ter ocorrido diferença de volume celular entre os tratamentos. No entanto, no presente trabalho não foi realizada a avaliação do volume celular. O resultado sugere que algum fator existente no efluente aumenta a multiplicação das células de *Chlamydomonas* sp. durante os primeiros dias nos tratamentos T2 e T3, embora diminua o seu volume celular. Já as células de *Chlamydomonas* sp.1 quando cultivadas em meio TAP (T1), supõe-se que aumentam o seu volume celular durante os primeiros dias e se dividem, diminuindo o volume celular a partir do quinto dia de cultivo.

Figura 37 - Aumento da massa seca (g L^{-1}) durante o cultivo de *Chlamydomonas* sp.1. Cada linha refere-se a média entre quatro repetições de cada tratamento. T1 - Meio TAP; T2 - 50% Efluente; T3 - 100% Efluente.

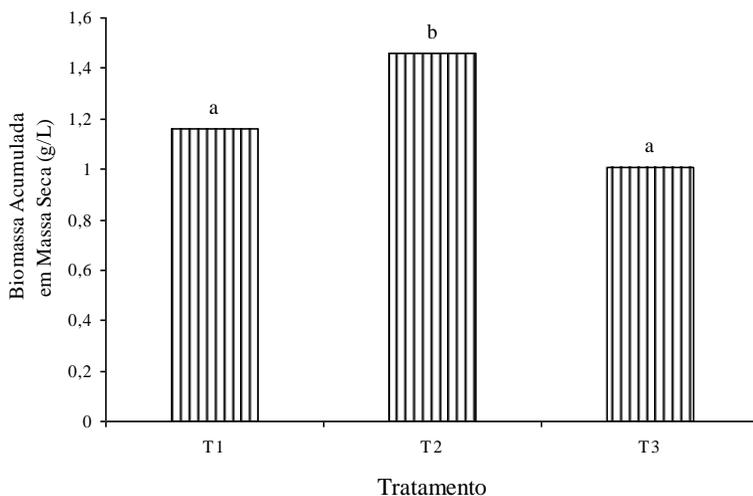


Tang et al. (2011), em cultivos de *S. obliquus* sem a adição de CO_2 e com a adição de 5% (v v^{-1}) de CO_2 , relatam uma concentração máxima de biomassa em massa seca de $1,05 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$ e $1,80 \pm 0,02 \text{ g.L}^{-1}$ respectivamente. Os mesmos autores relatam uma concentração máxima de biomassa em massa seca para *C. pyrenoidosa* quando cultivada sem a introdução de CO_2 e com 5% (v v^{-1}) de CO_2 de $0,87 \pm 0,01$ e $1,44 \pm 0,01$ respectivamente. Quanto à produtividade alcançada nas mesmas condições descritas acima para *S. obliquus* e *C. pyrenoidosa*, os autores relatam valores máximos alcançado de $0,08 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (0,038% CO_2), $0,15 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (5% CO_2) e $0,06 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (0,03% CO_2), $0,13 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (5% CO_2) respectivamente. Chiu et al. (2009) relatam uma concentração máxima de biomassa em massa seca de *N. oculata* de $1,2 \text{ g L}^{-1}$ quando cultivada em meio de cultura sintético, 26°C , sob a introdução de 2% (v v^{-1}) de CO_2 . Yoo et al. (2009) relatam uma produtividade de $0,21 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e $0,10 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ para cultivos das microalgas *Scenedesmus* sp. e *Chlorella vulgaris*

respectivamente, quando cultivadas em meio sintético (BG11), em 25°C, sob a introdução de 10% (v v⁻¹) CO₂. Já Radmann et al. (2011) relatam uma produtividade para *Spirulina* sp. *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella vulgaris* de 0,08 g L⁻¹ dia⁻¹, 0,05 g L⁻¹ dia⁻¹ e 0,08 g L⁻¹ dia⁻¹ respectivamente. Os resultados alcançados de massa seca e de produtividade nas culturas de *Chlamydomonas* sp. utilizadas nesta pesquisa demonstram que esta espécie, quando cultivada em efluente tratado como meio de cultura, pode ser uma alternativa para produção de biomassa microalgal de baixo custo.

A biomassa acumulada em gramas de massa seca por litro de cultura não apresentou diferença significativa entre os cultivos em meio TAP (T1) e em 100% efluente tratado (T3), ambos inferiores ao cultivo em meio TAP com adição de 50% efluente (T2) (Figura 38).

Figura 38 - Biomassa acumulada durante o cultivo, representada em massa seca (g L⁻¹) (Experimento E2). Cada barra refere-se a média entre quatro repetições de cada tratamento (Experimento E2). T1-Meio TAP; T2-50% Efluente; T3-100% Efluente. Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas.



Embora não tenha havido diferença significativa entre a densidade celular encontrada nos três tratamentos, o Tratamento 2 apresentou a maior biomassa acumulada. Este fato sugere que a adição de 50% de efluente tratado ao meio de cultura TAP influenciou o volume celular final e/ou a composição bioquímica final, consequentemente alterando a densidade (massa) média das células. Possivelmente, a presença de carbono orgânico e/ou outros compostos encontrados no efluente doméstico tratado, em conjunto com a maior concentração de nutrientes presentes no meio TAP, proporcionou o crescimento mixotrófico (combinação de CO₂ e substrato orgânico como fontes de carbono) (OHSE et al., 2007). Em outra hipótese, o Tratamento 2, ao diluir o efluente com o meio de cultura TAP, diminuiu a concentração de algum nutriente disponível no efluente capaz de inibir o aumento da massa seca, embora tenha mantido uma concentração de nutrientes capaz de resultar em maior massa seca que as culturas cultivadas em meio TAP (T1), as quais apresentaram crescimento estritamente autotrófico. Jiang, et al. (2011) relatam que o meio de cultura composto pela adição de 50% de efluente doméstico à água salgada, proporciona uma maior biomassa final para *Nannochloropsis* sp. do que quando cultivada em meio sintético convencional, meio F/2, atingindo valores de 0,21 g L⁻¹ e 0,16 g L⁻¹ respectivamente. Esses autores atribuem o maior acúmulo de biomassa à presença de maior concentração de carbono orgânico, o que promove o crescimento mixotrófico nas culturas. Os autores também relatam que a concentração dos nutrientes influenciou na composição bioquímica das microalgas cultivadas.

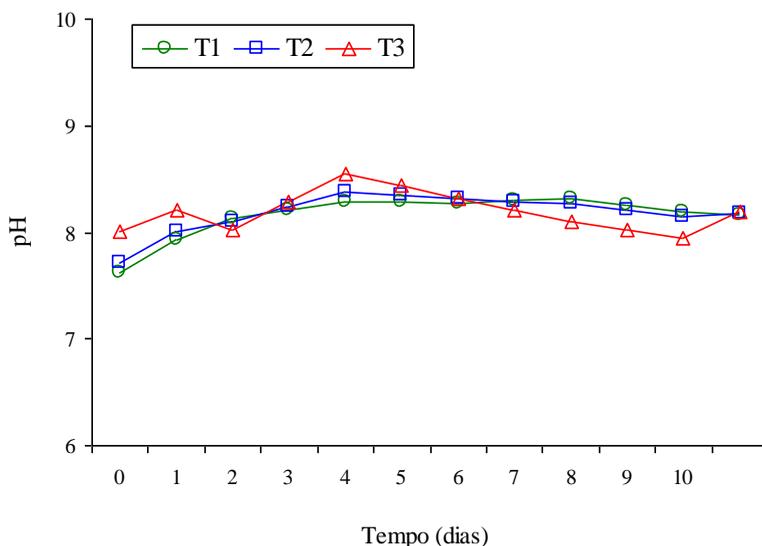
4.2.3 pH

Os valores médios do pH, medidos diariamente após o início dos cultivos, são apresentados na Figura 39. O pH inicial do meio de cultura composto por 100% de efluente doméstico tratado (T3) foi ligeiramente superior ($8,0 \pm 0,2$) ao pH do meio de cultura TAP (T1) ($7,6 \pm 0,1$), tendo o pH inicial do Tratamento 2 apresentado um valor intermediário. Os valores de pH apresentam tendência de variação discreta para todos os tratamentos, obtendo um valor médio de pH ao longo do cultivo de $8,1 \pm 0,1$ nos três tratamentos.

Apesar da adição de ar enriquecido contendo 1% (v v⁻¹) de CO₂, não houve redução do pH, provavelmente, devido ao elevado poder

tampão encontrado nos meios de cultura utilizados na presente pesquisa. A Figura 39 demonstra que os tratamentos que continham meio de cultura TAP (T1 e T2) apresentaram uma menor oscilação do pH, provavelmente, devido à presença de Base Tris no meio, aumentando o seu poder tampão. A sutil elevação do pH nos primeiros dias de cultivo sugere o aumento da produtividade fotossintética.

Figura 39 - Variação do pH durante o desenvolvimento das culturas (Experimento E2). Cada linha refere-se a média entre quatro repetições de cada tratamento. T1 - Meio TAP; T2 - 50% Efluente; T3 - 100% Efluente.



4.2.4 Turbidez

Os valores médios de turbidez medidos diariamente, após o início dos cultivos, são apresentados na Figura 40. Os resultados estão de acordo com os apresentados no gráfico de variação da massa seca durante o desenvolvimento das culturas, apresentado na Figura 37, o que reforça a hipótese de variação do volume celular entre os tratamentos.

Através da análise de regressão das linhas geradas pela relação entre a massa seca e a turbidez, as seguintes equações foram encontradas:

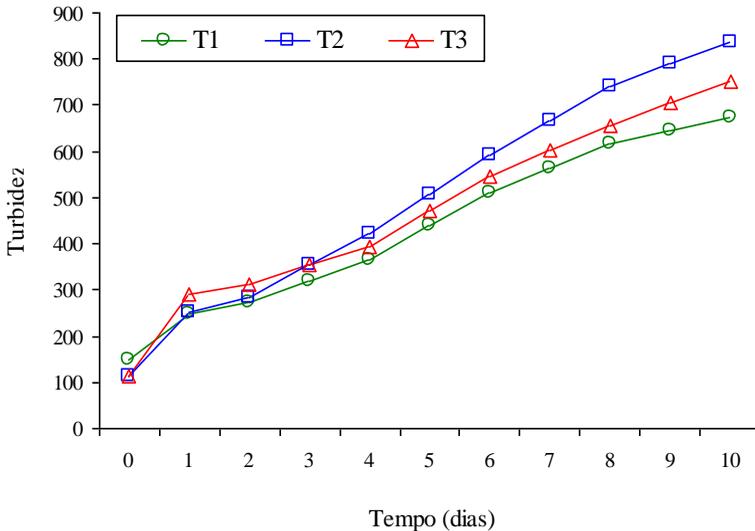
$$y=0,002x+0,0278 \quad (r^2 = 0,9607) \quad (14)$$

$$y=0,002x+0,0006 \quad (r^2 = 0,9989) \quad (15)$$

$$y=0,0017x+0,0898 \quad (r^2 = 0,9677) \quad (16)$$

As equações 14, 15 e 16 são referentes aos tratamentos T1, T2 e T3, respectivamente. Nas equações, y equivale à massa seca (g L^{-1}) e x equivale à turbidez. Através do coeficiente de regressão linear (r^2), presume-se que a utilização dos dados de turbidez para o acompanhamento da produtividade nos cultivos de *Chlamydomonas* sp.1 isolada nesta pesquisa é confiável.

Figura 40 - Variação da turbidez em unidades nefelométricas durante o desenvolvimento das culturas (Experimento E2). Cada linha refere-se a média entre quatro repetições de cada tratamento. T1 - Meio TAP; T2 - 50% Efluente; T3 - 100% Efluente.



4.2.5 Conclusões referentes ao Experimento E2

A microalga *Chlamydomonas* sp.1 apresentou potencial de crescimento quando cultivada em efluente doméstico tratado, como meio de cultura alternativo. Não houve influência significativa do efluente sobre o crescimento das culturas, quando comparadas ao meio de cultura sintético (meio TAP).

O uso do meio TAP, com adição de 50% do efluente estudado, apresentou o maior acúmulo de biomassa, atingindo uma massa seca de $1,7 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$. Esta espécie, quando cultivada diretamente no efluente (100%), atingiu uma massa seca de $1,4 \pm 0,14 \text{ g L}^{-1}$. O uso do efluente como meio de cultura alternativo mostrou-se eficiente. Portanto, pode ser uma alternativa interessante para baixar o custo de produção de biomassa microalgal.

4.3 Experimento 3: Efeito da introdução de diferentes concentrações de CO₂ nos cultivos de *Chlamydomonas* sp.1, isolada de lixiviado de aterro sanitário.

Os resultados deste experimento foram submetidos à publicação na Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental – AGRIAMBI (Qualis B2 na área Engenharias I), com exceção dos resultados descritos nos itens 4.3.3.1 e 4.3.6. Estes resultados serão submetidos à Revista Bioresource Technology (Qualis A1 na área Engenharias I), após contribuições da banca de avaliação desta tese.

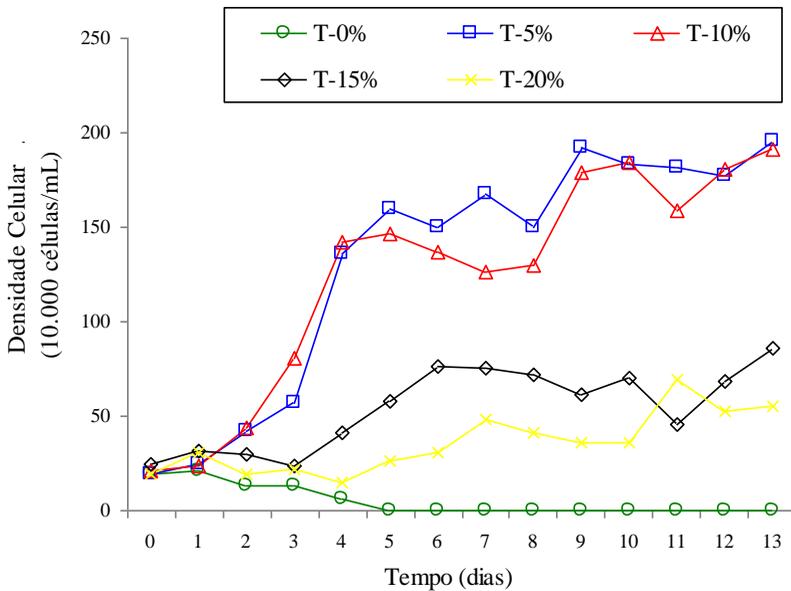
4.3.1 Parâmetros de Crescimento

A determinação da densidade celular, em intervalos de 24 horas após o início das culturas, possibilitou o estabelecimento da curva de crescimento para cada unidade experimental. Na Figura 41 estão apresentados os valores de densidade celular ao longo dos dias de cultivo para cada tratamento (média entre três repetições).

Os parâmetros de crescimento determinados para *Chlamydomonas* sp.1 foram dependentes das concentrações de CO₂ introduzidas nos cultivos. As culturas que receberam a introdução de ar

enriquecido com 5 e 10% de CO_2 (v v^{-1}) (ou sejam, T-5% e T-10%) alcançaram maior densidade celular, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre estas. Já as culturas que receberam introduções de ar enriquecido com 15 e 20% de CO_2 (v v^{-1}), resultaram em uma menor densidade celular, não havendo diferenças significativas entre estas. No tratamento em que não houve enriquecimento com CO_2 (T-0%) as microalgas não sobreviveram.

Figura 41 - Aumento da densidade celular (células mL^{-1}) durante o cultivo de *Chlamydomonas* sp.1. Cada linha refere-se a média entre três repetições de cada tratamento. T-0% -introdução de 0,03% (v v^{-1}) de CO_2 ; T-5% -introdução de 5% (v v^{-1}) de CO_2 ; T-10% -introdução de 10% (v v^{-1}) de CO_2 ; T-15% -introdução de 15% (v v^{-1}) de CO_2 ; T-20% -introdução de 20% (v v^{-1}) de CO_2 .



Tang et al. (2011) cultivando *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella pyrenoidosa*, também Chlorophyta, em meio de cultura sintético, em temperatura de 25 °C e pH 7, em concentrações de CO_2 que variaram entre 0,038, 5, 10, 20, 30 e 50% (v v^{-1}), relataram resultados semelhantes ao presente estudo. Estes autores também descrevem que

ambas as espécies apresentaram maior crescimento quando cultivadas em concentrações de 5 e 10% CO₂.

A densidade celular máxima e o tempo de cultivo, representado pelo tempo entre as culturas serem inoculadas e alcançarem a DCM, nos tratamentos T-5%, T-10%, T-15% e T-20% estão descritos na Tabela 9. Estes parâmetros não foram calculados para o tratamento T-0% por não ter havido crescimento das culturas. As culturas com enriquecimento de 5 e 10% (v v⁻¹) de CO₂ apresentaram maior DCM. Entretanto, os tempos de cultivo para os quatro tratamentos que receberam enriquecimento de CO₂ não apresentaram diferenças significativas, sendo a média do tempo de cultivo entre estes tratamentos de 11,08 ± 1,25 dias.

Tabela 9 - Valores de Densidade Celular Máxima (DCM), Tempo de Cultivo, Velocidade de Crescimento (k), Tempo de Duplicação, Taxa de Crescimento (μ) e Produtividade nos diferentes tratamentos (Experimento E3).

Parâmetro de Crescimento	T-5%	T-10%	T-15%	T-20%
DCM (10 ⁴ céL.mL ⁻¹)	216±16 a	199±17 a	99±28 b	77±8 b
Tempo de Cultivo (dias)	10,6±1,1 a	11,3±1,5 a	11,6±2,0 a	12,6±1,1 a
Velocidade de Crescimento - k	0,33±0,06 a	0,29±0,07 ab	0,18±0,05 bc	0,15±0,04 c
Tempo de Duplicação (dias)	3,06±0,6 a	3,53±0,8 ab	5,86±1,6 bc	6,62±1,7 c
Taxa de Crescimento Específico - μ - (d ⁻¹)	0,49±0,04 a	0,46±0,06 ab	0,37±0,08 bc	0,32±0,02 c
Produtividade (g L ⁻¹ dia ⁻¹)	0,13±0,01 a	0,13±0,01 a	0,08±0,02 b	0,07±0,01 b

Médias ± desvio padrão seguidas de mesmas letras minúsculas não diferem entre si a nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Os melhores resultados referentes aos parâmetros de velocidade de crescimento, tempo de duplicação e taxa de crescimento específico, foram encontrados nas culturas enriquecidas com 5% de CO₂ (v v⁻¹). Conforme as concentrações de CO₂ aumentaram, houve diminuição nos

valores de velocidade de crescimento e taxa de crescimento específico, e aumento nos valores de tempo de duplicação. Ou seja, com o aumento da concentração de CO₂, as culturas tenderam a apresentar piores resultados de crescimento. Estatisticamente, para estes três parâmetros de crescimento, T-5% não diferiu de T-10%, assim como este não diferiu de T-15%, o qual não diferiu de T-20%. No entanto, T-5% apresentou valor superior aos tratamentos T-15% e T-20%, e T-10% superior à T-20% (Tabela 9).

Segundo Chiu et al. (2009) a microalga marinha da divisão Heterokontophyta, *Nannochloropsis oculata*, em meio F/2 Guillard (ANDERSEN, 2005) em uma temperatura de 26°C, pH 7,8 e concentração de inóculo de 0,01 g L⁻¹, apresentou maior taxa de crescimento específico ($\mu = 0,57 \text{ d}^{-1}$) quando cultivada com enriquecimento de 2% (v v⁻¹) de CO₂ em comparação com a introdução de ar não enriquecido (0,19 d⁻¹). Enquanto isso, os cultivos com concentrações de 5, 10 e 15% tiveram o crescimento completamente inibido. Contrapondo estes resultados, Jiang et al. (2011) relatam que *Nannochloropsis* sp. quando cultivada em água salgada com a adição de 50% efluente doméstico, apresentou adequado crescimento sob a introdução de 15% (v v⁻¹) de CO₂, obtendo taxa de crescimento específico de 0,52 d⁻¹. Estes autores atribuem a tolerância à alta concentração de CO₂ devido à utilização de um inóculo mais concentrado (0,17 g L⁻¹). Conforme Yoo et al. (2010) o aumento da concentração do inóculo pode elevar a capacidade de crescimento de microalgas cultivadas sob altas concentrações de CO₂. No presente estudo, foi utilizado um inóculo com concentração de 0,17 ± 0,01 g L⁻¹ (18 ± 2 10⁴ cél. mL⁻¹). É possível que este fator tenha favorecido a maior tolerância às elevadas concentrações de CO₂ utilizadas, no entanto não foi suficiente para apresentarem adequado crescimento em concentrações acima de 15% (v v⁻¹).

Tang et al. (2011) cultivando *S. obliquus* e *C. pyrenoidosa* sob as condições descritas anteriormente, corroboram com o presente estudo. Estes autores relatam que as maiores taxas de crescimento específico foram encontradas nos cultivos com enriquecimento de 5% e 10% (v v⁻¹) de CO₂, apresentando valores médios de 0,9 d⁻¹. Radmann et al. (2011) cultivaram as microalgas *S. obliquus* e *Chlorella vulgaris* com a adição de 12% (v v⁻¹) de CO₂ durante o período de luz (12:12), temperatura de 30°C e pH entre 8 e 9. Este autores relatam que as microalgas apresentaram taxa de crescimento específico (μ) de 0,2 d⁻¹.

4.3.2 Produtividade

As unidades experimentais foram inoculadas com uma massa seca inicial média de $0,17 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$. Neste experimento, os tratamentos T-5% e T-10% foram os que apresentaram maior massa seca ao final do experimento, alcançando as médias de $1,42 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$ e $1,49 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente. Estes valores não apresentaram diferença significativa entre si. Já os tratamentos T-15% e T-20% alcançaram as médias de $1,00 \pm 0,23 \text{ g L}^{-1}$ e $0,79 \pm 0,14 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente, ambos não diferentes entre si estatisticamente, porém, inferiores aos tratamentos T-5% e T-10% (Figura 42). Estes resultados são semelhantes ao alcançados por Tang et al. (2011). Estes autores, em cultivos de *C. pyrenoidosa*, relatam que os maiores valores de massa seca foram encontrados nas concentrações de 5 e 10% (v v^{-1}) CO_2 , atingindo os valores de $1,44 \pm 0,01$ e $1,55 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente. Já em concentrações de 0,03 e 20% (v v^{-1}) CO_2 , os valores máximos atingidos foram de $0,87 \pm 0,01$ e $1,22 \pm 0,08 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente. Os mesmos autores, em cultivos de, *S. obliquus*, relatam que os maiores valores de massa seca foram alcançados em concentrações de 5 e 10% (v v^{-1}) CO_2 ($1,80 \pm 0,02$ e $1,80 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente), alcançando valores máximos menores em concentrações de 0,03 e 20% (v v^{-1}) de CO_2 ($1,05 \pm 0,02$ e $1,65 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente).

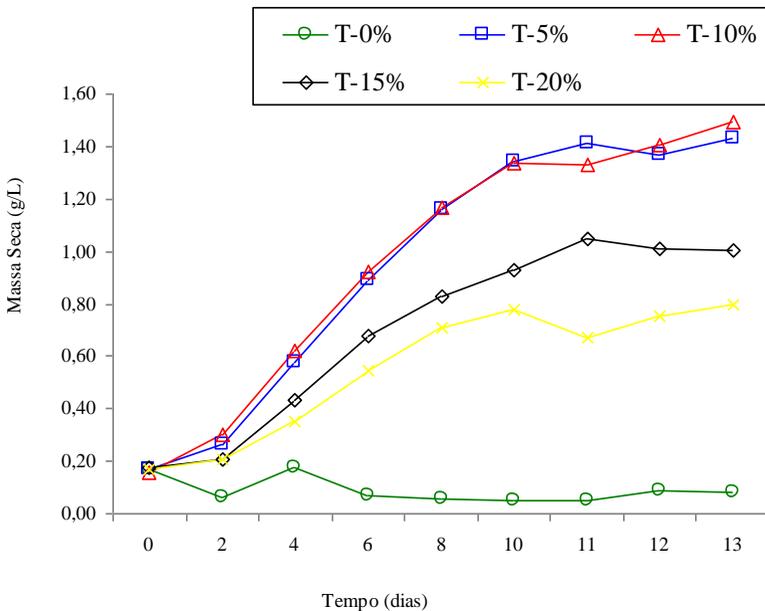
A produtividade obtida nesta pesquisa, em $\text{g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, é apresentada na Tabela 9. Os cultivos com introdução de 5 e 10% (v v^{-1}) de CO_2 apresentaram produtividades médias de $0,13 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. Com o aumento da concentração de CO_2 para 15 e 20% (v v^{-1}) houve diminuição deste parâmetro.

Tang et al. (2011) relatam produtividades de $0,08 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (0,03% v v^{-1} CO_2), $0,15 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (5 e 10% v v^{-1} CO_2) e $0,13 \text{ g L}^{-1}$ (20% v v^{-1} de CO_2) para *S. obliquus*, enquanto para *C. pyrenoidosa*, relatam valores de $0,06 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (0,03% v v^{-1} CO_2), $0,13 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (5% v v^{-1} CO_2), $0,14 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (10% v v^{-1} CO_2) e $0,12 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (20% v v^{-1} CO_2). Yoo et al. (2010) relatam produtividades de $0,21 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e $0,10 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ em cultivos de *Scenedesmus* sp. e *Chlorella vulgaris* respectivamente, quando cultivadas em meio sintético (BG11), em 25 °C, sob a introdução de 10% (v v^{-1}) de CO_2 . Radmann et al. (2011) relatam produtividades de $0,05 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e $0,08 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ em culturas de *S. obliquus* e *C. vulgaris*, respectivamente, cultivadas sob a

introdução de gás contendo 12% ($v v^{-1}$) de CO_2 , 60 $mg L^{-1}$ de dióxido de enxofre (SO_2) e 100 $mg L^{-1}$ de óxido nítrico (NO).

Os resultados obtidos na presente pesquisa demonstram que a microalga *Chlamydomonas* sp.1 apresenta uma produtividade adequada, quando cultivada em efluente doméstico tratado, com introdução de elevadas concentrações de CO_2 . Em caso de enriquecimento do ar atmosférico com CO_2 não se faz necessário obter concentrações maiores que 5% ($v v^{-1}$). No entanto, em caso de utilização de emissões atmosféricas como alternativa de baixo custo para produção de biomassa microalgal, emissões com concentrações de 10, 15 e 20% ($v v^{-1}$) de CO_2 podem ser utilizadas, sendo a primeira a mais indicada. Contudo, para a utilização dessas emissões, estudos de cultivo desta espécie sob a introdução de elevadas concentrações de CO_2 em conjunto com outros gases como SO_2 e NO_x , são necessários.

Figura 42 - Aumento da massa seca ($g L^{-1}$) durante o cultivo de *Chlamydomonas* sp.1. Cada linha refere-se a média entre três repetições de cada tratamento. T-0% -introdução de 0,03% ($v v^{-1}$) de CO_2 ; T-5% -introdução de 5% ($v v^{-1}$) de CO_2 ; T-10% -introdução de 10% ($v v^{-1}$) de CO_2 ; T-15% -introdução de 15% ($v v^{-1}$) de CO_2 ; T-20% -introdução de 20% ($v v^{-1}$) de CO_2 .



4.3.3 Avaliação da Fixação de Carbono

Os tratamentos T-5% e T-10% apresentaram valores de RF_{CO_2} (taxa de biofixação de CO_2) de $0,244 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, enquanto T-15% e T-20% apresentaram os valores de $0,150$ e $0,132 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, respectivamente. Sydney et al. (2010) relatam que as microalgas *C. vulgaris*, *Botryococcus braunii* e *Dunaliella tertiolecta* quando cultivadas em meio sintético sob a introdução de 5% ($v v^{-1}$) CO_2 a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e fotoperíodo (12:12), apresentaram taxas de biofixação de CO_2 de $0,251$, $0,496$ e $0,272 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, respectivamente. Esta pesquisa demonstra que o cultivo da microalga *Chlamydomonas* sp.1 em efluente doméstico tratado, como meio de cultura, utilizando emissões atmosféricas com elevadas concentrações de CO_2 pode ser uma alternativa para diminuir as emissões deste gás diretamente para a atmosfera. Isto é válido mesmo para os tratamentos T-15% e T-20%, apesar de terem apresentado resultados inferiores.

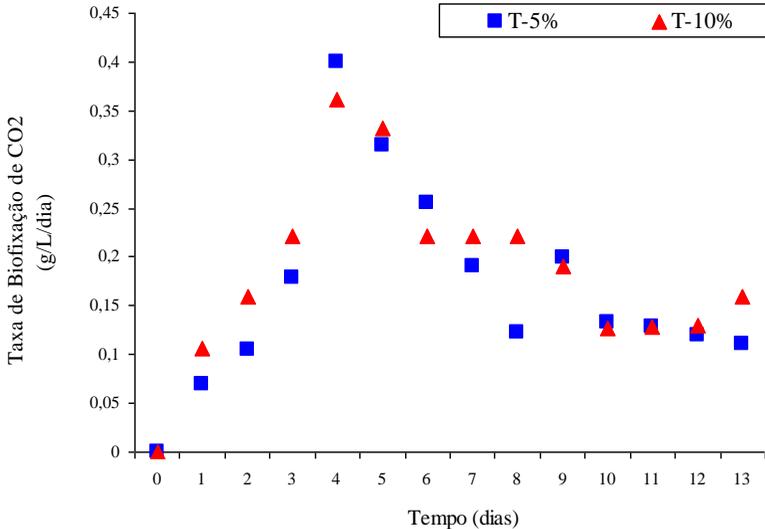
Segundo Cheng et al. (2006) fatores como intensidade de luz, densidade do cultivo e concentração de dióxido de carbono injetado nas culturas podem influenciar na atividade fotossintética e inibir a biofixação de CO_2 . Ho et al. (2012) estudaram o efeito da intensidade de luz sobre a taxa de biofixação de CO_2 , em cultivos de *S. obliquus*, e relatam que esta taxa é proporcional ao aumento da intensidade de luz até valores próximos a $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Jacob-Lopes et al. (2008) cultivaram a cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli em temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e sob a introdução de 15% ($v v^{-1}$) de CO_2 . A RF_{CO_2} alcançada foi de $0,082$ e $0,151 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ quando cultivadas em intensidade luminosa de 40 e $122 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. Porém, os mesmos autores quando elevaram a temperatura para $35 \text{ }^\circ\text{C}$, relatam o aumento da RF_{CO_2} para $0,595$ e $1,098 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. Estes autores descrevem que a taxa de biofixação de CO_2 é controlada por fatores como intensidade luminosa, temperatura e pela própria concentração de CO_2 , de modo que para aumentar a taxa de biofixação de CO_2 deve-se manter o cultivo sob elevadas intensidades luminosas, temperaturas medianas e sob a injeção de baixas concentrações de CO_2 .

As maiores taxas de biofixação de CO_2 (RF_{CO_2}) alcançadas em um único dia ocorreram nos cultivos sob concentrações de 5 e 10% ($v v^{-1}$) de CO_2 (T-5% e T-10%), as quais estão descritas na Figura 43. Estes apresentaram os valores máximos no quarto dia de cultivo, sendo $0,40$ e $0,36 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, respectivamente. Já para os tratamentos

T-15% e T-20%, os valores máximos da RF_{CO_2} , descritos na Figura 44, foram alcançados no quinto dia de cultivo e ficaram abaixo de $0,29 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, sendo $0,28 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ nos cultivos sob concentrações de 15% ($v v^{-1}$) de CO_2 e $0,22 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ nos cultivos sob concentrações de 20% ($v v^{-1}$) de CO_2 . Estes resultados estão de acordo com Tang et al. (2011), os quais relatam que as taxas máximas de biofixação de CO_2 em cultivos de *S. obliquus* e *C. pyrenoidosa* foram atingidas em concentrações de 5 e 10% ($v v^{-1}$) de CO_2 introduzido constantemente, a uma vazão de 0,25 vvm, sendo os valores de $0,286 \pm 0,007$ e $0,288 \pm 0,004 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, respectivamente para a primeira espécie, e de $0,244 \pm 0,020$ e $0,260 \pm 0,007 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, respectivamente para a segunda espécie. Estes cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer com capacidade de 1L, intensidade de luz de $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e temperatura de $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

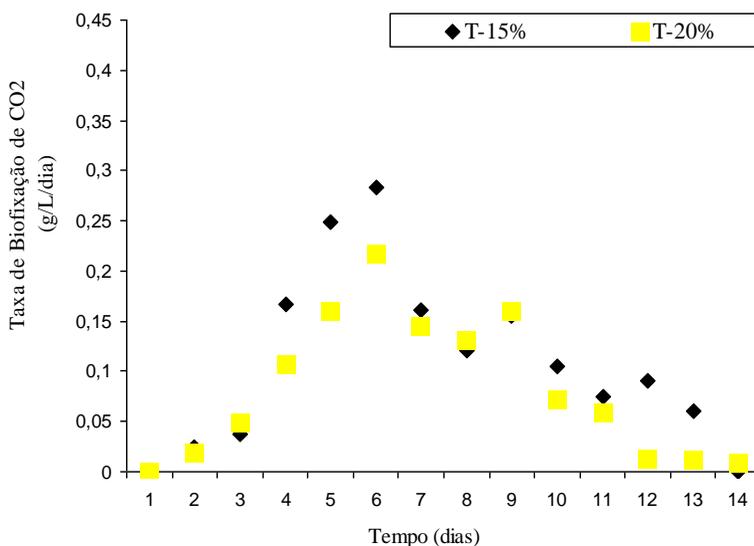
Figura 43 - Taxa de biofixação de CO_2 (Experimento E3) durante o desenvolvimento das culturas para os tratamentos T-5% (introdução de 5% $v v^{-1}$ de CO_2) e T-10% (introdução de 10% $v v^{-1}$ de CO_2). Cada ponto refere-se a média entre três repetições.



O fato de as maiores taxas de biofixação de CO_2 terem sido alcançadas entre o terceiro e sexto dia de cultivo, ocorre devido às

culturas estarem em fase exponencial durante estes dias (Figura 41). Já nos dias anteriores, as culturas estão em fase de adaptação às novas condições ambientais (densidade celular, exposição à luz, concentração de CO_2). Nos dias posteriores, as culturas diminuem a eficiência fotossintética em decorrência da diminuição da concentração de nutrientes disponíveis e diminuição da exposição à luz, causada pelo autossombreamento. A maior densidade celular encontrada no final do cultivo favorece a coagulação das células, fato que reduz a disponibilidade de CO_2 e nutrientes para as mesmas (MUNOZ et al., 2004; JACOB-LOPES, et al., 2009).

Figura 44 - Taxa de biofixação de CO_2 (Experimento E3) durante o desenvolvimento das culturas para os tratamentos T-15% (introdução de 15% v^{-1} de CO_2) e T-20% (introdução de 20% v^{-1} de CO_2). Cada ponto refere-se a média entre três repetições.



Uma forma possível de evitar os problemas relacionados à adaptação das células recém inoculadas e ao autosobreamento no final do cultivo, é através de cultivos semi-contínuos, mantendo as culturas sempre em fase exponencial (MORAIS et al., 2009). Nesse caso, hipoteticamente, se a microalga *Chlamydomonas* sp.1, cultivada nas

condições propostas nesta pesquisa sob a introdução de 5% (v v⁻¹) de CO₂, ser diariamente diluída, a partir do quarto dia de cultivo, para a concentração encontrada no terceiro dia de cultivo, seria biofixado um total de 146 kg de CO₂ por metro cúbico de meio de cultura por ano. Entretanto, testes futuros devem ser executados para avaliar a interferência de outros fatores, como a adaptação das microalgas e a contaminação por outros organismos em sistemas semi-contínuos.

Em cultivos intermitentes, como o realizado na presente pesquisa, os problemas descritos acima, de autossombreamento e coagulação das células, podem ser minimizados com uma adequada homogeneização das culturas. Neste sentido, a vazão do ar de entrada no reator influencia, além da transferência de massa, a homogeneização da cultura. Quando a vazão é baixa, o crescimento das culturas é prejudicado devido à pobre transferência de massa e a baixa homogeneização, causando problemas com a sedimentação das células, baixa disponibilidade de nutrientes e luz. Por outro lado, em vazões elevadas, as células podem ser danificadas pela alta turbulência (MERCHUCK et al., 2007).

4.3.3.1 Eficiência de utilização do CO₂.

A quantidade de dióxido de carbono introduzido ao longo dos 14 dias de cultivo em cada tratamento, bem como a quantidade média de dióxido de carbono removido, mensurada pela Equação 10 (ver Item 3.7) e a quantidade em que foi fixado na biomassa estão descritas na Tabela 10.

A quantidade de CO₂ removido pelos cultivos variou entre 5,9 a 9,38% entre os tratamentos T-5%, T-10%, T-15% e T-20%, não havendo diferenças significativas entre eles. Sendo assim, conforme aumentou a proporção de CO₂ no ar injetado nos cultivo, aumentou a quantidade de CO₂ removido. Entretanto, também aumentou a quantidade de CO₂ liberado pelo cultivo.

Tabela 10 - Quantidade de CO₂ introduzido, removido e biofixado pelos cultivos (Experimento E3) após 14 dias.

Parâmetro	Qtde. CO₂ Introduzido	Qtde. CO₂ Removido		Qtde. CO₂ Biofixado		
	(kg/U.E.)	(kg/U.E.)	(%)	(kg/U.E.)	(%)	(% CO₂ remov.)
T-5%	0,99	0,093	9,38 ± 0,6 a	0,011	1,15	12,24
T-10%	1,98	0,140	7,07 ± 1,5 a	0,012	0,61	8,57
T-15%	2,96	0,175	5,90 ± 3,8 a	0,007	0,25	4,28
T-20%	3,95	0,369	9,35 ± 4,2 a	0,006	0,14	1,51

Como já comentado, a quantidade de CO₂ biofixado, diminuiu com o aumento da concentração de CO₂ para valores acima de 10% (v v⁻¹). A proporção de CO₂ biofixado em relação ao total introduzido no cultivo variou entre 0,14 a 1,15%. Já a proporção de CO₂ biofixado em relação à quantidade média em que foi removido, variou entre 1,5 a 12,24% (Tabela 10). Resultados similares são apresentados por Chiu et al. (2008) e Zeng et al. (2011), o que demonstra uma relação inversa entre a eficiência de utilização de CO₂ e a concentração de CO₂ no ar introduzido no cultivo. Portanto, a quantidade de CO₂ a ser suplementada pode ser diminuída para que se tenha um melhor aproveitamento do CO₂ injetado. Outra alternativa é apontada por Morais e Costa (2007), os quais reportam biofixação média de 28,08% e 13,56% através do cultivo de *S. obliquus* sob a injeção de 6 e 12% (v v⁻¹) de CO₂, respectivamente, ao injetar o ar por 15 minutos a cada 2 horas. Sendo assim, para uma mesma concentração de CO₂, injetaram menor quantidade deste gás, em comparação com a presente pesquisa, onde a injeção de ar no cultivo foi constante. Ainda, estes autores utilizaram reatores em série, para maximizar o aproveitamento do CO₂ perdido (liberado pelo cultivo).

Zheng et al. (2011) pesquisaram a influência da vazão do ar injetado, da concentração de CO₂ e da concentração inicial do cultivo sobre a eficiência de utilização do CO₂ injetado (quantidade de CO₂ biofixado), no cultivo semi-contínuo da microalga (Chlorophyta) *Tetraselmis subcordiformis*. Estes autores relatam que a vazão do ar introduzido nas culturas, a concentração de CO₂ presente e a concentração inicial do inóculo foram determinantes na taxa de biofixação de CO₂. Segundo os mesmos autores, apenas 0,72% do CO₂ injetado foi biofixado pelo cultivo com injeção constante de ar enriquecido com 10% de CO₂ a uma vazão de 0,2 vvm e concentração inicial em massa seca de 0,13 g L⁻¹, resultado similar ao encontrado para a microalga *Chlamydomonas* sp.1 cultivada nesta pesquisa. Entretanto, os resultados obtidos por Zheng et al. (2011) variaram entre 0,60% (condição de cultivo de: 18,37% de CO₂ (v v⁻¹), 0,2 vvm e concentração inicial de 1,80 g L⁻¹) a 10,18% (condição de cultivo de: 1,63% de CO₂ (v v⁻¹), 0,2 vvm e concentração inicial de 1,80 g L⁻¹). Segundo modelagem matemática proposta por estes autores, para obter maior eficiência de utilização do CO₂ injetado, o cultivo deve ter concentração inicial em torno de 0,34 g L⁻¹, e proporção do CO₂ no ar injetado de 2,9% (v v⁻¹) a uma vazão de 0,46 vvm. Nestas condições estes autores relatam o valor máximo de RF_{co2}, o qual foi 1,438 g L⁻¹ dia⁻¹.

Jacob-Lopes et al. (2010), em cultivo de cianobactéria *Aphanotece microscópica Nägeli* sob a injeção constante de 15% (v v⁻¹) de CO₂ a uma vazão de 1 vvm, temperatura de 30 °C, intensidade luminosa de 150 μmol m⁻² s⁻¹, e concentração inicial de 0,1 g L⁻¹, relatam que apenas 3,1% do CO₂ que foi removido pelo cultivo, foi efetivamente convertido em biomassa, resultado que corrobora com a presente pesquisa. Segundo Jacob-Lopes et al. (2010), além da biofixação, existem outras rotas de transformação do CO₂ através dos cultivos.

O CO₂ introduzido reage com a água formando ácido carbônico (H₂CO₃), o qual pode ser dissociado em íons bicarbonato (HCO₃⁻) e hidrogênio (H⁺). O bicarbonato, por sua vez, pode ser dissociado em íons carbonato (CO₃²⁻) e H⁺. Estas reações dependem do pH do cultivo. Quanto mais ácido estiver o meio, maior a proporção de ácido carbônico, enquanto conforme aumenta o pH eleva-se as concentrações de HCO₃⁻ e CO₃²⁻. O somatório das espécies químicas dióxido de carbono (CO₂), ácido carbônico (H₂CO₃), bicarbonato (HCO₃⁻) e carbonato (CO₃²⁻) equivale ao total de carbono inorgânico presente na água (ESTEVES, 1988). Os íons carbonato e bicarbonato podem se associar ao cálcio presente na água e formar carbonato de cálcio, que ao precipitar é capaz de sequestrar o CO₂ introduzido no sistema (ver Item 2.4.2.2). Estas reações ocorrem com maior significância em pH alcalino, onde os íons bicarbonato e carbonato estão presentes em maior quantidade. Em cultivo de microalgas, a remoção de CO₂ através da fotossíntese contribui para a formação de um ambiente mais alcalino, o que pode favorecer a mineralização do carbonato de cálcio (JANSSON; NORTHEM, 2010). Entretanto, na presente pesquisa, não houve a elevação do pH em função das elevadas concentrações de CO₂ injetadas nos cultivos (ver Item 4.3.4 adiante).

Outra possível rota de captura do CO₂ através dos cultivos de microalgas é a biomineralização. As microalgas possuem um mecanismo biofísico denominado mecanismo de concentração de carbono (CCM). Este mecanismo é mediado pela enzima anidrase carbônica (CA), a qual mantém elevadas concentrações de CO₂ no sítio ativo da enzima Rubisco (responsável pela fixação do CO₂ na fotossíntese), fato que evita a fotorrespiração, causada pela afinidade que a enzima Rubisco também possui pelo oxigênio. O CO₂ é convertido em bicarbonato pela CA para que seja possível ser estocado no interior da célula, uma vez que o CO₂ é transportado pela membrana por difusão facilitada. Para que o CO₂ seja fixado pela Rubisco, a CA realiza a reação inversa no interior da célula, que ao converter o

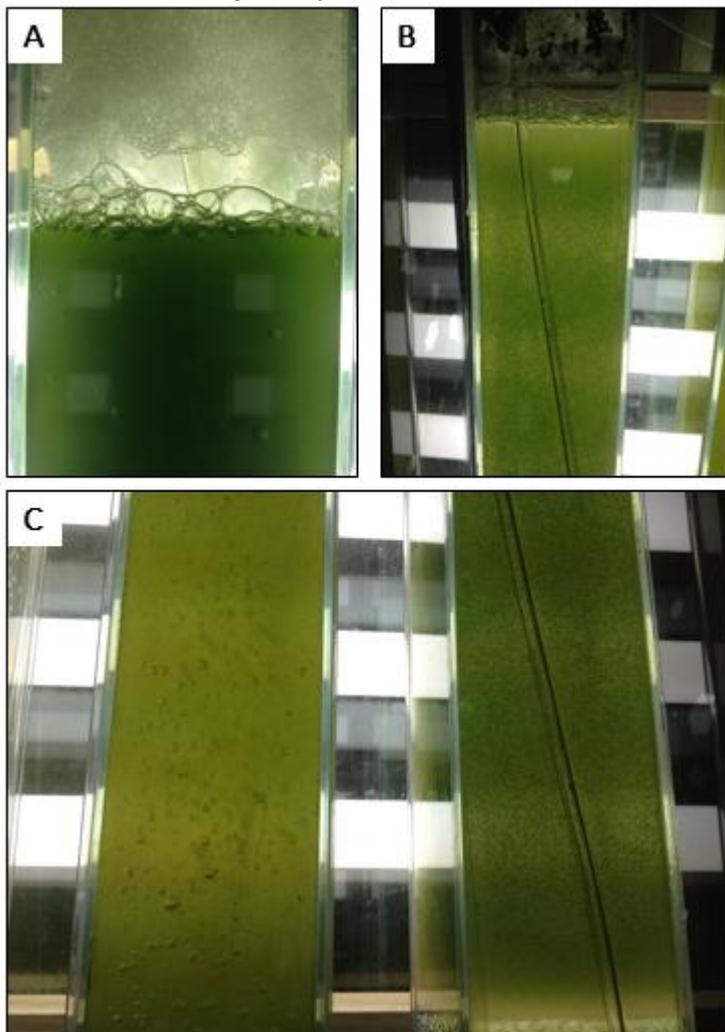
bicarbonato em dióxido de carbono, libera íons hidroxila (OH) que são exportados do interior das células, criando um microambiente alcalino (ambiente ao redor das células). Neste microambiente o carbonato procedente de reações catalisadas pela própria anidrase carbônica (CA) pode se associar ao cálcio, se presente no meio, formando o bicarbonato de cálcio através da biomineralização (JANSSON; NORTHEN, 2010). Ramanan et al. (2010) observaram que o processo de biomineralização é de grande significância para a captura de CO₂ através dos cultivos de *Spirulina platensis* e de *Chlorella* sp.

Jacob-Lopes et al. (2010), ao coletarem dados de remoção de CO₂ e de produção de O₂ quantificados por cromatografia gasosa, alcançaram valores balanceados conforme o valor teórico previsto pela equação da fotossíntese. Sendo assim, estes autores relatam que a remoção de CO₂ em seus estudos, através da rota físico-química, foi insignificante frente à rota biológica (mediada pela fixação do CO₂ na fotossíntese). Estes autores relatam a possibilidade de o CO₂ ser biotransformado em polímeros excretados para o meio de cultura e em compostos orgânicos voláteis (COV). Na presente pesquisa não foi possível a verificação do balanço estequiométrico conforme a equação da fotossíntese, pois não foi quantificada a produção do O₂.

Contudo, foi observada uma maior aglomeração de células nos tratamentos T-15% e T-20% (Figura 45). Esta aglomeração pode ter sido causada pela grande secreção de mucilagem (matriz composta por polissacarídeos) que mantém as células em colônias. Segundo Gonzáles-López et al. (2009) polímeros, como polissacarídeos, são excretados em maior quantidade conforme a concentração de CO₂ aumenta. Este fato pode explicar o porquê dos tratamentos com 15 e 20% de concentração de CO₂ terem apresentado adequada remoção de CO₂ do cultivo, quando comparado aos outros tratamentos, mesmo apresentando menor produtividade e biofixação de dióxido de carbono.

É provável que diferentes rotas de remoção de CO₂ tenham ocorrido através dos cultivos de *Chlamydomonas* sp.1. Estudos futuros são necessários para elucidar qualitativamente e quantitativamente quais rotas (físico-químicas e biológicas) ocorrem nas condições impostas nesta pesquisa, com o objetivo de determinar o balanço de massa do carbono através dos cultivos.

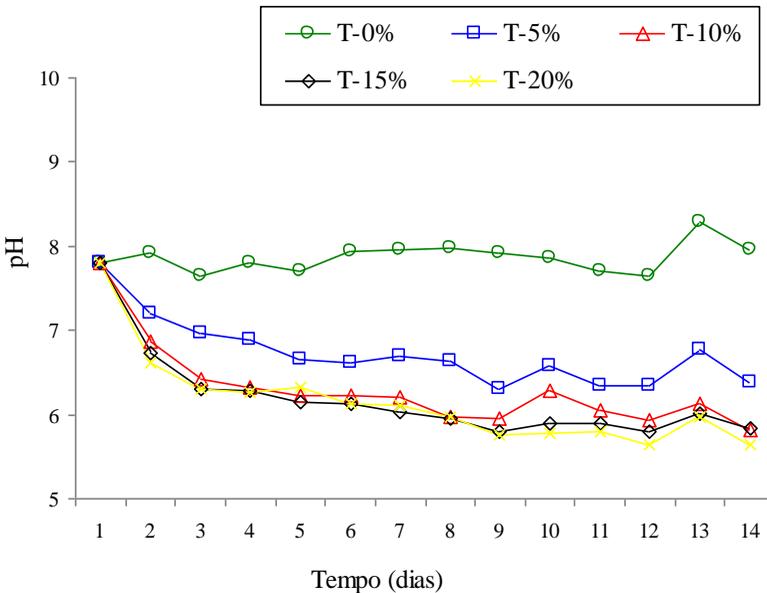
Figura 45 - Colunas de vidros utilizadas como unidades experimentais nos dias finais do Experimento E3. (A) Imagem de uma repetição do Tratamento T-10%. (B) Imagem de uma repetição do Tratamento T-15%. (C) Imagem de duas unidades experimentais do Tratamento T-15% onde é notável a aglomeração das células.



4.3.4 pH

Os valores médios do pH, medidos diariamente após o início dos cultivos, são apresentados na Figura 46. A introdução de ar enriquecido com CO₂ nos cultivos resultou na diminuição do pH, de forma diretamente proporcional à concentração de dióxido de carbono. Possivelmente, a rápida queda nos valores de pH ocorreu devido à alta solubilidade do CO₂ no líquido e às altas concentrações utilizadas. Contudo, em todos os tratamentos enriquecidos com CO₂ (T-5%, T-10%, T-15% e T-20%) a redução de pH não atingiu valores críticos a ponto de limitar o crescimento das algas (de 6,05 a 6,70).

Figura 46 - Variação do pH durante o desenvolvimento das culturas (Experimento E3). Cada linha refere-se a média entre três repetições de cada tratamento. T-0% -introdução de 0,03% (v v⁻¹) de CO₂; T-5% -introdução de 5% (v v⁻¹) de CO₂; T-10% -introdução de 10% (v v⁻¹) de CO₂; T-15% -introdução de 15% (v v⁻¹) de CO₂; T-20% -introdução de 20% (v v⁻¹) de CO₂.



A diferença entre os valores médios de pH entre os tratamentos T-10% e T-15% foi de 0,2 apenas, o que sugere que o pH não tenha sido o responsável pelas diferenças entre os parâmetros de crescimento e produtividade. Estes resultados demonstram a possibilidade de cultivo de *Chlamydomonas* sp.1, em efluente doméstico tratado, sob a introdução de emissões atmosféricas com elevadas concentrações de CO₂ sem a necessidade de controle do pH. Entretanto, com a manutenção do pH em valores levemente alcalinos é possível que haja aumento da produtividade, haja vista o ambiente do qual esta espécie é proveniente.

4.3.5 Nutrientes

As concentrações de nitrogênio e fósforo no início do cultivo (antes da adição do inóculo) e no final do cultivo (após separação da biomassa produzida) bem como a eficiência de remoção destes nutrientes pelos cultivos estão apresentadas na Tabela 11.

A fonte de nitrogênio inorgânico mais significativa, presente no meio de cultura disponível para as *Chlamydomonas* sp.1, foi o amônio. Ao final do cultivo, a remoção de amônio, nitrito e nitrato foi superior a 95% nos tratamentos que foram enriquecidos com CO₂. Já no tratamento T-0%, em função da ausência de crescimento algal, não houve remoção destes nutrientes e sim incremento, provavelmente relacionado à degradação da biomassa. Estes dados realçam a eficiência destes microrganismos para a remoção de nitrogênio inorgânico dissolvido. A eficiência de remoção média de ortofosfato foi acima de 48% para os tratamentos T-5%, T-10%, T-15% e T20%, não havendo diferença significativa entre estes, enquanto que no tratamento T-0% não houve remoção (Tabela 11). Este resultado sugere que o nitrogênio foi o nutriente limitante do crescimento nas culturas de *Chlamydomonas* sp.1, estando de acordo com os resultados apresentados por Yun et al. (1997) em cultivo de *C. vulgaris* em efluente industrial sob a introdução de 5% (v v⁻¹) CO₂. Sendo assim, é possível que o enriquecimento do efluente com nutrientes nitrogenados seja uma alternativa para aumentar a produtividade do cultivo e a RF_{co2}, além de estimular a remoção de fósforo no efluente, reduzindo o potencial eutrofizante do mesmo. Vale lembrar que a característica do efluente doméstico tratado pode variar sazonalmente e diariamente e, portanto, é importante que se avalie a relação nitrogênio e fósforo antes do início de cada cultivo.

Tabela 11 - Valores de nitrogênio amoniacal, nitrito, nitrato e ortofosfato nos diferentes tratamentos do Experimento E3.

Parâmetro Avaliado	Concentração Inicial (mg L ⁻¹)	Tratamento	Concentração Final (mg L ⁻¹)	Eficiência de Remoção (%)
N-NH ₄ ⁺	17,74±1,43 a	T-0%	19,81±2,10 a	-
		T-5%	0,23±0,83 b	96,04±4,6 b
		T-10%	0,17±0,06 b	99,03±0,3 b
		T-15%	0,19±0,12 b	98,91±0,7 b
		T-20%	0,19±0,04 b	98,93±0,3 b
N-NO ₂ ⁻	0,218±0,004 a	T-0%	0,315±0,070 b	-
		T-5%	0,005±0,003 c	97,63±1,72 b
		T-10%	0,004±0,002 c	97,83±0,97 b
		T-15%	0,002±0,001 c	98,79±0,61 b
		T-20%	0,003±0,002 c	98,47±1,14 b
N-NO ₃ ⁻²	0,92±0,07 a	T-0%	1,25±0,23 b	-
		T-5%	0,05±0,02 c	94,21±2,56 b
		T-10%	0,04±0,01 c	95,91±1,76 b
		T-15%	0,04±0,02 c	95,91±2,06 b
		T-20%	0,02±0,02 c	97,61±2,56 b
P-HPO ₄	9,58±0,28 a	T-0%	8,82±0,36 a	-
		T-5%	2,93±0,95 b	69,42±9,91 b
		T-10%	4,06±2,14 b	57,59±22,36 b
		T-15%	4,48±0,51 b	53,23±5,32 b
		T-20%	4,89±2,33 b	48,97±24,36 b

Médias ± desvio padrão seguidas de mesmas letras minúsculas não diferem entre si a nível de 0,05 de probabilidade pelo teste Tukey

4.3.6 Perfil de Ácidos Graxos e Teor de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos (FAME) Presentes na Biomassa Microalgal

A biomassa de microalga possui grande potencial como fonte de lipídios para produção de biodiesel (CHISTI, 2007). Para isso, é importante que o conteúdo de lipídios seja compatível com os padrões existentes, tais como a norma europeia EN 14214, a qual padroniza o biodiesel de uso veicular. Segundo Chisti (2007) a maioria das espécies de microalgas não possui composição bioquímica compatível com os padrões europeus para biodiesel. No entanto, a espécie *Chlamydomonas* sp.1, estudada nesta pesquisa, apresentou resultados compatíveis.

O rendimento em óleo na biomassa cultivada em cada tratamento em que houve injeção de ar enriquecido com CO₂ está descrito na Tabela 12. Conforme aumentou a proporção do CO₂ injetado, o rendimento de óleo na biomassa diminuiu. Resultado contrário foi obtido por Tang et al. (2011) com o cultivo das microalgas, também Chlorophyta, *S. obliquus* e *C. pyrenoidosa*, para as quais o conteúdo de lipídios totais mostrou tendência de aumento com o aumento da concentração de CO₂. Também, Derner (2006), no cultivo das diatomáceas *Chaetocerus muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, relata que a suplementação de carbono com CO₂ fomenta o acúmulo de lipídios totais.

A Tabela 13 demonstra a proporção dos 11 ácidos graxos identificados na biomassa de cada tratamento em relação ao conteúdo total. O ácido graxo esteárico apenas não foi identificado no Tratamento T-5%. Foi notável a presença principalmente de ácidos graxos com cadeias de 16 e 18 carbonos (C16 – C18) em todos os tratamentos, os quais equivalem a mais de 99%. Resultado similar foi relatado por Tang et al. (2011) para as microalgas *S. obliquus* e *C. pyrenoidosa*. Segundo Miao et al. (2009) estes ácidos graxos são favoráveis para a produção de biodiesel.

Os ácidos graxos insaturados foram os componentes principais do total de ácidos graxos presente na biomassa da microalga *Chlamydomonas* sp.1 cultivadas em todos os tratamentos em que houve injeção de ar enriquecido com CO₂ (Tabela 14), com predomínio dos monoinsaturados e diinsaturados.

A norma europeia EN 14214 estipula que o limite máximo aceitável para os teores de ácido linolênico e ácidos graxos com mais de três duplas ligações é de 12% e 1%, respectivamente (CHISTI, 2007).

Sendo assim, os tratamentos T-5%, T-10% e T-15% produziram biomassa de microalgas que possuem características compatíveis com a norma europeia. Já no Tratamento T-20%, apesar de também não terem sido identificados ácidos graxos poliinsaturados, apresentou teor de ácido linolênico próximo a 12%.

Tabela 12 - Rendimento em óleo na biomassa de *Chlamydomonas* sp.1 cultivada sob os diferentes tratamentos.

Tratamento	Rendimento em óleo (%)
T-5%	51,0
T-10%	42,4
T-15%	39,2
T-20%	35,8

Conforme aumentou a concentração de CO₂ houve tendência no aumento do grau de saturação dos ácidos graxos, haja vista o aumento do teor de ácidos graxos triinsaturados e diminuição do teor de ácidos graxos mono e diinsaturados (Tabela 14). Entretanto, não foi identificado ácidos graxos poliinsaturados. Já Tang et al. (2011), identificaram o ácido graxo poliinsaturado eicosapentaenoico C20:5 (EPA) nos cultivos de *S. obliquus*, o qual aumentou seu teor conforme aumentou a proporção do CO₂ no ar introduzido. Já nos cultivos de *C. pyrenoidosa*, os mesmos autores não identificaram a presença de EPA. Ainda, Derner (2006) relatou a presença de EPA e do, também ácido graxo poliinsaturado, docosaexaenoico C-22:6 (DHA) na biomassa das diatomáceas *C. muelleri* e *T. fluviatilis*, sendo os valores de 16,1% e 3,3%, respectivamente para a primeira, e 20,6% e 7,0%, respectivamente para a segunda. Estes ácidos graxos poliinsaturados (EPA e DHA), apesar de não serem desejáveis para a produção de biodiesel, são considerados produtos de alto valor, devido ao seu amplo

uso na indústria alimentícia (MOLINA-GRIMA et al., 2003; DERNER et al., 2006), os quais podem equacionar os custos de produção do biodiesel na forma de co-produtos (CHISTI, 2007). Contudo, outras substâncias como pigmentos, polissacarídeos, proteínas, etc., podem ser utilizadas como co-produtos (DERNER, 2006). Sendo assim, a análise da composição bioquímica da microalga *Chlamydomonas* sp.1 cultivada nesta pesquisa, com ênfase nestas substâncias, deve ser investigada em estudos futuros.

Tabela 13 - Composição percentual dos ácidos graxos encontrados na biomassa de *Chlamydomonas* sp.1 cultivada sob os diferentes tratamentos do Experimento E3.

Éster Metílico do Ácido Graxo	Notação Taquigráfica	Teor (%)			
		T-5%	T-10%	T-15%	T-20%
Mirístico	C14:0	0,2	0,3	0,4	0,5
Miristoléico	C14:1 <i>c9</i>	0,1	0,3	0,4	0,4
Palmítico	C16:0	14,7	15,4	15,8	15,7
Palmitoléico	C16:1 <i>c9</i>	0,9	0,6	0,6	0,6
7,10-Hexadecadienóico	C16:2 <i>c7,10</i>	4,1	3,6	3,2	3,0
7,10,13-Hexadecatrienóico	C16:3 <i>c7,10,13</i>	0,8	0,6	0,5	0,5
Esteárico	C18:0	-	1,5	1,6	0,4
Oléico	C18:1 <i>c9</i>	47,3	42,4	38,4	32,6
Vacênico	C18:1 <i>c11</i>	9,6	12,7	15,9	20,1
Linoléico	C18:2 <i>c9,12</i>	18,6	17,4	15,6	14,3
Linolênico	C18:3 <i>c9,12,15</i>	3,7	5,2	7,6	11,9

Tabela 14 - Teores totais de ácidos graxos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA), diinsaturados (DUFA), triinsaturados (TUFA) e poliinsaturados (PUFA) encontrados na biomassa de *Chlamydomonas* sp.1 cultivada sob os diferentes tratamentos do Experimento E3.

Tratamento	SFA (%)	MUFA (%)	DUFA (%)	TUFA (%)	PUFA (%)
T-5%	14,9	57,9	22,7	4,5	0
T-10%	17,2	56,0	21,0	5,8	0
T-15%	17,8	55,3	18,8	8,1	0
T-20%	16,6	53,7	17,3	12,4	0

4.3.7 Conclusões referentes ao Experimento E3

Para as condições experimentais aqui utilizadas, a microalga *Chlamydomonas* sp.1, estudada na presente pesquisa, apresenta maior produtividade, crescimento e taxa de biofixação de CO₂ quando cultivada sob a introdução de ar enriquecido com 5 e 10% (v v⁻¹) de CO₂. Esta espécie pode ser cultivada sob a introdução de gás contendo 15 e 20% (v v⁻¹) de CO₂, valores comumente encontrados em emissões atmosféricas de usinas termelétricas. No entanto, a produtividade e o crescimento das culturas são prejudicados.

As maiores taxas de biofixação de CO₂ em cada tratamento, foram alcançadas entre o terceiro e sexto dias de cultivo. Os cultivos em que foram introduzidos ar enriquecido em proporções de 5% de CO₂, resultaram em melhor aproveitamento do CO₂. Conforme aumentou a proporção do CO₂ no ar introduzido, aumentou o seu desperdício. Entretanto, estudos futuros devem ser realizados com o intuito de aumentar a eficiência de remoção do CO₂, mesmo em concentrações elevadas.

Apenas uma pequena parcela do CO₂ removido é biofixado na biomassa. Estudos futuros devem ser realizados com o objetivo de determinar as possíveis rotas de remoção de CO₂.

A biomassa produzida nos cultivos, utilizando efluente doméstico como meio de cultura de baixo custo, apresenta potencial para conversão em biodiesel e fixação de CO₂. Para as condições experimentais utilizadas na presente pesquisa, os melhores resultados foram obtidos nos cultivos com a introdução de ar enriquecido com CO₂ resultando nas menores concentrações testadas (5% v v⁻¹).

O cultivo da microalga *Chlamydomonas* sp.1, em efluente doméstico tratado, sob a introdução de elevadas concentrações de CO₂ apresentou eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal superior a 95%.

4.4 Experimento 4: Efeito da introdução de diferentes concentrações de CO₂ nos cultivos de *Chlamydomonas* sp.2, isolada de lago de drenagem ácida de mina de carvão.

Os resultados deste experimento foram submetidos à publicação no Boletim do Instituto de Pesca de São Paulo (Qualis B1 na área Engenharias I), com exceção dos resultados descritos nos itens 4.4.3.1 e 4.4.6. Estes resultados, em conjunto com os resultados ainda não submetidos à publicação do experimento E3, serão submetidos à Revista Bioresource Technology (Qualis A1 na área Engenharias I), após contribuições da banca de avaliação desta tese.

4.4.1 Parâmetros de Crescimento

Os valores de densidade celular ao longo dos dias de cultivo para cada tratamento (média entre três repetições) estão apresentados na Figura 47. As culturas com injeção de ar enriquecido com 5 e 10% de CO₂ ($v v^{-1}$) (T-5% e T-10%) alcançaram maior densidade celular máxima (DCM), não havendo diferenças estatisticamente significativas entre estas. O tratamento em que não recebeu enriquecimento com CO₂ (T-0%) atingiu densidade celular máxima inferior aos tratamentos T-5% e T-10%, porém, superior aos tratamentos T-15% e T-20%, os quais, não apresentaram diferenças significativas.

Os tempos de cultivos não apresentaram diferenças significativas, sendo a média do tempo de cultivo para os cinco tratamentos de $8,0 \pm 0,4$ dias. Os resultados de taxa de crescimento específico - μ , velocidade de crescimento - k e tempo de duplicação, calculados a partir do tempo de cultivo, DCM e densidade celular inicial, estão descritos na Tabela 15.

Os parâmetros de crescimento e produtividade alcançados no cultivo da microalga ácido-tolerante *Chlamydomonas* sp.2 em efluente doméstico tratado, como meio de cultura, foram dependentes da concentração de CO₂ introduzida nos cultivos. É notável a existência de uma faixa ótima onde o dióxido de carbono, não é considerado fator limitante ao desenvolvimento dos cultivos por estar disponível em excesso. Porém, não ultrapassa o limite de concentração tolerável pela microalga. Pode-se considerar as concentrações de 5 e 10% $v v^{-1}$ dentro desta faixa ótima, o que está de acordo com o observado por TANG et al. (2011) com as microalgas *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella*

pyrenoidosa. Segundo CHENG et al. (2006) a concentração de CO_2 no meio de cultura não deve ser menor que a concentração requerida para o crescimento máximo do cultivo, bem como, não deve ser elevada demasiadamente a ponto de exceder o máximo tolerado pelo microrganismo.

Figura 47 - Aumento da densidade celular (células mL^{-1}) durante o cultivo de *Chlamydomonas* sp.2. Cada linha refere-se a média entre três repetições de cada tratamento. T-0% -introdução de 0,03% (v v^{-1}) de CO_2 ; T-5% -introdução de 5% (v v^{-1}) de CO_2 ; T-10% -introdução de 10% (v v^{-1}) de CO_2 ; T-15% -introdução de 15% (v v^{-1}) de CO_2 ; T-20% -introdução de 20% (v v^{-1}) de CO_2 .

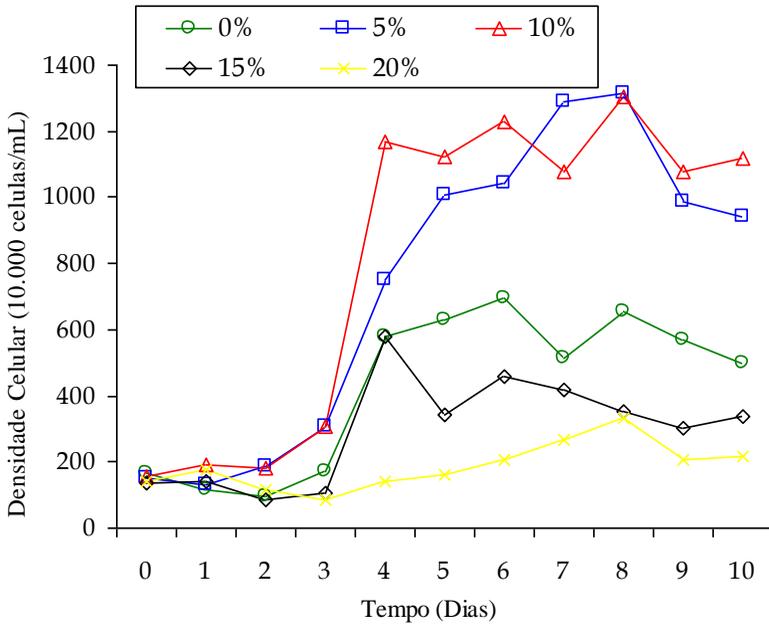


Tabela 15 - Valores de Densidade Celular Máxima (DCM), Tempo de Cultivo, Velocidade de Crescimento (k), Tempo de Duplicação, Taxa de Crescimento Específico (μ) e Produtividade nos diferentes tratamentos (Experimento E4).

Parâmetro de Crescimento	T-0%	T-5%	T-10%	T-15%	T-20%
Densidade Celular Máxima (10^4 céls. mL ⁻¹)	793±137 a	1.347±32 b	1.305±55 b	489±68 c	335±65 c
Tempo de Cultivo (dias)	8,0±1,0 a	7,6±0,5 a	8,0±0,0 a	7,6±0,5 a	8,6±1,1 a
Velocidade de Crescimento - k	0,27±0,01 a	0,42±0,01 b	0,36±0,02 b	0,22±0,01 ac	0,15±0,06 c
Tempo de Duplicação (dias)	3,59±0,1 a	2,37±0,1 a	2,72±0,2 ab	4,46±0,2 ab	7,65±3,7 b
Taxa de Crescimento Específico (d ⁻¹) - μ	0,80±0,07 a	0,92±0,06 a	0,87±0,01 a	0,76±0,03 ab	0,61±0,11 b
Produtividade (g L ⁻¹ dia ⁻¹)	0,04±0,01 ab	0,06±0,01 a	0,06±0,01 a	0,03±0,01 bc	0,02±0,01 c

Valores expressos como média \pm desvio padrão. Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas.

As concentrações de CO₂ presentes em emissões atmosféricas provenientes da queima de combustíveis fósseis, geralmente, estão em torno de 10 e 20% (LV et al., 2010). Os resultados apresentados nesta pesquisa demonstram que a microalga ácido-tolerante é capaz de crescer sob a introdução de ar contendo estas concentrações. Quando comparada com resultados apresentados na literatura, em cultivo de outra espécie do gênero *Chlamydomonas* (NEVES et al., 2013), e em cultivos de microalgas dos gêneros *Scenedesmus*, *Chlorella* (TANG et al., 2011) e *Nannochloropsis* (CHIU et al., 2009; JIANG et al., 2011), a microalga ácido-tolerante *Chlamydomonas* sp.2, cultivada nas condições impostas nesta pesquisa, apresentou crescimento adequado.

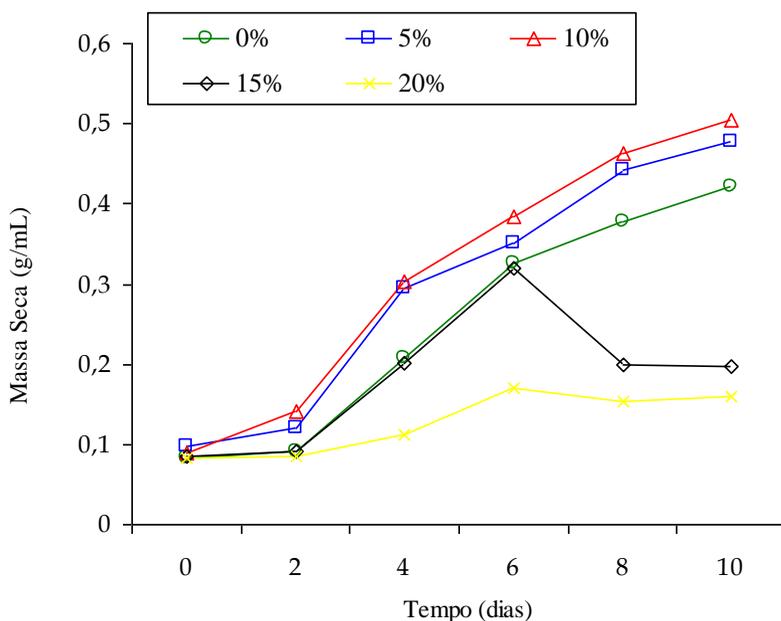
4.4.2 Produtividade

As unidades experimentais foram inoculadas com inóculo em fase exponencial da curva de crescimento, resultando em uma massa seca inicial média de $0,09 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$. Os resultados de massa seca são apresentados na Figura 48. Os tratamentos T-5% e T-10% foram os que apresentaram maior massa seca ao final do experimento, alcançando as médias de $0,48 \pm 0,02$ e $0,51 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente, não apresentando diferenças significativas. O tratamento T-0% alcançou a média de $0,42 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$, o qual foi inferior ao tratamento T-10%, porém sem diferença significativa à média alcançada no tratamento T-5%. Já os tratamentos T-15% e T-20% alcançaram as menores médias ($0,20 \pm 0,04$ e $0,16 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente), sendo aquele superior a este (Figura 48).

A produtividade, calculada a partir dos resultados de tempo de cultivo e de massa seca, é apresentada na Tabela 15. Mesmo nos melhores tratamentos (T-5% e T-10%) foram observados valores de produtividade inferiores aos relatados na literatura para o cultivo de outra espécie do gênero *Chlamydomonas* (NEVES et al., 2013), e em cultivos de microalgas dos gêneros *Scenedesmus* e *Chlorella* (MORAIS; COSTA, 2007; YOO et al., 2010; RADMANN et al., 2011; TANG et al., 2011). Embora a massa seca acumulada entre os tratamentos tenha sido relativamente baixa, os tratamentos T-0%, T-5% e T-10% demonstraram continuidade do acúmulo de biomassa, mesmo quando atingida a densidade celular máxima. Estudos futuros deverão avaliar a máxima biomassa seca atingida nesses tratamentos, mesmo após o alcance da densidade celular máxima. No entanto, a produtividade deve

ser ainda menor já que a biofixação de CO_2 tende a diminuir após o quarto dia de cultivo (Figura 49).

Figura 48 - Aumento da massa seca (g L^{-1}) durante o cultivo de *Chlamydomonas* sp.2. Cada linha refere-se a média entre três repetições de cada tratamento. T-0% -introdução de 0,03% (v v^{-1}) de CO_2 ; T-5% -introdução de 5% (v v^{-1}) de CO_2 ; T-10% -introdução de 10% (v v^{-1}) de CO_2 ; T-15% -introdução de 15% (v v^{-1}) de CO_2 ; T-20% -introdução de 20% (v v^{-1}) de CO_2 .



4.4.3 Avaliação da Fixação de Carbono

Os tratamentos T-5% e T-10% apresentaram valores de taxa de biofixação de CO_2 (RF_{CO_2}), ao longo dos 10 dias de cultivo, de 0,092 e 0,094 $\text{g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, respectivamente. O tratamento T-0% apresentou RF_{CO_2} de 0,074 $\text{g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, seguidos de T-15% com 0,048 $\text{g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e T-20% com 0,014 $\text{g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$.

As Figuras 49 e 50 demonstram as taxas de biofixação de CO_2 (RF_{CO_2}) a cada dia em que a massa seca foi determinada. As maiores RF_{CO_2} foram alcançadas nos cultivos sob concentrações de 5 e

10% (v v⁻¹) de CO₂ (T-5% e T-10%), os quais apresentaram os valores máximos no quarto dia de cultivo, sendo a média entre três repetições para cada tratamento de 0,16 e 0,15 g L⁻¹ dia⁻¹, respectivamente. Os tratamentos T-0% e T-15% apresentaram valores máximos de RF_{CO₂} de 0,11 g L⁻¹ dia⁻¹ entre o quarto e sexto dia de cultivo (Figuras 49 e 50). Já o tratamento T-20% alcançou valor máximo de RF_{CO₂} de 0,05 g L⁻¹ dia⁻¹ no sexto dia de cultivo (Figura 50).

Fatores como intensidade de luz, densidade do cultivo e concentração de dióxido de carbono injetado nas culturas podem influenciar na atividade fotossintética, inibir a biofixação de CO₂ e prejudicar a produtividade em cultivos de microalgas (CHENG et al., 2006). Segundo COSTA et al. (2004) quando cultivos de microrganismos fotossintéticos se encontram com elevada densidade celular pode ocorrer efeitos de sombreamento, o qual reduz o nível de luz que atinge as células, prejudicando a biofixação de CO₂. Na presente pesquisa, onde os cultivos foram realizados em sistemas intermitentes, hipoteticamente seria possível a fixação de aproximadamente 34 quilogramas de dióxido de carbono por metro cúbico de meio de cultura ao ano, através do cultivo da microalga ácido-tolerante *Chlamydomonas* sp.2, em efluente doméstico tratado, sob injeção de ar contendo 5 ou 10% (v v⁻¹) de CO₂, tratamento nos quais foram observados os maiores valores de RF_{CO₂}. Esta quantia é inferior ao relatado por SIDNEY et al. (2010) nos cultivos de outras microalgas como *C. vulgaris*, *Botryococcus braunii* e *Dunaliella tertiolecta*, e por TANG et al. (2011) nos cultivos de *S. obliquus* e *C. pyrenoidosa*. Estudos futuros devem ser realizados com o objetivo de aumentar a taxa de biofixação de CO₂, o qual pode ser alcançado, entre outras maneiras, através do aumento da intensidade de luz (HO et al., 2012) ou através da realização de cultivos em sistemas semi-contínuos (MORAIS et al., 2009; ZHENG et al., 2011).

As maiores taxas de biofixação de CO₂ foram alcançadas por volta do quarto dia de cultivo, momento em que as culturas se encontravam em fase de crescimento exponencial. Com o propósito de evitar a perda de produtividade e, conseqüentemente, de biofixação de dióxido de carbono conforme a densidade celular aumenta, é possível remover periodicamente uma determinada quantidade de biomassa e realizar a diluição da cultura (COSTA et al., 2004). Portanto, realizando um cultivo semi-contínuo, com diluições realizadas a cada dois dias, a partir do quarto dia cultivo, hipoteticamente seria possível a biofixação de aproximadamente 55 kg m⁻³ ano⁻¹, quando injetado ar contendo 5 ou 10% (v v⁻¹) CO₂, e 36,5 kg m⁻³ ano⁻¹ quando injetado 15% CO₂ ou ar

não enriquecido com CO_2 , uma vez que estes tratamentos (T-15% e T-0%) apresentaram crescimento similar até o quarto dia de cultivo. Contudo, testes futuros devem ser realizados para avaliar a interferência de outros fatores, como a adaptação das microalgas e a contaminação por outros organismos em sistemas semi-contínuos.

Figura 49 - Taxa de biofixação de CO_2 (Experimento E4) durante o desenvolvimento das culturas para os tratamentos T-0% (injeção de 0,038% v v^{-1} de CO_2), T-5% (injeção de 5% v v^{-1} de CO_2) e T-10% (injeção de 10% v v^{-1} de CO_2). Cada ponto refere-se a média entre três repetições.

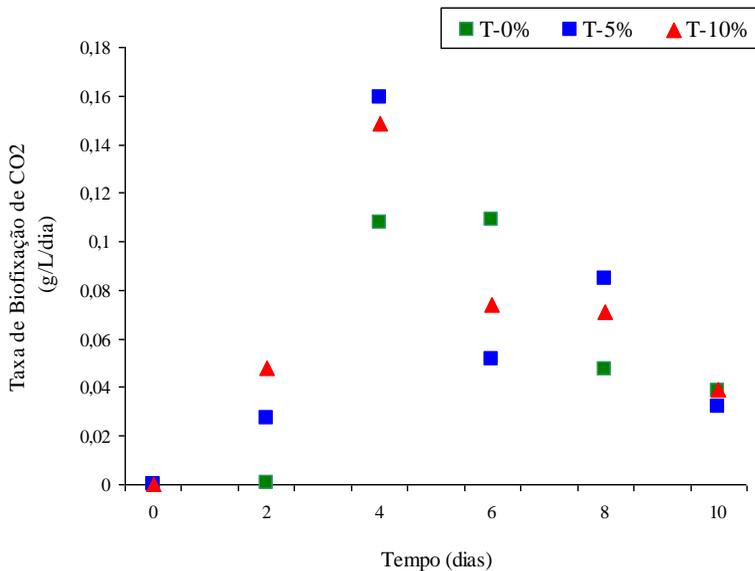
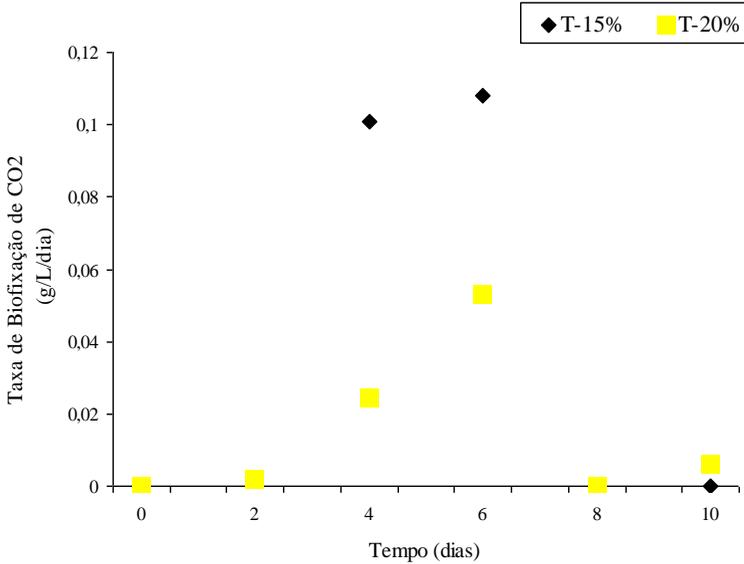


Figura 50 - Taxa de biofixação de CO₂ (Experimento E4) durante o desenvolvimento das culturas para os tratamentos T-15% (injeção de 15% v v⁻¹ de CO₂) e T-20% (injeção de 20% v v⁻¹ de CO₂). Cada ponto refere-se a média entre três repetições.



A utilização de emissões atmosféricas como alternativa de baixo custo para o aumento da produção de biomassa microalgal, apenas é justificada em concentrações de 5 e 10% (v v⁻¹) de CO₂, uma vez que em concentrações superiores o crescimento e produtividade são prejudicados. No entanto, o uso de emissões atmosféricas que contenham concentrações de CO₂ em torno de 15% pode ser uma alternativa para mitigação de impactos associados a emissões de dióxido de carbono, desde que cultivadas até o sexto dia de cultivo ou, como já discutido, em sistemas semi-contínuos. Contudo, são necessários estudos de cultivo com a microalga ácido-tolerante *Chlamydomonas* sp.2 sob a injeção de elevadas concentrações de CO₂ em conjunto com outros gases, como SO₂ e NO_x, presentes em emissões provenientes da queima de combustíveis fósseis (MORAIS; COSTA, 2008), bem como, estudos que visem uma transferência de massa mais eficiente a fim de diminuir as perdas de CO₂ para a atmosfera.

4.4.3.1 Eficiência de utilização do CO₂

Na Tabela 16 estão descritos os valores médios de CO₂ que foram introduzidos, removidos e biofixados em cada unidade experimental, para cada tratamento, ao longo dos dez dias em que ocorreu o Experimento E4.

Os percentuais de CO₂ removidos pelo cultivo foram mensurados através do aparelho portátil GEM 2000, conforme descrito na Equação 10 (ver Item 3.7). A partir destes valores percentuais, foi possível estimar a quantidade total de CO₂ removido, em quilogramas, em cada cultivo. Devido à baixa concentração deste gás no ar atmosférico (0,038%), não foi possível a avaliação do percentual removido no Tratamento T-0%, uma vez que o GEM 2000 tem precisão de 0,1%.

O percentual de CO₂ removido variou entre 2,82 a 17,60%. Conforme aumentou a proporção do CO₂ no ar introduzido, diminuiu o percentual removido e, conseqüentemente, maior quantidade de CO₂ foi emitida ao longo do cultivo. O Tratamento T-5% foi o que apresentou maior quantidade de CO₂ removido e a menor quantidade emitida. Já o Tratamento T-10%, apesar de ter removido menor quantidade de CO₂, emitiu menor quantidade que os tratamentos T-15% e T-20%.

Entretanto, os cultivos nos quais foram introduzidos ar enriquecido com CO₂ fixaram uma quantidade pequena deste gás em relação ao total introduzido. O percentual biofixado nestes cultivos variou entre 0,05 e 0,62%, onde, também, conforme aumentou a proporção do gás introduzido, diminuiu o percentual biofixado. Já no Tratamento T-0% foi biofixado em torno de 75% do total introduzido.

Os dados apresentados por Zheng et al. (2011) corroboram com a presente pesquisa ao relatarem que a eficiência de biofixação do CO₂ decresceu com o aumento da concentração do CO₂ no ar introduzido. Estes autores observaram, para proporções de CO₂ no ar injetado de 5, 10, 15 e 18,37%, que o percentual de CO₂ biofixado em relação ao total introduzido variou entre 0,60 e 3,72%. Apesar de que, similar ao presente trabalho, sejam percentuais baixos, os resultados atingidos por estes autores foram superiores aos observados nesta pesquisa, através do cultivo da microalga ácido-tolerante *Chlamydomonas* sp.2. Segundo os mesmos autores, para obter maior aproveitamento do CO₂ que está sendo injetado sugere-se diminuir a proporção de CO₂ na atmosfera introduzida nos cultivos para 2,9%, e iniciar o cultivo com maior concentração de células, em torno de 3,4 g L⁻¹. Sendo assim, levando em

consideração a utilização de pequenas emissões atmosféricas que contenham elevadas concentrações de CO₂, pode ser interessante a diluição do gás emitido, anteriormente à injeção deste nos tanques de cultivos de microalgas.

Outra alternativa com o propósito de aumentar a eficiência de fixação do CO₂ é a injeção do ar enriquecido por tempo determinado, como proposto por Morais e Costa (2007) onde o ar é introduzido durante 15 minutos a cada duas horas. Ainda, segundo os mesmos autores, é possível recircular o ar injetado entre outros ou o mesmo fotobiorreator (ver item 2.2.2.3), como medida de aproveitar o CO₂ não retido pelo sistema.

O percentual de CO₂ biofixado em relação à quantidade total de CO₂ removido pelo cultivo variou entre 1,71 e 6,38%, sendo o menor valor encontrado no Tratamento T-20% e o maior no Tratamento T-10%, o qual alcançou maior massa seca média ao final do cultivo. O Tratamento T-5%, o qual não apresentou diferença significativa no valor de massa seca alcançada ao final do cultivo em relação ao Tratamento T-10%, e apresentou a maior quantidade de CO₂ removida, biofixou 3,51% do total removido. Este resultado é corroborado pela pesquisa de Jacob-Lopes et al. (2010), os quais relatam haver outras rotas de transformação do CO₂ através do cultivo de microalgas, que não apenas a fixação do dióxido de carbono na biomassa. Entre estas rotas pode-se citar a mineralização, a biomineralização, a excreção de compostos orgânicos, como polissacarídeos e a biotransformação do CO₂ em compostos orgânicos voláteis (JANSSON; NORTHEM, 2010; JACOB-LOPES et al., 2010; RAMANAN et al., 2010) (ver discussão no item 4.3.3.1).

Possivelmente ocorreram diferentes rotas de remoção de CO₂ através dos cultivos da microalga ácido-tolerante *Chlamydomonas* sp.2. Entretanto, são necessários estudos futuros para elucidar qualitativamente e quantitativamente quais rotas (físico-químicas e biológicas) ocorrem nas condições impostas nesta pesquisa, com o objetivo de determinar o balanço de massa do carbono através dos cultivos.

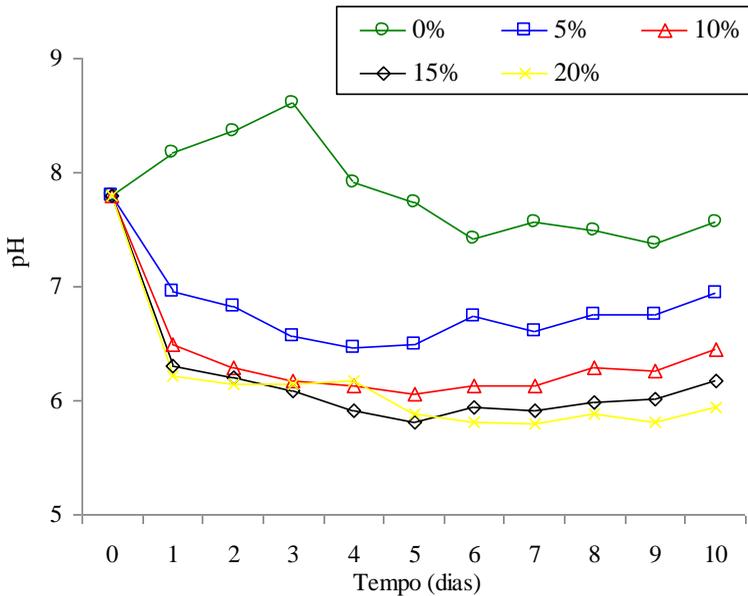
Tabela 16 - Quantidade de CO₂ introduzido, removido e biofixado pelos cultivos após 10 dias do Experimento E4.

Parâmetro	Qtde. CO ₂ Introduzido	Qtde. CO ₂ Removido		Qtde. CO ₂ Biofixado		
	(kg/U.E.)	(kg/U.E.)	(%)	(kg/U.E.)	(%)	(% CO ₂ remov.)
T-0%	0,005	-	-	0,00378	75,60	-
T-5%	0,70	0,123	17,60 ± 7,7 a	0,00432	0,62	3,51
T-10%	1,41	0,072	5,09 ± 0,5 b	0,00459	0,33	6,38
T-15%	2,12	0,088	4,15 ± 0,5 b	0,00180	0,08	2,05
T-20%	2,82	0,084	2,97 ± 1,7 b	0,00144	0,05	1,71

4.4.4 pH

Os valores médios do pH, medidos diariamente após o início dos cultivos, são apresentados na Figura 51. Conforme aumentou a concentração do CO₂ injetado nas culturas houve diminuição mais acentuada do pH. No entanto, em todos os tratamentos houve tendência de estabilização deste parâmetro, sendo o menor valor de $6,14 \pm 0,05$, encontrado no tratamento T-20%.

Figura 51 - Variação do pH durante o desenvolvimento das culturas (Experimento E4). Cada linha refere-se a média entre três repetições de cada tratamento. 0% -introdução de 0,03% (v v⁻¹) de CO₂; 5% -introdução de 5% (v v⁻¹) de CO₂; 10% -introdução de 10% (v v⁻¹) de CO₂; 15% -introdução de 15% (v v⁻¹) de CO₂; 20% -introdução de 20% (v v⁻¹) de CO₂.



O pH diminuiu proporcionalmente ao aumento da concentração de dióxido de carbono na atmosfera injetada nos cultivos, o que corrobora com os resultados relatados por TANG et al. (2011). Possivelmente, a alta solubilidade do CO₂ no líquido e às altas

concentrações utilizadas, levaram à rápida queda nos valores de pH (BABCOCK et al., 2002), os quais rapidamente foram estabilizados devido à alta alcalinidade encontrada no efluente doméstico tratado, utilizado como meio de cultura. No tratamento T-0%, o qual não recebeu ar enriquecido com CO₂, não houve acidificação do pH, fato que pode ter influenciado negativamente o crescimento e produtividade da microalga ácido-tolerante *Chlamydomonas* sp.2 frente aos outros tratamentos. Por se tratar de uma microalga ácido-tolerante, isolada de um ambiente com pH ácido, é possível que apresentem melhores resultados de crescimento, produtividade e biofixação de CO₂, quando cultivadas em pH menores ao observado nesta pesquisa. Sendo assim, são necessários estudos futuros do cultivo desta microalga no efluente doméstico tratado, utilizado nesta pesquisa, mas com o pH acidificado. No entanto, os tratamentos T-15% e T-20%, os quais apresentaram os menores valores de pH, não ofereceram as condições para os melhores resultados de crescimento e produtividade, sugerindo que a elevação da concentração de CO₂ no ar injetado nos cultivos não basta para tornar o meio de cultura ácido para a microalga ácido-tolerante.

4.4.5 Nutrientes

Os resultados das concentrações de nitrogênio e fósforo no início (antes da adição do inóculo) e final do cultivo (após separação da biomassa produzida), e de eficiência de remoção destes nutrientes, são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 - Valores de nitrogênio amoniacal, nitrito, nitrato e ortofosfato nos diferentes tratamentos do Experimento E4.

Parâmetro Avaliado	Concentração Inicial (mg L ⁻¹)	Tratamento	Concentração Final (mg L ⁻¹)	Eficiência de Remoção (%)
N-NH ₄ ⁺	57,90	T-0%	22,24 ± 6,22 a	61,58 ± 10,75 a
		T-5%	23,04 ± 1,67 a	60,20 ± 2,88 a
		T-10%	23,81 ± 0,17 a	58,86 ± 0,31 a
		T-15%	32,41 ± 4,29 a	44,02 ± 7,42 a
		T-20%	26,14 ± 4,18 a	54,84 ± 7,23 a
N-NO ₂ ⁻	1,68	T-0%	0,09±0,03 a	94,44 ± 1,92 a
		T-5%	0,08±0,06 a	95,00 ± 3,33 a
		T-10%	0,11±0,06 a	93,33 ± 3,85 a
		T-15%	0,17±0,10 a	90,00 ± 5,77 a
		T-20%	0,15±0,03 a	91,11 ± 1,92 a
N-NO ₃ ⁻²	6,2	T-0%	0,29 ± 0,21 a	95,38 ± 3,45 a
		T-5%	0,25 ± 0,17 a	95,97 ± 2,74 a
		T-10%	0,30 ± 0,18 a	95,16 ± 2,96 a
		T-15%	0,71 ± 0,41 a	88,55 ± 6,66 a
		T-20%	0,51 ± 0,29 a	91,83 ± 4,76 a
P-HPO ₄	3,94	T-0%	0,95 ± 0,29 a	75,91 ± 5,8 a
		T-5%	0,63 ± 0,12 a	83,99 ± 3,81 a
		T-10%	0,79 ± 0,13 a	79,91± 3,25 a
		T-15%	1,21 ± 0,15 a	69,23 ± 3,05 a
		T-20%	1,22 ± 0,57 a	69,08 ± 14,41 a

Médias ± desvio padrão seguidas de mesmas letras minúsculas não diferem entre si a nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

A utilização de efluentes domésticos tratados como meio de cultura alternativo para o cultivo de microalgas tem se mostrado eficiente em prover quantidades balanceadas de macro e micronutrientes, trazendo benefícios ambientais e econômicos ao minimizar a demanda por água e fertilizantes (DICKINSON et al., 2013). A relação N:P encontrada no início dos cultivos foi de aproximadamente 38:1. Esta relação é considerada elevada para cultivo de microalgas, nos quais geralmente está em torno de 16:1 (RICHMOND, 2004) (ver item 2.2.2.1). Sendo assim, supõe-se que o fósforo tenha limitado o crescimento e, conseqüentemente, a remoção de amônio. É possível que o enriquecimento do meio de cultura com fosfato seja uma alternativa para aumentar a produtividade do cultivo e a biofixação de CO₂, além de aumentar a eficiência de remoção de nitrogênio, reduzindo o potencial eutrofizante do efluente.

4.4.6 Perfil de Ácidos Graxos e Teor de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos (FAME) Presentes na Biomassa Microalgal

A concentração do CO₂ no ar introduzido nos cultivos, influenciou na composição bioquímica das microalgas. A Tabela 18 demonstra o rendimento, em óleo, na biomassa da microalga ácido-tolerante *Chlamydomonas* sp.2 em cada tratamento realizado. Conforme aumentou a concentração de CO₂ no ar introduzido nos cultivos, houve tendência em diminuir a concentração de óleo encontrado na biomassa microalgal cultivada. Este resultado contrapõe os resultados relatados por Tang et al. (2011) e Derner (2006), os quais relatam aumento do conteúdo de lipídios com o aumento da concentração de CO₂, nos cultivos das microalgas *S. obliquus* e *C. pyrenoidosa* (primeiro autor citado), e *C. muelleri* e *T. fluviatilis* (segundo autor citado). Entretanto, em todos os tratamentos avaliados, o rendimento de óleo foi considerado elevado em relação ao relatado na literatura (DERNER, 2006; SYDNEY et al., 2010; TANG et al., 2011), e descrito no Item 2.2.1 desta tese (Quadro 1), sendo os cultivos sob a introdução de CO₂ na concentração atmosférica (T-0%) e na proporção de 5% (T-5%) os que apresentaram os melhores resultados.

Tabela 18 - Rendimento em óleo na biomassa da *Chlamydomonas* sp.2 cultivada sob os diferentes tratamentos.

Tratamento	Rendimento em óleo (%)
T-0%	50,6
T-5%	37,9
T-10%	25,5
T-15%	27,6
T-20%	27,6

Foram identificados 14 ácidos graxos presentes na biomassa da microalga ácido-tolerante *Chlamydomonas* sp.2 em todos os cinco tratamentos, com exceção do Tratamento T-15% onde não foi identificado o ácido graxo monoinsaturado denominado Meristoléico (C14:1 c9) (Tabela 19). Como no experimento E3, e relatado por Tang et al. (2011), também foi notável a presença principalmente de ácidos graxos com cadeias de 16 e 18 carbonos (C16 – C18) em todos os tratamentos, os quais neste experimento equivalem a mais de 97%. Segundo Miao et al. (2009) eles são favoráveis para a produção de biodiesel.

Os ácidos graxos saturados representam uma parcela significativa do total de ácidos graxos presente na biomassa da microalga *Chlamydomonas* sp.2, os quais representam o maior percentual em todos os tratamentos. De acordo com Derner (2006) e Tang et al. (2011) o aumento da concentração de CO₂ pode aumentar o grau de instauração dos ácidos graxos, e altos níveis de CO₂ aumentam a produção de ácidos graxos poliinstaurados (PUFA). Os resultados encontrados para a microalga ácido-tolerante *Chlamydomonas* sp.2 seguem esta tendência, conforme é possível verificar nas tabelas 19 e 20. Entre os ácidos graxos insaturados, houve predomínio dos triinsaturados. Além disso, diferentemente do experimento E3, em todos os tratamentos foi verificado a presença de PUFA, os quais podem ser de interesse econômico. Portanto, estudos futuros devem ser realizados para determinar qual a composição dos PUFA. Também são necessárias, a realização de análises de composição centesimal e a certificação da

presença de contaminantes na biomassa microalgal, com o propósito de identificar a real aplicação comercial destes compostos.

Quanto a potencialidade de utilização da biomassa da microalga ácido-tolerante *Chlamydomonas* sp.2 como matéria prima para a produção de biodiesel, apesar de não haver restrições na regulamentação nacional, a norma europeia EN 14214 estipula que o limite máximo aceitável para os teores de ácido linolênico e ácidos graxos com mais de três duplas ligações é de 12% e 1%, respectivamente (CHISTI, 2007). Sendo assim, a biomassa cultivada em nenhum tratamento neste experimento possui características compatíveis com a norma europeia, uma vez que apresentaram valores de TUSA e PUFA superiores aos limites determinados pela norma EN14214.

Tabela 19 - Composição percentual dos ácidos graxos encontrados na biomassa de *Chlamydomonas* sp.2 cultivada sob os diferentes tratamentos (Experimento E4).

Éster Metílico do Ácido Graxo	Notação Taquigráfica	Teor (%)				
		T-0%	T-5%	T-10%	T-15%	T-20%
Mirístico	C14:0	0,2	0,3	0,5	0,4	0,4
Miristoléico	C14:1 <i>c9</i>	0,5	0,2	0,5	-	0,6
Palmítico	C16:0	38,3	32,7	30,9	35,1	32,2
Palmitoléico	C16:1 <i>c9</i>	0,3	0,3	0,5	0,2	0,4
7,10-Hexadecadienóico	C16:2 <i>c7,10</i>	1,1	1,1	1,1	1,7	2,0
7,10,13-Hexadecatrienóico	C16:3 <i>c7,10,13</i>	3,6	5,9	7,5	7,7	8,7
Estearíco	C18:0	1,6	1,2	1,1	1,2	1,0
Oléico	C18:1 <i>c9</i>	21,9	17,5	14,4	10,9	9,4
Vacênico	C18:1 <i>c11</i>	7,3	7,6	7,9	10,0	12,2
Linoléico	C18:2 <i>c9,12</i>	10,6	11,3	9,5	5,1	5,2
Gama-Linolênico	C18:3 <i>c6,9,12</i>	0,4	0,4	0,5	0,6	0,5
Linolênico	C18:3 <i>c9,12,15</i>	11,1	16,7	19,7	19,8	20,3
5,9,12,15-Octadecatetraenóico	C18:4 <i>c5,9,12,15</i>	1,6	3,1	4,5	5,3	5,4
Nonadecanóico	C19:0	0,6	0,5	0,4	0,3	0,1
Poliinsaturado	-	0,9	1,2	1,0	1,7	1,6

Tabela 20 - Teores totais de ácidos graxos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA), diinsaturados (DUFA), triinsaturados (TUFA) e poliinsaturados (PUFA) encontrados na biomassa de *Chlamydomonas* sp.2 cultivada sob os diferentes tratamentos (Experimento E4).

Tratamento	SFA (%)	MUFA (%)	DUFA (%)	TUFA (%)	PUFA (%)
T-0%	40,7	30,0	11,7	15,1	2,5
T-5%	34,7	25,6	12,4	23,0	4,3
T-10%	32,9	23,3	10,6	27,7	5,5
T-15%	37,0	21,1	6,8	28,1	7,0
T-20%	33,7	22,6	7,2	29,5	7,0

4.4.7 Conclusões referentes ao Experimento E4

A microalga ácido-tolerante *Chlamydomonas* sp.2 cresceu quando cultivada em efluente doméstico tratado sob a injeção de elevadas concentrações de CO₂ sem que houvesse ajustes no pH. A espécie estudada apresentou melhor crescimento e produtividade quando cultivada sob a injeção de ar enriquecido com 5 e 10% de CO₂. Contudo, apesar de menor desempenho, é possível cultivá-las em concentrações superiores de CO₂.

A microalga ácido-tolerante se mostrou potencialmente adequada para biofixação de CO₂ de emissões industriais em conjunto com a remoção de nutrientes presentes em efluentes domésticos tratados, como uma possível alternativa de polimento no tratamento de efluentes desta natureza. Com o intuito de aumentar o aproveitamento do CO₂ introduzido nos cultivos, sugere-se a utilização de ar enriquecido com não mais do que 5% (v v⁻¹) de CO₂. Contudo, outras espécies já estudadas têm apresentado potencial superior. Portanto, estudos futuros devem ser realizados com o propósito de aumentar a produtividade, remoção e biofixação de CO₂ pelos cultivos, através, por exemplo, da manipulação do pH, aumento da transferência de massa entre gás-líquido, intensidade de luz, adição de nutrientes, recirculação do ar introduzido, entre outros.

A microalga ácido-tolerante *Chlamydomonas* sp.2 apresentou elevadas concentrações de lipídios, entretanto com composição não ideal para utilização como biodiesel.

4.5 Discussão Geral

Nesta seção é realizada uma discussão referente aos quatro experimentos (E1, E2, E3 e E4).

Quanto a densidade celular máxima (DCM) atingida em cada tratamento experimental avaliado nos quatro experimentos, a microalga *Chlamydomonas* sp.1, a qual foi isolada de um lago de tratamento experimental de lixiviado de aterro sanitário, apresentou os maiores valores de DCM quando cultivadas em concentrações de CO₂ de 5 e 10% (E3), seguidas de concentrações de 1% (E2). O mesmo ocorreu para a microalga *Chlamydomonas* sp.2, a qual foi isolada de lago de drenagem ácida de mina de carvão e, apresentou os maiores valores de DCM quando cultivadas em concentrações de CO₂ de 5% e 10% (E4), seguidas de concentrações de 1% (E1), 0,038%. Para ambas as espécies, as menores DCM atingidas foram encontradas nas concentrações de CO₂ de 15 e 20%. Os outros parâmetros de crescimento tiveram a mesma tendência, uma vez que o tempo de cultivo em cada experimento foi similar. Contudo, são necessários estudos futuros que avaliem a influência da concentração de CO₂ no ar introduzido nos cultivos, sobre o volume celular destas espécies.

A microalga *Chlamydomonas* sp.1, diferentemente da *Chlamydomonas* sp.2, não sobreviveu quando cultivada sob a introdução de ar atmosférico. A aclimação para ambas as espécies, anteriormente a execução de cada experimento, foi realizada em concentrações de 1%. Uma hipótese é que a microalga *Chlamydomonas* sp.1 ao retornar para um ambiente com baixa concentração de CO₂ não resistiu ao estresse relacionado à limitação do carbono disponível para fixação. Tendo o mesmo não ocorrido com a espécie 2.

Os parâmetros de produtividade, avaliados através da massa seca, são os mais utilizados na literatura, em pesquisas que avaliam o potencial de aproveitamento da biomassa para produção de biocombustíveis. A microalga *Chlamydomonas* sp.1 atingiu o maior valor de massa seca ($1,7 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$) quando cultivada no meio de cultura composto por 50% de meio sintético TAP e 50% de efluente doméstico tratado, sob a introdução de 1% ($v v^{-1}$) de CO₂. Já quando cultivada em meio composto por 100% efluente doméstico tratado, a espécie 1 atingiu massa seca em torno de $1,4 \text{ g L}^{-1}$ nos tratamentos com introdução de 1 (E2), 5 e 10% (E3), demonstrando que a espécie tolera a elevação da concentração de CO₂ até 10%. No entanto, apenas se justificaria o enriquecimento do ar introduzido nos cultivos para as

concentrações mais elevadas se for utilizado como fonte de dióxido de carbono alguma emissão atmosférica. Contudo, estudos futuros devem ser realizados avaliando a produtividade em cultivos da microalga *Chlamydomonas* sp.1 com concentrações acima de 1% (v v⁻¹) de CO₂ em meio de cultura composto por 50% de meio TAP e 50% de efluente doméstico tratado, onde também podem atingir maiores valores de massa seca.

Já a microalga ácido-tolerante (espécie 2) atingiu o maior valor de massa seca ($1,12 \pm 0,17 \text{ g L}^{-1}$) quando cultivada em meio TAP sob a introdução de 1% (v v⁻¹) de CO₂, enquanto que a substituição por completo do meio TAP pelo efluente doméstico tratado inibiu a sua produtividade. Outros meios de cultura alternativos devem ser pesquisados e propostos para o cultivo da microalga *Chlamydomonas* sp.2, com o objetivo de atingir maiores produtividades, ao menos equivalente ao meio de cultura sintético. Entretanto, o pH dos meios de cultura não foram corrigidos para os valores em que a microalga ácido-tolerante está adaptada (valores encontrados no meio em que esta espécie foi isolada). Acreditava-se que com a introdução de CO₂ em elevadas concentrações e, por consequência, a diminuição dos valores de pH do meio de cultura, a microalga ácido-tolerante *Chlamydomonas* sp.2 pudesse apresentar maiores produtividades. Entretanto, possivelmente devido a elevada alcalinidade do efluente doméstico tratado, utilizado como o meio de cultura alternativo, o pH, apesar de ter diminuído conforme o aumento da concentração do CO₂ introduzido, ainda se apresentou levemente ácido, ficando acima do valor encontrado no lago de drenagem ácida de mina de carvão. A produtividade nos tratamentos com concentrações de 5 e 10% (por volta de $0,5 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$, maiores resultados do experimento E4) ficaram aquém do tratamento com introdução de ar enriquecido com 1% de CO₂ no meio de cultura 100% efluente doméstico tratado ($0,7 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$ atingido no tratamento T3 do experimento E1). Entretanto, a massa seca inicial nos experimentos E1 e E4 foram de $0,13 \pm 0,02$ e $0,09 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente. Sendo assim a massa seca inicial menor no experimento E4 pode ter influenciado a menor produtividade alcançada nos cultivos em efluente doméstico tratado sob a introdução de 5 e 10% (v v⁻¹) de CO₂, quando comparados ao cultivo sob a introdução de 1% (v v⁻¹) de CO₂ (E1).

Comparando a espécie 1 com a espécie 2 em relação à produtividade, as duas quando cultivadas em meio de cultura sintético TAP sob a introdução de 1% CO₂ apresentaram produtividades similares. No entanto, para cada concentração de CO₂ testada, a

microalga *Chlamydomonas* sp.1 apresentou maiores valores de produtividade quando cultivadas em 50% ou 100% efluente doméstico tratado, considerando todos os quatro experimentos realizados. Portanto, a espécie 1, a qual foi isolada da lagoa de tratamento experimental de lixiviado de aterro sanitário, possivelmente, adaptou-se melhor ao meio de cultura alternativo. Contudo, estudos futuros deverão ser conduzidos com delineamento experimental que contempla o cultivo das duas espécies em condições iguais, sendo avaliadas estatisticamente.

Outro fator que pode ter influenciado nos resultados obtidos em cada experimento é a composição do efluente doméstico tratado. Em cada experimento o efluente doméstico tratado coletado no mesmo ponto da mesma ETE apresentou características diferentes, o que é esperado, em função da variabilidade diária e sazonal a que este despejos estão submetidos. A relação de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, encontrados no meio de cultura alternativo têm influência no crescimento e produtividade das microalgas. É provável, que a escassez de fósforo no experimento E4 tenha limitado o desempenho das microalgas, enquanto que no E3 o nutriente limitante foi o nitrogênio. Uma alternativa para o aproveitamento mais eficiente deste efluente como meio de cultura alternativo, pode ser a caracterização deste antes da adição no cultivo e consequente correção da relação N:P para valores próximos a relação de Redfield (16N:1P) (ver Item 2.2.2.1), o que além de, possivelmente, aumentar a produtividade, pode aumentar a eficiência de remoção destes nutrientes. Porém, outros elementos devem ser estudados em trabalhos futuros, como a presença de metais pesados, substâncias tóxicas e patogênicas neste efluente.

Em relação a biofixação de carbono na biomassa, levando em consideração que a variação de carbono na biomassa é insignificante, quanto maior a produtividade, maior a biofixação. Sendo assim, dos tratamentos testados, o que maior apresentou biofixação de carbono foi o cultivo da espécie 1 em meio de cultura composto por 50% de meio TAP e 50% de efluente doméstico tratado, sob a introdução de $1\% \text{ v v}^{-1}$ de CO_2 . Quando comparados apenas os tratamentos que utilizaram como meio de cultura 100% de efluente doméstico tratado nos quatro experimentos, as maiores taxas de biofixação de CO_2 foram alcançadas nos cultivos da microalga *Chlamydomonas* sp.1 quando submetidas a 1, 5 e 10% de CO_2 . No entanto, como já discutido, conforme aumentou a proporção de CO_2 no ar injetado, diminuiu a eficiência do aproveitamento deste gás. Nesse aspecto, a concentração de 1% de CO_2 no ar introduzido nos cultivos, além de evitar baixas taxas de biofixação

de CO₂, evita também, grandes perdas de CO₂ para a atmosfera. Este resultado é corroborado por Cheng et al. (2006). Nesse sentido, caso se esteja injetando CO₂ proveniente de outra fonte que não de emissões atmosféricas, como CO₂ pressurizado ou CO₂ produzido apenas para este fim (não residual), o cultivo de microalgas, nas condições em que os experimentos foram realizados, passa a ser uma alternativa emissora de CO₂ ao invés de mitigadora. Porém, ao utilizar CO₂ residual de uma fonte emissora, o cultivo de microalgas se torna uma alternativa de mitigação ao diminuir a quantidade de CO₂ que seria emitido. Em situações de utilização de emissões atmosféricas com elevadas concentrações de CO₂, uma opção para aumentar o aproveitamento do CO₂ pode ser a diluição deste gás para valores próximos a 1%. Essa alternativa passa a ser ainda mais interessante ao aproveitar o efluente gasoso de pequenas unidades emissoras. Para isso, estudos futuros devem avaliar a viabilidade econômica, a aplicação em condições mais próximas da real e a influência de outros gases encontrados em determinados efluentes gasosos.

A ETE em que foi coletado o efluente doméstico tratado opera com uma vazão média de 4.320 m³ dia⁻¹. Hipoteticamente, caso o efluente doméstico tratado pela ETE possuísse como padrão a composição do efluente utilizado no experimento E3, seriam descartados 76,6 kg de amônio e 41,4 kg de ortofosfato, por dia. Levando em consideração o tratamento T-5% do experimento E3, aproveitando todo o efluente tratado pela ETE, existe o potencial de remoção de 73,5 kg de amônio e 28,7 kg de ortofosfato por dia. Caso, hipoteticamente, o cultivo seja realizado em tanques abertos do tipo raceway (ver Item 2.2.2.3) com profundidade de 0,1 metro, e com a introdução do ar enriquecido com CO₂ através de colunas de 1 metro de profundidade (como realizado no Experimento E3), distribuídas pelo raceway. Também, caso, hipoteticamente, a microalga *Chlamydomonas* sp.1 seja cultivada em regime intermitente atingindo a cada 10 dias a massa seca de 1,3 g (resultado alcançado no Tratamento T-5% do Experimento E3). Nestas condições hipotéticas, seria produzido 5,6 toneladas de biomassa microalgal a cada 10 dias, e fixação de aproximadamente 10,3 toneladas de CO₂. Seriam necessários 4,3 ha de lâmina de água. Ainda, para aproveitamento do efluente tratado durante todo o mês pela ETE, seria necessário aproximadamente 43 ha de lâmina de água, realizando 3 ciclos de produção por mês. Isto produziria 2.016 toneladas de biomassa microalgal por ano e fixaria 3.696 toneladas de CO₂ por ano, ou seja, 46,8 toneladas de biomassa ha⁻¹ ano⁻¹, e 85,9 toneladas de dióxido de carbono fixado por hectare a cada ano.

Em contrapartida um hectare de reflorestamento com eucalipto remove cerca de 14 toneladas de CO₂ equivalente por ano (CEZARINI NETO, 2002). Também, levando em consideração que a biofixação de CO₂ no tratamento T-5% equivaleu a 12,24% do total removido pelo sistema, existe potencial para remoção de aproximadamente 700 toneladas de CO₂ por hectare a cada ano.

Apesar das estimativas descritas no parágrafo anterior, é importante ressaltar que trata-se de extrapolação de dados, os quais devem ser reavaliados em função das dificuldades encontradas em cultivos de grandes volumes, como a oscilação da temperatura, contaminação por outros organismos, influência do fotoperíodo, oscilação da intensidade de luz que incide sobre o cultivo, entre outros. Por outro lado, os resultados alcançados no experimento E3 tem potencial para serem maximizados, como já discutido na Seção 4.4 desta tese. Ainda, as possíveis rotas de remoção de CO₂, além da biofixação, devem ser elucidadas para que seja compreendida a real viabilidade destas rotas como estratégias de mitigação de emissões de dióxido de carbono.

Por fim, frente aos problemas globais relacionados ao aumento da concentração de CO₂ na atmosfera e à depleção das reservas de óleo mineral, a fixação de carbono através de microalgas nativas do estado de Santa Catarina, cultivadas sob a introdução de elevadas concentrações de CO₂, quando proveniente de emissões atmosféricas, é uma alternativa promissora de mitigação de emissões de carbono, e de produção de matéria prima para biodiesel. Simultaneamente, pode haver o polimento de efluentes domésticos tratados, quando utilizados estes como meio de cultura, apresentando-se como um processo sustentável de integração de sequestro de carbono, produção de biocombustíveis e pós-tratamento de efluentes. Entretanto, faz-se necessário uma avaliação de ciclo de vida e análise econômica deste processo.

5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

5.1 Conclusões

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir, considerando-se as hipóteses e condições experimentais estabelecidas, que:

- O efluente doméstico tratado foi adequado como meio de cultura alternativo no cultivo da microalga *Chlamydomonas* sp.1, isolada de lixiviado de aterro sanitário, nativa do estado de Santa Catarina;
- Foi possível cultivar a microalga ácido-tolerante *Chlamydomonas* sp.2, isolada de lago de drenagem ácida de mina de carvão, nativa do estado de Santa Catarina, em efluente doméstico tratado. Entretanto, a produtividade foi prejudicada em relação ao uso do meio de cultura sintético convencional (Meio TAP);
- O aumento da concentração de CO₂ introduzido nos cultivos das espécies 1 (*Chlamydomonas* sp.1, isolada de lixiviado de aterro sanitário) e 2 (*Chlamydomonas* sp.2, isolada de lago de drenagem ácida de mina de carvão) para valores acima de 10%, inibiu o crescimento, produtividade e fixação de carbono;
- A espécie 1 (*Chlamydomonas* sp.1, isolada de lixiviado de aterro sanitário) apresentou melhores resultados de crescimento, produtividade e fixação de carbono do que a espécie 2 (*Chlamydomonas* sp.2, isolada de lago de drenagem ácida de mina de carvão) mesmo nas condições de pH mais ácido, alcançadas com a introdução das maiores concentrações de CO₂ nos cultivos;
- O cultivo das espécies 1 (*Chlamydomonas* sp.1, isolada de lixiviado de aterro sanitário) e 2 (*Chlamydomonas* sp.2, isolada de lago de drenagem ácida de mina de carvão) apresentaram maior aproveitamento e fixação do CO₂ introduzido, quando submetidos a injeção de ar enriquecido com 5% (v v⁻¹) de CO₂;

- As microalgas nativas *Chlamydomonas* spp. (espécies 1 e 2), são capazes de serem cultivadas em elevadas concentrações de CO₂, utilizando como meio de cultura alternativo, 100% efluente doméstico tratado, sem a necessidade de correção dos valores de pH, como uma alternativa para a fixação CO₂ e, consequentemente, com a diminuição da concentração de nutrientes que seriam despejados;
- A quantidade de CO₂ biofixado na biomassa microalgal das espécies 1 e 2 equivale a uma pequena proporção do total removido pelos cultivos, o que demonstra a possibilidade da existência de outras rotas de remoção de CO₂;
- Haja vista o perfil de ácidos graxos e o teor de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME), a biomassa da microalga *Chlamydomonas* sp.1, isolada de lixiviado de aterro sanitário, nativa do estado de Santa Catarina, quando cultivada utilizando efluente doméstico tratado, como meio de cultura alternativo, e submetida a injeção de elevadas concentrações de CO₂, tem potencial para produção de biodiesel. O cultivo sob a introdução de ar enriquecido com 5% (v v⁻¹) de CO₂ foi considerado o mais indicado;
- Em relação à microalga *Chlamydomonas* sp.2, a espécie 1 apresentou maior potencial de cultivo em efluente doméstico tratado, como meio de cultura alternativo, sob a injeção de elevadas concentrações de CO₂, com o propósito de fixação de carbono e produção de matéria prima para a produção de biodiesel, consideradas as condições experimentais adotadas.

5.2 Recomendações

Embora todos os objetivos do trabalho tenham sido alcançados, diversas recomendações podem ser feitas visando à melhoria da qualidade de trabalhos futuros. Entre estas, pode-se citar:

- Avaliar o crescimento, produtividade e fixação de carbono da microalga *Chlamydomonas* sp.1 quando cultivada sob a injeção de elevadas concentrações de

CO₂ em meio de cultivo alternativo, composto por 50% de efluente doméstico tratado e 50% de meio de cultura sintético (Meio TAP);

- Avaliar o crescimento, produtividade e fixação de carbono da microalga *Chlamydomonas* sp.2 quando cultivada sob a injeção de elevadas concentrações de CO₂, utilizando outros meios de cultura alternativos;
- Avaliar o crescimento, produtividade e fixação de carbono das espécies 1 e 2 quando cultivadas sob a injeção de elevadas concentrações de CO₂, com o controle do pH em faixas ótimas de cultivo para cada espécie;
- Avaliar o potencial de fixação de carbono das espécies 1 e 2 sob a injeção de ar enriquecido com proporções de CO₂ entre 1 e 5% (v v⁻¹);
- Determinar a vazão do ar introduzido nos cultivos, as condições ideais para transferência de massa entre fase líquida e gasosa, a irradiância, a temperatura e a massa seca inicial, que otimizem o potencial de fixação de carbono das espécies 1 e 2;
- Avaliar o crescimento, produtividade e fixação de CO₂ das espécies 1 e 2 cultivadas em diferentes fotoperíodos;
- Avaliar o crescimento, produtividade e fixação de CO₂ das espécies 1 e 2 cultivadas em sistemas semi-contínuos e contínuos;
- Avaliar o comportamento do dióxido de carbono dissolvido ao longo dos cultivos sob a injeção de elevadas concentrações de CO₂;
- Avaliar a influência de outros gases encontrados em emissões atmosféricas, como o NO_x e SO_x sobre o

crescimento, produtividade e fixação de CO_2 nos cultivos das espécies 1 e 2;

- Determinar as rotas de remoção do CO_2 , bem como o seu balanço de massa, através dos cultivos das espécies 1 e 2;
- Desenvolver experimentos de cultivos das espécies 1 e 2, com o objetivo de avaliar o potencial de fixação de carbono, em escala piloto junto a uma fonte emissora real;
- Avaliar a composição bioquímica, no que se refere a carboidratos e proteínas, bem como a composição de pigmentos, antioxidantes e outros compostos com potencial de mercado, da biomassa das microalgas das espécies 1 e 2, a fim de estimar o potencial de aplicação das mesmas.

REFERÊNCIAS

- ABALDE, J.; CID, A.; FIDALGO, J.P.; TORRES, E.; HERRERO, C. Microalgas: cultivo e aplicaciones. Monografías, n. 26, Universidade da Coruña: España, 1995. 210 p.
- ADAMS, R.M.; CHEM, C.C.; MCCARL, B.A.; SCHIMMELPFENNIG, D.E. Climate Variability and Climate Change: Implications for Agriculture. *Advances in the Economics of Environmental Resources* v. 3, p. 115-148. 2003.
- ANDERSEN, R.A. *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press. 2005. 578 p.
- APHA. (American Public Health Association) – AWWA (American Water Works Association) – WEF (Water Environment Federation). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20th Edition, 2005.
- ARREDONDO-VEGA, B.O.; VOLTOLINA, D. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Centro de Investigaciones del Noroeste – CIBNOR (México). La Paz. 2007. 97 p.
- ASLAN, S.; KAPDAN, I.K. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering*. v. 28, p. 64-70, 2006.
- BABCOCK, R. W.; MALDA, J.; RADWAY, J. C. Hydrodynamics and mass transfer in a tubular air-lift photobioreactor. *Journal of Applied Phycology* v. 14, p. 169–84, 2002.
- BARBOSA, M. J.; JANSSEN, M.; HAM, N.; TRAMPER, J.; E WIJFFELS, R. H. Microalgae cultivation in air-lift reactors: modeling biomass yield and growth rate as a function of mixing frequency. *Biotechnology Bioengineer.* v. 82, p. 170–9, 2003.
- BECKER, E. W. Microalgae as a source of protein. *Biotechnology Advances* v. 25, n. 2, p. 207-210, 2007.

BENEMANN, J.R. CO₂ mitigation with microalgae systems. *Energy Conversion Management*. v. 38, p. 475-479, 1997.

BICUDO, C. E. de M.; MENEZES, M. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: Chave para identificação e descrições. São Carlos. Ed. RIMA. 2^aed. 2006. 502 p.

BILANOVC, D.; ANDARGATCHEW, A.; KROEGER, T.; SHELEF, G. Freshwater and marine microalgae sequestering of CO₂ at different C and N concentrations – Response surface methodology analysis. *Energy Conversion and Management*. v. 50, n. 2, p. 262-267, 2009.

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

CAPUANO, F.; LAMENTI, G.; PROSPERI, G.; RICCI, M.; RITORTO, L.; SCOLLA, G. PEDRONI, P.M. Microalgae biofixation of fossil CO₂: outdoor comparative tests of biomass productivity using flue gas from a natural gas combined cycle power plant. 2005.

CARVALHO, A. P.; MEIRELES, L. A.; MALCATA, F. X. Microalgal reactors: A review of enclosed system designs and performances. *Biotechnology Progress*. v. 22, n.6, p. 1490-1506. 2006.

CEZARINI NETO, C. Modelo de Compensação de CO₂ para Empresas Poluidoras do Ar: Um Estudo de Caso do Vale do Itapocu, Região Nordeste de Santa Catarina. 2002. 103 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Departamento de Engenharia de Produção e Sistemas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

CHENG, L.; ZHANG, L.; CHEN, H.; GAO, C. Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in a membrane-photobioreactor. *Separation and Purification Technology*. v. 50, n. 3, p. 324-329, 2006.

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

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*. 26(3): 126-131 2008.

CHISTI, Y. Constraints to commercialization of algal fuels. *Journal of Biotechnology*. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.07.020>

CHIU, S.; KAO, C.; CHEN, C.; KUAN, T.; ONG, S.; LIN, C. Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 9, p. 3389-3396, 2008.

CHIU, S.; KAO, C.; TSAI, M.; ONG, S.; CHEN, C.; LIN, C. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresource Technology*. v. 100, n. 2, p. 833-838, 2009.

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

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

COSTA, J.A.V., COLLA, L.M., DUARTE, P.F. Improving *Spirulina platensis* biomass yield a fed-batch process. *Bioresource Technology*. v. 92, p. 237-241, 2004.

COSTA, J.A.V.; MORAIS, M.G. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. *Energy conversion and management*. v. 48, n. 7 p. 2169-2173, 2007.

COSTA NETO, P. L. O. *Estatística*. São Paulo: Edgar Blücher. 1977. 264 p.

DERNER, R. B.; BUITRAGO, E.; OLIVERA, A.; PINASKO, K. Crecimiento de *Chaetoceros calcitrans* en ambiente cerrado y abierto bajo diferentes fotoperiodos y medios nutritivos. *Memórias de la Sociedad de Ciencias Naturales La Salle, Venezuela*, v. 54, n. 142, p. 03-08, 1994.

DERNER, R. B. Crescimento da microalga *Thalassiosira fluviatilis* (classe Bacillariophyceae) sob diferentes regimes de iluminação, na Região sul do Brasil. 1995. 108 f.. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Departamento de Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1995.

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

DERNER, R.B. Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados. 2006. 140 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

DICKINSON, K.E.; WHITNEY, C.G.; MCGINN, P.J. Nutrient remediation rates in municipal wastewater and their effect on biochemical composition of the microalga *Scenedesmus* sp. AMDD. Algal Research. v. 2, n. 2, p. 127-134, 2013.

DOUSKOVÁ, I.; KASTANEK, F.; MALÉTEROVÁ, Y.; KASTANÉK, P.; DOUCHA, J.; ZACHLEDER, V. Utilization of distillery stillage for energy generation and concurrent production of valuable microalgal biomass in the sequence: Biogas-cogeneration-microalgae-products. Energy Conversion and Management. v.n51, p. 606-611, 2010.

DUBINSKY, Z. Productivity of algae under natural conditions: algal mass culture and water blooms in nature. In: RICHMOND, A. (ed.) CRC Handbook of Microalgal Mass Culture. Boca Raton: CRC. p. 101-116. 1990.

EDWARDS, M. Green Algae Strategy - End Biowar I and Engineer Sustainable Food and Biofuels. Tempe, Arizona, USA, LuLu Press. 2008. 244P.

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

FABREGAS, J.; OTERO, A.; MASEDA, A.; DOMINGUEZ, A.; PATINO, M. Growth rate of the microalga *Tetraselmis suecica* changes the biochemical composition of *Artemia* species. *Marine Biotechnology*. v. 3, p. 256-263, 2001.

FALKOWSKI, P.G.; RAVEN, J.A. *Aquatic Photosynthesis*. Oxford. Blackwell Scientific Publishers. 1997. 374p.

FAO. *Algae-Based Biofuels - A Review of Challenges and Opportunities for Developing Countries*. Roma, Italy. 2009.

FAO *Algae-Bases Biofuels – Applications and Co-products*. Roma, Italy. 2010.

FERNANDES, H. A dinâmica da biota em um sistema de lagoas de estabilização para tratamento de lixiviado de aterro sanitário. 2009. 186 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

FORNARI-FILHO, P. Avaliação de 5 ETEs em operação no litoral catarinense: considerações sobre o desempenho e relações com a literatura e legislação. 2009. 73 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Ambiental) Universidade do Sul de Santa Catarina, Palhoça, 2009.

GAO, K. S.; WU, Y. P.; LI, G.; WU, H. Y.; VILLAFANE, V. E.; HELBLING, E. W. Solar UV radiation drives CO₂ fixation in marine phytoplankton: A doubleedged sword. *Plant Physiology*. v. 144, n. 1, p. 54-59, 2007.

GORMAN, D.S.; LEVINE, R.P. Cytochrome F and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v. 54, p. 1965-1969, 1965.

GONZÁLEZ LÓPEZ, C.V.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F.G.; FERNÁNDEZ SEVILLA, J.M.; SÁNCHEZ FERNÁNDEZ, J.F.; CERÓN GARCIA, M.C.; MOLINA GRIMA, E. Utilization of the cyanobacteria *Anabaena* sp. ATCC 33047 in CO₂ removal processes. *Bioresource Technology*. v. 100, p. 5904-5910, 2009.

HALL, D. O.; ACIEN FERNANDEZ, F. G.; CANIZARES GUERRERO, E.; KRISHNA RAO, K.; MOLINA GRIMA, E.. Outdoor helical tubular photobioreactors for microalgal production: modeling of fluid-dynamics and mass transfer and assessment of biomass productivity. *Biotechnology Bioengineer.* v. 82, p. 62–73, 2003.

HARRISON, R.M. *Understanding our environment. An introduction to environmental chemistry and pollution.* The University of Birmingham, UK. Redwood Books Ltda. 3^a ed. 1999. 483p.

HO, S.; CHEN, C.; CHANG, J. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology.* v. 113, p. 244-252, 2012.

HO, S.; CHEN, C.; YEH, K.; CHEN, W.; LIN, C.; CHANG, J. Characterization of photosynthetic carbon dioxide fixation ability of indigenous *Scenedesmus obliquus* isolates. *Biochemical Engineering Journal.* v. 53, n. 1, p 57-62, 2010.

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

IPCC. *Climate Change.* Houghton, J.T.,Y. Ding, D.J. Griggs, M. Noguer, P.J. van der Linden, X. Dai, K. Maskell, and C.A. Johnson. The Scientific Basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. United Kingdom e New York, NY, USA, Cambridge University Press. 2001.

JACOB-LOPES, E.; LACERDA, L.M.C.F.; FRANCO, T.T. Biomass production and carbon dioxide fixation by *Aphanothece microscopica* Nägeli in a bubble column photobioreactor. *Biochemical Engineering Journal,* v. 40, n. 1, p. 27-34, 2008.

JACOB-LOPES, E.; REVAH, S.; HERNÁNDEZ, S.; SHIRAI, K.; FRANCO, T.T. Development of operational strategies to remove carbon dioxide in photobioreactors. *Chemical Engineering Journal.* v. 153, p. 120-126, 2009.

JACOB-LOPES, E.; SILVA, L.M.C.F.L.; SCOPARO, C.H.G.; FRANCO, T.T. Análise de cinética de remoção de dióxido de carbono pelo método das velocidades iniciais. Anais: 24 Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. 2007.

JACOB-LOPES, E.; SILVA, L.M.C.F.L.; SCOPARO, C.H.G.; QUEIROZ, M.I.; FRANCO, T.T. Biotransformations of carbon dioxide in photobioreactors. *Energy Conversion and Management*. v. 51, p. 894-900, 2010.

JANSSEN, M.; TRAMPER, J.; MUR, L. R.; WIJFFELS, R. H. Enclosed outdoor photobioreactors: Light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects. *Biotechnology Bioengineering*. v. 81, p. 193–210, 2002.

JANSSON, C.; NORTHEN, T. Calcifying cyanobacteria – the potencial of biomineralization for carbon capture and storage. *Currente Opinion in Biotechnology*. v. 21, p365-371, 2010.

JIANG, L.; LUO, S.; FAN, X.; YANG, Z.; GUO, R. Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO₂. *Applied Energy*. v. 88, p. 3336-3341, 2011.

KADAM, K.L. Power plant flue gas as a source of CO₂ for microalgae cultivation: economic impact of different process options. *Energy Conversion and Management*. v. 38, p. 505-10, 1997.

KIRSCHBAUM, M.U.F. To sink or burn? A discussion of the potential contribution of forests to greenhouse gas balances through storing carbon or providing biofuels. *Biomass and Bioenergy*. v. 24, p. 297-310, 2003.

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

KREMER, G.; VIS, M.; PRUDICH, M.; BAYLESS, D. *Practical Photosynthetic Carbon Dioxide Mitigation*. Ohio Coal Research Center, 2004.

KUMAR, A.; YUAN, X.; SAHU, A. K.; DEWULF, J.; ERGAS, S. J.; LANGENHOVE, H. V. Hollow fiber membrane photo-bioreactor for CO₂ sequestration from combustion gas coupled with wastewater treatment: a process engineering approach. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. v. 85, p. 387-394, 2009.

KUMAR, A.; ERGAS, S.; YUAN, X.; SAHU, A.; ZHANG, Q.; DEWULF, J.; MALCATA, F. X.; LANGENHOVE, H. V. Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. *Trends in Biotechnology*. v. 28, p. 371-380, 2010.

KUMAR, K.; DASGUPTA, C.N.; NAYYAK, B.; LINDBLAD, P.; DAS, D. Development of suitable photobioreactor for CO₂ sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria. *Bioresource Technology*. v. 102, p. 4945-4953, 2011.

LEHNINGER, A. L. *Princípios de Bioquímica*. LODI, W. R.; SIMÕES, A. A. (trads.). São Paulo: Sarvier, 1990. 532 p.

LEKANG, O. *Aquaculture Engineering*. Oxford, UK. Blackwell Publishing Ltda. 2007. 340 p.

LONGHURST, A.; SATHYENDRANATH, S.; PLATT, T.; CAVERHILL, C. An estimate of global primary production in the ocean from satellite radiometer data. *Journal of Plankton Research*. v. 17, p. 1245-1271, 1995.

LOURENÇO, S.O. *Cultivo de microalgas marinhas – princípios e aplicações*. São Carlos: RiMa, 2006. 606p.

LV, J-M.; CHENG, L-H.; XU, X-H. ; ZHANG, L. ; CHEN, H-L. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresource Technology*. v. 101, p. 6797-6804, 2010.

MATA, T. M.; MARTINS, A.A.; CAETANO, N. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. v. 14, n.1, p. 217-232, 2010.

MAZZUCA SOBCZUCK, T.; GARCIA CAMACHO, F.; CAMACHO RUBIO, F.; ACIEN FERNANDEZ, F. G.; MOLINA GRIMA, E. Carbon dioxide uptake efficiency by outdoor microalgal cultures in tubular airlift photobioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 67, p. 465–75, 2000.

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

MENEZES, R.S.; LELES, M.I.G.; SOARES, A.T.; FRANCO, P.I.B.M.; ANTONASI FILHO, N.R.; SANT´ANNA, C.L.; VIEIRA, A.A.H. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. *Química Nova*. v. 36, n. 1, p. 10-15, 2013.

MERCHUCK, J. C.; ROSENBLAT, Y.; BERZIN, I. Fluid flow and mass transfer in a counter-current gas–liquid inclined tubes photo-bioreactor. *Chemical Engineering Science*. v. 62, p. 7414-7425, 2007.

METCALF; EDDY. “Wastewater Engineering - Treatment, Disposal e Reuse”. 3ª Edição. Editora McGraw-Hill Inc, 1991. 1334p.

MIAO, X.L.; LI, R.X.; YAO, H.Y. Effective acid-catalyzed transesterification for biodiesel production. *Energy Converse and Management*. v. 50, p. 2680–2684, 2009.

MOHEIMANI, N. R.; BOROWITZKA, M. A. Limits to productivity of the alga *Pleurochrysis carterae* (Haptophyta) grown in outdoor raceway ponds. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 96, n.1, p. 27-36, 2007.

MOLINA GRIMA, E.; BELARBI, E. H.; ACIEN FERNANDEZ, F. G.; 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, 2003.

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

MOLINA GRIMA, E.; SANCHEZ PEREZ, J. A.; GATCIA CAMACHO, F.; FERNANDEZ SEVILLA, J. M.; ACIEN FERNANDEZ, F. G.; URDA CARDONA, J. Biomass and icosapentaenoic acid productivities from an outdoor batch culture of *Phaeodactylum tricorutum* UTEX 640 in an airlift tubular photobioreactor. *Applied Microbiology Biotechnology*. v. 42, p. 658–663, 1995.

MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. *Energy Conversion and Management*. v. 48, p. 2169-2173, 2007.

MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*. v. 129, p. 439-445, 2007.

MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V. Bioprocessos para remoção de dióxido de carbono e óxido de nitrogênio por microalgas visando a utilização de gases gerados durante a combustão do carvão. *Química Nova*. v.31 n.5 p. 1038-1042, 2008.

MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M.; ANDRADE, M. R.; TEIXEIRA, G. G.; BRUSCH, L. R. F. COSTA, J. A. V. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in southern Brazil. *Aquaculture*, v. 294, p. 60-64, 2009.

MORALES, J.C. *Acuicultura marina animal*. 3 edição, Ed. Mundi-prensa, Madrid, 1991. 671p.

MORITA, M.; WATANABE, Y.; SAIKI, H. Investigation of photobioreactor design for enhancing the photosynthetic productivity of microalgae. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 69, p. 693–98, 2000.

MUNOZ, R.; KÖLLNER. C.; GUIEYSSE, B. MATTIASSON, B. Photosynthetically oxygenated salicylate biodegradation in a continuous stirred tank photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 87, p. 797–803, 2004.

NEVES, F.de F.; JERÊMIAS, M.L.; LOPES, R.G.; SARDÁ, A.; RÖRIG, L.R.; DERNER, R.B.; LISBOA, H. de M. Efeito do uso de efluente doméstico tratado, como meio de cultura, sobre o crescimento e produtividade no cultivo de *Chlamydomonas* sp. isolada de lixiviado de aterro sanitário. *Tecno-lógica*. v. 37, n.17, p. 30-37, 2013.

OHSE, S.; DERNER, R.B.; OZÓRIO, R.A.; CUNHA, P.C.R.; LAMARCA, C.P.; SANTOS, M.E.; MENDES, L.B.B. Revisão: Sequestro de carbono realizado por microalgas e florestas e a capacidade de produção de lipídios pelas microalgas. *Insula*. v. 36, p. 39-74, 2007.

OLGUÍN, E. J.; GALICIA, S.; MERCADO, G.; PÉREZ, T. Annual productivity of *Spirulina* (*Arthrospira*) and nutrient removal in a pig wastewater recycling process under tropical conditions. *Journal of Applied Phycology*. v. 15, n.2, 249-257, 2003.

ONO, E.; CUELLO, J.L. Design parameters of solar concentrating systems for CO₂-mitigating algal photobioreactors. *Energy*. v. 29, p. 1651-1657, 2004.

OSWALD, W. J. Large scale algal culture systems (engineering aspects). In: Borowitzka, M. A., and Borowitzka, L. J., eds. *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge. p. 357-410, 1988.

PARK, J.B.K., CRAGGS, R.J., SHILTON, A.N. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology*. v. 102, p. 34-42, 2011.

PEARSON, P.N.; PALMER, M.R. Atmospheric carbon dioxide concentrations over the past 60 million years. *Nature*. v. 406, p. 695-699, 2000.

PEDRONI, P.; DAVIDSON, J., BECKERT, H.; BERGMAN, P.; BENEMANN, J. A Proposal to Establish an International Network on Biofixation of CO₂ and Greenhouse Gas Abatement with Microalgae. 2001.

PEREZ-GARCIA, O.; BASHAN, Y.; PUENTE, M.E. Organic carbon supplementation of sterilized municipal wastewater is essential for

heterotrophic growth and removing ammonium by de microalga *Chlorella Vulgaris*. Journal of Phycology. v. 47, p. 190-199, 2011.

PINDICH, R., RUBENFELD, D. Econometric models and economic forecasts. 2 ed. New York: Mc Graw-Hill, 1981. 492 p.

POLI, C.R.; POLI, A.T.; ANDREATTA, E.; BELTRAME, E. Aquicultura Experiências Brasileiras. Florianópolis, SC. Multitarefa Editora Ltda. 456p. 2004

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. Applied Microbiology and Biotechnology. v. 65, n.6, p. 635-648, 2004.

PULZ, O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. Applied Microbiology Biotechnology. v. 57, p. 287-293, 2001.

RADMANN, E.M.; CAMERINI, F.V.; SANTOS, T.D.; COSTA, J.A.V. Isolation and application of SO_x and NO_x resistant microalgae in biofixation of CO₂ from thermoelectricity plants. Energy Converse and Management., v. 52, n. 10, p. 3132-3136, 2011.

RAMANAN, R.; KANNAN, K.; DESHCAR, A.; YADAV, R.; CHAKRABARTI, T. Enhanced algal CO₂ sequestration through calcite deposition by *Chlorella* sp. and *Spirulina platensis* in a mini-raceway pond. Bioresource Technology. v. 101, p. 2616-2622, 2010.

RAVEN, J. A. Limits to growth. In: BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. (eds.). Microalgal Biotechnology, Cambridge: Cambridge University, p.331-356. 1988.

RICHMOND, A. Handbook of microalgal mass culture. Boston: C.R.C. Press. ISBN 0-8493-3240-0,1990.

RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture. Biotechnology and applied phycology. Cornwall: Blackwell Science Ltda. ISBN 0-632-05953-2. 2004. 566 p.

RICHMOND, A.; GROBBELAAR, J.U. Factors affecting the output rate of *Spirulina platensis* with reference to mass cultivation. Biomass. v. 10, p. 253-264, 1986.

RODOLFI, L.; ZITTELLI, G. C.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G.; TREDICI, M. R.. "Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor." Biotechnology and Bioengineering. v. 102, n.1, p. 100-112, 2009.

SAKAI, N.; SAKAMOTO, Y.; KISHIMOTO, N.; CHIHARA, M.; KARUBE, I. *Chlorella* strains from hot springs tolerant to high temperature and high CO₂. Energy Conserve and Management. v. 16, p. 693-696, 1995.

SAWAYAMA, S.; INOUE, S.; DOTE, Y.; YOKOYAMA, S-Y. CO₂ fixation and oil production trough microalga. Energy Conserve and Management. v. 36, p. 729-731, 1995.

SÁNCHEZ MIRÓN, A.; CERÓN GARCIA, M.C.; CONTRERAS GÓMEZ, A.; GARCIA CAMACHO, F.; MOLINA GRIMA, E.; CHISTI, Y. Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricorutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. Biochemical Engineering Journal. v. 16, p. 287-297, 2003.

SHEEHAN, J.; DUNAHAY, T.; BENEMANN, J. ROESSLER, P. A Look Back at the US Department of Energy's Aquatic Species Program: biodiesel from algae. US Department of Energy's, Office of Fuels development. NREL/TP-580-24190, 1998. 328 p.

SILVA, F. C.; PEREIRA, A.; CANOZZI. M. B.; ARAÚJO, S.C. Cultivo de microalgas marinhas. In: POLI, C. R. et al. (orgs.). Aqüicultura: experiências brasileiras. Florianópolis: Multitarefa, 2003. p. 93-120. 2003.

SOLOMON, C. M.; LESSARD, E. J.; KEIL, R. G.; FOY, M. S. Characterization of extracellular polymers of *Phaeocystis globosa* and *P. antarctica*. Marine Ecology Progress Series. v. 250, p. 81-89, 2003.

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

SYDNEY, E. B.; STURN, W; de CARVALHO, J. C.; THOMAZ-SOCCOL, V.; LARROCHE, C.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. *Bioresource Technology*. v. 101, p. 5892-5896, 2010.

TANG, D.; HAN, W.; LI, P.; MIAO, X.; ZHONG, J. CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. *Bioresource Technology*. v. 102 n.3, p. 3071-3076, 2011.

TIMMONS, M.B.; EBELING, J.M. *Recirculating Aquaculture*. United States. Cayuga Aqua Ventures. 2007. 975p.

TREDICI, M. R. "Photobiology of microalgae mass cultures: understanding the tools for the next green revolution". *Future Science*, 2010.

TREDICI, M. R.; ZITTELLI, G. C. Efficiency of sunlight utilization: tubular versus flat photobioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 57, p. 187-97, 1998.

UGWU, C. U.; OGBONNA, J. C.; TANAKA, H. Improvement of mass transfer characteristics and productivities of inclined tubular photobioreactors by installation of internal static mixers. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 58, p. 600-607, 2002.

VAN HARMELEN, T.; OONK, H. *Microalgae Biofixation Processes : Application and Potential Contribution to Greenhouse Gas Mitigation Options*. TNO Built Environment and Geosciences. 2006. 45p.

VASUMATHI, K.K.; PREMALATHA, M.; SUBRAMANIAN, P. Parameters influencing the design of photobioreactor for the growth of microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. v. 16, p. 5443-5450, 2012.

VERVERIS, C.; GEORGHIOU, K.. Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as

paper pulp supplements. *Bioresource Technology*. v. 98, n.2, p. 296-301, 2007.

VOLTOLINA, D.; NIEVES, M.; NAVARRO, G. The importance of acclimation for the evaluation of alternative media for microalgae growth. *Aquacultural Engineering*, v. 19, p. 7-15, 1998.

VON SPERLING, M. *Introdução a qualidade das águas e ao tratamento de esgotos*. v.1. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Universidade Federal de Minas Gerais 3^a ed. 2005. 452p.

VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira) physiology, cell-biology and biotechnology*. London: Taylor & Francis, ISBN 0-7484-0674-3, 1997.

WOERTZ, I.C.; FULTON, L.; LUNDQUIST, T.J. Nutrient removal & greenhouse gas abatement with CO₂ supplemented algal high rate ponds. WEFTEC annual conference. Water Environment Federation. 2009. 13p.

YOO, C., JUN, S.; LEE, J.; AHN, C.; OH, H. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. *Bioresource Technology*. v.101, p. 71-74, 2010.

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

ZAR, J.H. *Biostatistical analysis*. 3. ed. New Jersey: Prentice Hall. 1996. 622p.

ZENG, X.; DANQUAH, M.K.; CHEN, X.D.; LU, Y. Microalgae bioengineering: From CO₂ fixation to biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. v. 15, n. 6, p. 3252-3260, 2011.

ZHAO, B.; ZHANG, Y.; XIONG, K.; ZHANG, Z.; HAO, X.; LIU, T. Effect of cultivation mode on microalgal growth and CO₂ fixation. *Chemical Engineering Research and Design*. v. 89, p. 1758-1762, 2011.

ZHENG, Y.; CHEN, Z.; LU, H.; ZHANG, W. Optimization of carbon dioxide fixation and starch accumulation by *Tetraselmis subcordiformis*

in a rectangular airlift photobioreactor. African Journal of Biotechnology. v. 10, n. 10, p. 1888-1901, 2011.