

Resumo

O trabalho apresentado representa um estudo da capacidade de utilização de microalgas para a remoção de dióxido de carbono efluente de unidades industriais. Nesta pesquisa foram utilizadas estirpes de microalgas *Chlorella sp* e *Chlorella minutíssima*. A escolha das microalgas teve em conta, não só a sua elevada resistência a condições adversas de temperatura, pH e concentração de CO₂, mas também o seu elevado teor em óleo, próximo dos 40% para a *Chlorella sp* e 57% para a *Chlorella minutíssima*, que permitirá a reutilização da massa de microalgas produzida, quer para queima direta na unidade industrial quer para extração do óleo e produção de biodiesel. As microalgas foram cultivadas em fotobiorreator de coluna de bolhas, em meio sintético M₇, a temperatura constante de 30°C, com alimentação de CO₂ puro com um caudal médio de 2,8 L/hora. A agitação foi promovida com injeção de ar de 5 em 5 horas durante 15 minutos. Nas condições utilizadas verificou-se que a *Chlorella sp* apresenta melhores resultados do que a *Chlorella minutíssima*, conseguindo-se um tempo de cultura de 11 e 23 dias respetivamente. Observou-se para a *Chlorella sp* uma velocidade máxima específica de crescimento de 0,15 dia⁻¹ a que corresponde um tempo de duplicação de 4,6 dia. A concentração máxima atingida foi de 343 mg/L e a produtividade máxima de 0,031 g/(L.dia). A remoção de carbono foi de 0,8g para 1,4L de meio, o que corresponde à remoção de 570Kg de CO₂ com produção de 310 kg de biomassa algal por cada 1000 m³ de meio em 11 dias de cultivo. Se considerarmos 25 ciclos anuais, obtém-se 7750 kg de biomassa produzida, dos quais cerca de 3000 kg são óleo e fixando 14250 kg de CO₂. Os valores para a *Chlorella minutíssima* foram mais baixos.

Palavras-chave: fotobiorreator; mitigação de CO₂; microalgas; óleo.

Abstract

The following work presents a study of the capability of microalgae for the bio-mitigation of carbon dioxide effluent from industrial plants. In this research microalgae *Chlorella sp.* and *Chlorella minutissima* have been used. The choice of these microalgae was based on their high resistance to adverse conditions of temperature, pH e CO₂ concentrations, as well as their high oil content, near 40% to *Chlorella sp.* and 57% to *Chlorella minutissima*, which should allow the reutilization of the produced algae biomass to burn in the industrial plant, or for oil extraction and therefore to produce biodiesel. The growth of the microalgae was carried out in a bubble photo-bioreactor, with synthetic medium M₇, at constant temperature of 30°C, with the addition of pure carbon dioxide at a flow rate of 2,8 L/h. An injection of air every 5 hours for 15 minutes promoted the agitation of the growth medium. In these conditions, *Chlorella sp.* growth was more effective than *Chlorella minutissima*, with a growth time of 11 days in comparison with 23 days for *minutissima*. The authors observed for *Chlorella sp.* a maximum specific rate of 0,15 day⁻¹, which corresponds a duplication time of 4,6 days. The maximum concentration was 343 mg/L and maximum productivity 0,031 g/(L.day). The carbon reduction was 0,8g for 1,4L of medium, which corresponds to a reduction of 570Kg of CO₂, with the production of 310 Kg of algae biomass in a basis of 1000 m³ of medium, at 11 days of culture. If we consider 25 annual cycles, we may achieve 7750 kg of algae biomass, with 3000 kg of oil and a bio-mitigation of 14250 kg of CO₂. The results for *chlorella minutissima* were worse.

Keywords: photo-bioreactor; CO₂ bio-mitigation; microalgae; oil.

Índice

Capítulo 1 – Introdução e objetivos do trabalho	1
1.1 - Introdução	1
1.2 - Objetivos e apresentação do trabalho desenvolvido	3
Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica	5
2.1 - Captura e sequestro de carbono	5
2.2 - Microalgas	6
2.2.1 - Biofixação de CO ₂ usando microalgas	7
2.2.2 – Cinética de crescimento e necessidades nutricionais	10
2.2.2.1 - Metabolismo celular	10
2.2.2.2 - Dinâmica do crescimento celular	11
2.2.2.3 - Controlo do crescimento	12
2.2.2.4 - Necessidades nutricionais	13
2.2.2.5 - Inibição por oxigénio	13
2.2.2.6 - Mecanismos de assimilação de CO ₂	14
2.2.2.7 - Influência da luminosidade	14
2.2.2.8 - pH.....	15
2.3 - Cultivo de microalgas.....	15
2.3.1 – Sistemas abertos	17
2.3.2 – Fotobiorreatores	18
2.3.2.1 – Operação em fotobiorreatores.....	20
2.4 - Recuperação da biomassa algal	22
2.5 - Microalgas para o tratamento de efluentes	25
2.5.1 - Efluentes gasosos	25
2.5.2 - Efluentes líquidos.....	27
2.6 - Uso da biomassa algal	28

2.6.1 - Microalgas para produção de energia	29
2.6.2 - Produção de biodiesel	31
Capítulo 3 - Material e Métodos.....	37
3.1 - Meio de cultura e reagentes	37
3.1.1 - Meio de cultura	37
3.1.2 – Reagentes	39
3.2 - Microalga e condições de manutenção	39
3.3 - Fotobiorreator	41
3.4 - Ensaios de crescimento em balão Erlenmeyer com meio M ₇	44
3.5 - Ensaios de crescimento em Fotobiorreator.....	45
3.5.1 – Crescimento com CO ₂ em meio M ₇	45
3.5.2 - Crescimento com CO ₂ em meio M ₇ três vezes mais concentrado	46
3.5.3 - Crescimento com CO ₂ em efluente do tratamento terciário com macrófitas....	46
3.4 - Recuperação da biomassa algal	47
3.5 - Extração do Óleo das Microalgas	47
3.5.1 – Método de Bligh e Dyer	47
3.5.2 - Reagentes	48
3.6 - Reta de calibração.....	48
Capítulo 4 - Resultados e Discussão	49
4.1 – Microalgas	49
4.2 - Curvas de Calibração.....	50
4.2.1 - <i>Chlorella sp</i>	50
4.2.2 - <i>Chlorella minutíssima</i>	52
4.3 - Crescimento em balão Erlenmeyer.....	53
4.3.1 - <i>Chlorella sp</i>	53
4.3.2 – <i>Chlorella minutíssima</i>	55

4.4 – Ensaios em fotobiorreator	56
4.4.1 - Crescimento com CO ₂ em meio M ₇	56
4.4.1.1 - <i>Chlorella sp</i>	56
4.4.1.2 - <i>Chlorella minutíssima</i>	58
4.4.2 – Crescimento com CO ₂ em meio M ₇ três vezes mais concentrado	59
4.4.2.1 - <i>Chlorella sp</i>	59
4.4.2.2 - <i>Chlorella minutíssima</i>	61
4.4.3 - Crescimento com CO ₂ em efluente do tratamento terciário com macrófitas....	61
4.5 - Parâmetros cinéticos	61
4.6 - Recuperação da biomassa algal	64
4.7 - Extração do Óleo das Microalgas	66
Capítulo 5 - Conclusão e sugestões de trabalhos futuros	67
6 - Bibliografia	73
Anexo I – Cálculo de parâmetros cinéticos.....	81

Índice de Figuras

Figura 1 – Emissões de CO ₂ em 1980(a) e 2000(b).....	2
Figura 2 – Projeto CARS.....	3
Figura 3 – Sistemas de captura de CO ₂	4
Figura 4 – Indústria do cultivo de algas.	7
Figura 5 - Esquema da fotossíntese na célula da microalga.	8
Figura 6 – Captura de CO ₂ e utilização da biomassa.....	9
Figura 7 – Crescimento de microalga em função dos nutrientes disponíveis.	11
Figura 8 - Representação esquemática de três sistemas de cultivo de microalgas em larga escala: (A) lagoa <i>raceway</i> ; (B) fotobiorreatores tubulares e (C) fotobiorreatores de placas paralelas.....	15
Figura 9 - Produção industrial do microalgas em lagoas <i>raceway</i>	17
Figura 10 - Lagoas <i>raceway</i> utilizadas em investigação.	17
Figura 11 – Fotobiorreatores de bolhas.	18
Figura 12 - Produção industrial do microalgas em fotobiorreatores.	19
Figura 13 - Fotobiorreatores utilizados em investigação.....	19
Figura 14 – Diagrama de blocos para a produção de biomassa algal.....	24
Figura 15 - Biorrefinaria industrial (USA) – Cargill-Dow NatureWorks Biorefinery....	28
Figura 16 – Formas de converter biomassa algal em biocombustível.....	30
Figura 17 – Produção de Biodiesel na Europa (valores em tonelada).....	31
Figura 18 – Produção de Biodiesel nos EUA (milhões de litros).....	32
Figura 19 – Reação de transesterificação.	33

Figura 20 - Comparação de microalgas com outras fontes de óleo para fabricação de biodiesel.....	34
Figura 21 – Colheita de <i>spagnum</i> no campus do IPT.....	38
Figura 22, a e b – Fotografia de <i>chlorella sp</i> e <i>chlorella minutíssima</i> (Observada em microscópio Olympus CH30, ampliação 1000x, fotografado com câmara BMS Systems ST070320007).....	40
Figura 23 – Crescimento de inóculos em incubadora orbital.	40
Figura 24 – Esquema de manutenção da estirpe inicial do inóculo puro.	41
Figura 25 – Representação esquemática do reator.	42
Figura 26 – Material utilizado na montagem do reator.	43
Figura 27 – Fotografias do fotobiorreator.	44
Figura 28 – Desinfecção da boca do balão Erlenmeyer à chama, com a consequente recolha de 2mL com micropipeta em atmosfera esterilizada.	45
Figura 29 - Fotografia de <i>Chlorella sp</i> , com ampliação 1000x em microscópio Olympus CH30.....	49
Figura 30 - Fotografia de <i>Chlorella minutíssima</i> , com ampliação 1000x em microscópio Olympus CH30.....	49
Figura 31 – Fotografia dos 10 padrões preparados.	50
Figura 32 – Fotografia das membranas após filtração por vácuo.....	50
Figura 33 – Curva de calibração para a <i>Chlorella sp</i>	51
Figura 34 – Curva de calibração para a <i>Chlorella minutíssima</i>	53
Figura 35 – Curva de crescimento para a <i>Chlorella sp</i> em balão Erlenmeyer.	54
Figura 36 – Variação do pH para <i>Chlorella sp</i> em balão Erlenmeyer.	54

Figura 37 – Curva de crescimento para a <i>Chlorella minutíssima</i> em balão Erlenmeyer.	55
Figura 38 – Variação do pH para <i>Chlorella minutíssima</i> em balão Erlenmeyer.....	55
Figura 39 – Imagem do fotobiorreator com microalga <i>Chlorella sp</i>	56
Figura 40 – Curva de crescimento para a <i>Chlorella sp</i> em fotobiorreator.	57
Figura 41 – Variação do pH para <i>Chlorella sp</i> em fotobiorreator.....	57
Figura 42 – Imagem do fotobiorreator com microalga <i>Chlorella minutíssima</i>	58
Figura 43 – Curva de crescimento para a <i>Chlorella minutíssima</i> em fotobiorreator.	58
Figura 44 – Variação do pH para <i>Chlorella minutíssima</i> em fotobiorreator.....	59
Figura 45 – Imagem dos fotobiorreatores com microalga <i>Chlorella minutíssima</i> à esquerda e microalga <i>Chlorella sp</i> , à direita.	59
Figura 46 – Curva de crescimento para a <i>Chlorella sp</i> em fotobiorreator com meio mais concentrado.....	60
Figura 47 – Variação do pH para <i>Chlorella sp</i> em fotobiorreator com meio mais concentrado.	60
Figura 48 – Regressão linear da curva de crescimento na fase de crescimento exponencial.....	62
Figura 49 – Centrifugação da microalga.	65
Figura 50 – Microalga <i>Chlorella sp</i> após secagem.	65
Figura 51 – <i>Chlorella sp</i> seca (a) e <i>Chlorella minutíssima</i> seca (b)	65
Figura 52 – Fases da extração do óleo.....	66

Índice de tabelas

Tabela 1 – Sequestro de Carbono por microalgas.	9
Tabela 2 – Propriedades de algumas microalgas.	10
Tabela 3 – Comparação entre sistemas abertos e fechados.	16
Tabela 4 – Métodos de separação da biomassa.	23
Tabela 5 - Comparação de matérias primas atuais com a biomassa.	28
Tabela 6: Comparação de microalgas com outras fontes de óleo para fabricação de biodiesel.	33
Tabela 7: Teor de óleo e produtividade de diferentes espécies de microalgas.	34
Tabela 8 – Composição do meio M ₇	37
Tabela 9 – Composição da solução de micronutrientes.	38
Tabela 10 – Quantidades medidas para a preparação dos padrões.	48
Tabela 11 – Tamanho das microalgas.	50
Tabela 12 – Resultados da absorvância, do peso da biomassa e da concentração para cada solução padrão.	51
Tabela 13 – Resultados da absorvância, do peso da biomassa e da concentração para cada solução padrão.	52
Tabela 14 – Parâmetros cinéticos	64

Capítulo 1 – Introdução e objetivos do trabalho

1.1 - Introdução

A sociedade em que vivemos é *energívora* [1]. A raça humana está excessivamente dependente da produção energética através dos combustíveis fósseis: petróleo, carvão e gás natural. Estes, para além de serem fontes de energia não renováveis, libertam para a atmosfera, após a sua utilização, os chamados gases com efeito estufa (GEE's), sendo o dióxido de carbono responsável por mais de metade deste efeito [2]. A concentração de CO₂ atmosférico aumentou de 260 ppm para 368 ppm nos últimos 100 anos [3]. Destacam-se ainda como GEE's, os CFC's, o metano, o ozono, óxidos nitrosos e orgânicos halogenados.

O efeito estufa, que teve um papel preponderante e fundamental para o estabelecimento de vida na Terra, vem há uns anos para cá, e devido a ações antropogénicas, a ter o efeito inverso [4], causando a fusão de calotas polares, o aumento médio do nível das águas do mar, a extinção acelerada das espécies, a abundância e a localização geográfica da precipitação, entre outras [5].

A elevação média de 0,6°C na temperatura atmosférica, associada à elevação do volume dos oceanos em 10 cm no último século, é devida, principalmente, às elevadas emissões de CO₂ para a atmosfera o que tem motivado o interesse em pesquisas que permitam a minimização destes efeitos. Neste sentido, a redução das emissões de CO₂ irá representar nos próximos anos uma relevante contribuição para o desenvolvimento sustentável das atividades humanas [6].

Cerca de um terço do CO₂ atmosférico é absorvido pelos oceanos, que causará a acidez gradual da água, e a degradação acelerada dos corais, da abundância e diversidade da vida marinha com as consequentes alterações no ambiente terrestre [7].

Em 1997, as Nações Unidas promoveram uma conferência em Quioto, onde foi discutida a problemática do efeito de estufa e do aquecimento global. Cento e setenta nações assinaram na altura o Protocolo de Quioto, no qual se comprometiam a reduzir em 5,2% relativamente a 1990 as emissões de dióxido de carbono, no período compreendido entre 2008 e 2012. A figura seguinte mostra a evolução destas emissões nas últimas duas décadas do século XX. Em 1980 os principais emissores eram os Estados Unidos, a



Europa, a URSS e o Japão. Em 2000 a enorme explosão industrial-comercial dos países asiáticos aumentou largamente as suas emissões, países como a China e a Índia são atualmente os principais emissores.

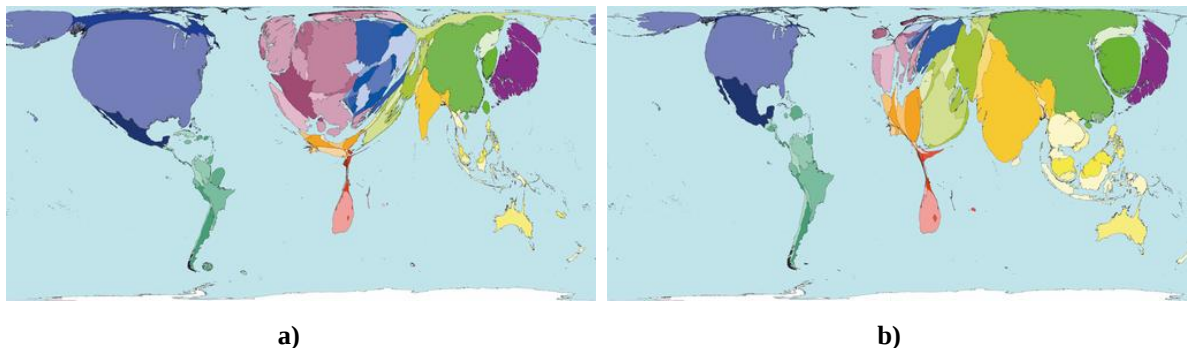


Figura 1 – Emissões de CO₂ em 1980(a) e 2000(b) [8].

Dagoumas et al. [9], referem que o acordo estabelece três mecanismos para que os países alcancem seus compromissos de redução nas emissões:

O primeiro referente ao comércio internacional de emissões, que permite a permuta de emissões entre os países, onde um país com emissões abaixo do seu compromisso pode vender a parte restante;

O segundo, referente à implementação conjunta de projetos, que permite que alguns países possam receber créditos de emissões ao investirem em projetos localizados em outros países que também tenha compromissos de emissões;

O terceiro, o chamado mecanismo de desenvolvimento limpo, que permite que algumas nações recebam créditos por redução de emissões ao investir em projetos localizados em países em desenvolvimento sob condições específicas;

Os países que assinaram o protocolo têm procurado cumpri-lo, criando políticas para cumprir as exigências estabelecidas pelo acordo. Para atingir os compromissos adquiridos os países têm desenvolvido políticas de mudanças climáticas e criado métodos para a medida da eficiência. Os objetivos mais comuns dessas políticas são o uso eficiente da energia, a diversificação das fontes energéticas, a diminuição das emissões, o aumento da eficiência dos processos industriais e agrícolas, a utilização consciente de veículos, a

proteção das florestas, a conservação da biodiversidade, a redução do lixo, a reciclagem e o uso racional da energia doméstica.

1.2 - Objetivos e apresentação do trabalho desenvolvido

Este trabalho surge como conclusão do mestrado em Tecnologia Química. Assim como Trabalho Final de Mestrado foi realizado um Estágio no Instituto Politécnico de Tomar, no período compreendido entre janeiro e setembro de dois mil e doze.

Os objetivos deste trabalho foram traçados tendo como principal motivação um projeto canadense denominado CARS (Carbon Algae Recycling System). Este projeto consiste na implementação de uma central termoelétrica livre de emissões de dióxido de carbono. Esta central terá como unidade complementar um sistema de lagoas com microalgas, onde serão injetados os gases provenientes da queima para geração de energia elétrica. A biomassa algal produzida é recuperada e utilizada na central, quer como combustível para as caldeiras quer como geração de produtos secundários de valor acrescentado. Na figura seguinte apresenta-se o projeto CARS.

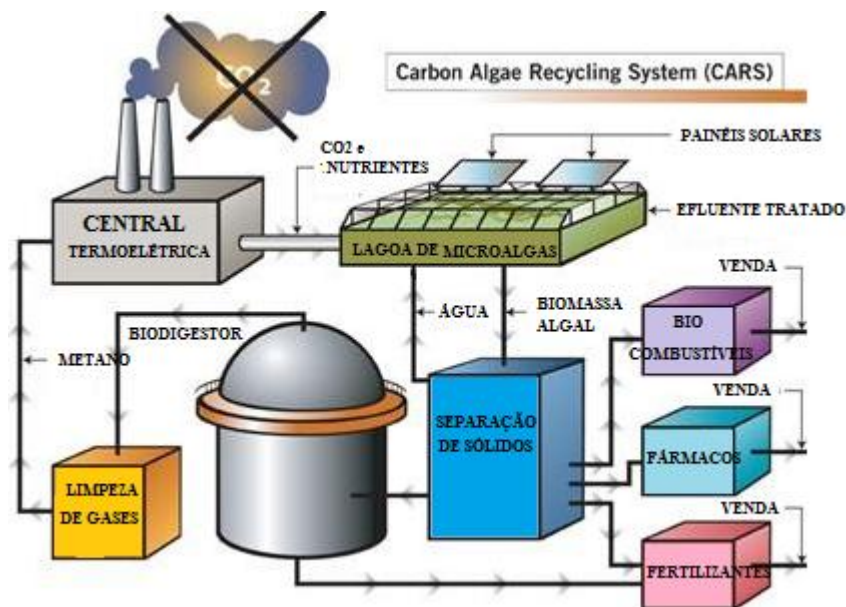


Figura 2 – Projeto CARS [10].

O projeto CARS despertou nos autores a ideia de fazer algo semelhante na região de Tomar, onde existem algumas indústrias de destilação passíveis de sofrer intervenção.

Assim, numa fase de arranque do projeto de investigação estabeleceram-se os seguintes objetivos para o presente estágio:

- ▶ Desenho e dimensionamento de um fotobiorreator versátil, de fácil manutenção e operação;
- ▶ Escolha, manutenção em condições de monossépcia e crescimento de uma microalga resistente a condições adversas, mas que apresente rápido e fácil desenvolvimento;
- ▶ Estabelecimento das melhores condições de crescimento da microalga, em que a fonte de carbono é o dióxido de carbono, passível de ser utilizada no sequestro de dióxido de carbono proveniente de gases efluentes industriais;
- ▶ Escolha de um método rápido para acompanhamento do crescimento da microalga, neste caso um método de medida da densidade ótica. Estabelecimento das curvas de calibração que relacionam a concentração da biomassa algal com a densidade ótica.
- ▶ Determinação do teor de óleo existente nas microalgas com a finalidade de averiguar a sua utilização como biocombustível;



Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica

2.1 - Captura e sequestro de carbono

As tecnologias de captura e sequestro de carbono estão divididas em duas fases, a primeira envolve a sua remoção dos gases efluentes e a segunda a sua fixação, de forma a que não seja possível a sua libertação para a atmosfera.

Para a fase de captura de CO₂ existem três técnicas principais: a) a absorção química por uma corrente líquida, com a posterior adsorção em carvão ativado ou em zeólitos, muito utilizada nas centrais termoelétricas [11,12]; b) a separação do CO₂ através da utilização de membranas, também utilizadas nas termoelétricas [11,13]; c) o fracionamento criogénico através do controlo da temperatura e da pressão [11].

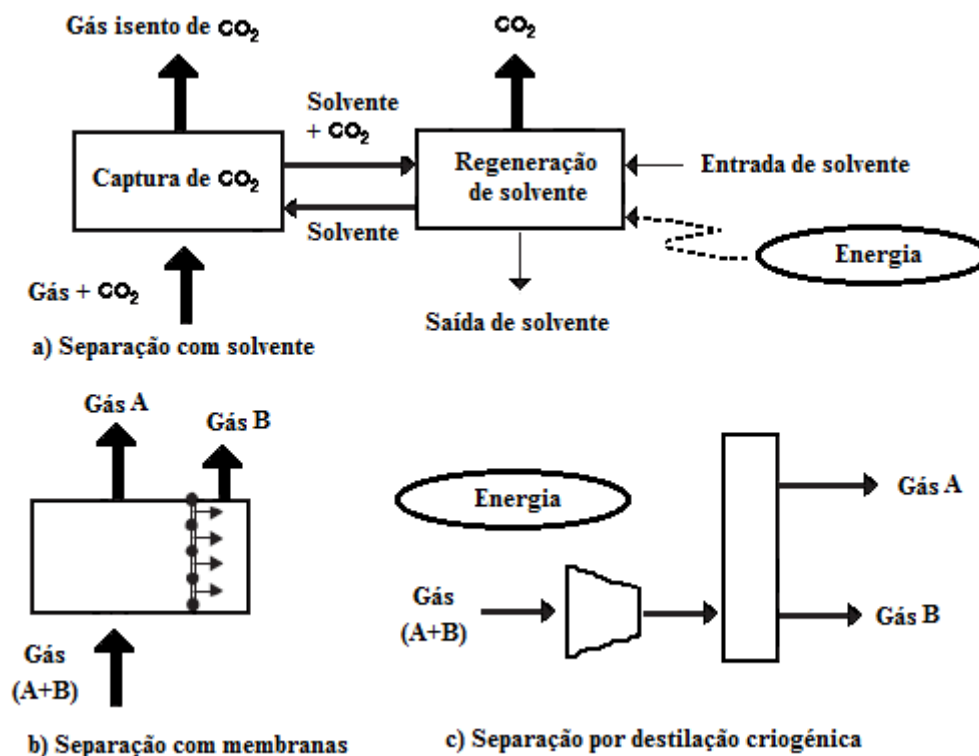


Figura 3 – Sistemas de captura de CO₂ [14].

Para a fase da fixação do CO₂ vários processos têm sido estudados: a) injeção no mar [11], [15], b) em aquíferos [15], c) subterrânea [15] e d) em depósitos de hidrocarbonetos [15],



envolvendo, no entanto, todos estes processos um elevado consumo energético sem a produção de produtos que os viabilizem economicamente [16].

Chegou-se à conclusão que o problema da captura e sequestro do carbono passa por uma biofixação, quer seja utilizando-o para produção de madeira para posterior fornecimento de energia, ou então, no crescimento de microalgas, com todas as vantagens que delas se poderão retirar.

2.2 - Microalgas

Li et al. [17] definem microalgas como um grupo de microrganismos fotossintéticos, procarióticos ou eucarióticos, que apresentam uma taxa de crescimento elevada devido à sua estrutura celular extremamente simples. Deste modo a produtividade de biomassa das microalgas é bastante superior às das outras plantas terrestres. As microalgas só podem ser observadas com uma lupa ou microscópio, pois apresentam dimensões muito reduzidas, o seu tamanho pode variar de poucos micrómetros até algumas centenas (existem microalgas com apenas 0,001 mm de diâmetro [18]). Têm uma ampla representação na Terra podendo ser encontradas em águas doces ou salgadas, ou ainda no ambiente terrestre [18,19]. Para além deste facto, as microalgas são, ainda, resistentes a fatores abióticos muito adversos, não precisando de ser cultivadas em solos férteis ou cultiváveis, não competindo com as espécies alimentares. Podem-se cultivar microalgas em ambientes inóspitos como sejam os desertos [4].

Microalgas procarióticas são, por exemplo, as cianobactérias (*Cyanophyceae*) e eucarióticas são as algas verdes (*Chlorophyta*) e as diatomáceas (*Bacillariophyta*). É estimado que existam mais de 50 000 espécies, das quais aproximadamente apenas 30 000 já foram estudadas e analisadas [7].

Nas últimas décadas foram criadas pelos investigadores extensas bibliotecas de microalgas. Entre elas encontra-se a ACOI, Algoteca da Universidade de Coimbra, que abrange cerca de 4000 estirpes de aproximadamente 1000 espécies diferentes. Esta enorme variedade atesta a importância futura das microalgas, quer seja para produção de fármacos, aditivos alimentares, fonte energética ou mitigação de dióxido de carbono.

As espécies *Chlorella sp* e *Chlorella minutissima* são algas unicelulares de água doce pertencente à classe Chlorophyceae, ordem Chlorococcales e família Oocystaceae. Apresentam forma de vida unicelular ou colonial, e podem acumular pigmentos como



clorofila a e b, β -caroteno e xantofilas. A principal forma de reserva é o amido, porém sob certas condições podem armazenar óleo. A reprodução pode ser por divisão binária, esporos assexuais e reprodução sexual [20,21].

As microalgas começaram a ter especial importância no Japão na década de 50, tendo-se iniciado o cultivo em escala industrial em 1960 com a *Chlorella sp.* Nos anos oitenta já existiam cerca de 5 dezenas de unidades produtivas na Ásia, produzindo mais de 1 Ton por mês, principalmente *Chlorella*.

A Western Biotechnology Ltd e Betatene Ltd (hoje Cognis Nutrition & Health) tornou-se em 1986 a terceira maior indústria de produção na Austrália, com o cultivo de *Dunaliella salina*, como fonte de β -caroteno. Nos últimos anos tem-se observado a expansão desta indústria nomeadamente nos EUA e Índia.

A figura 4 documenta as principais utilizações das microalgas na indústria.

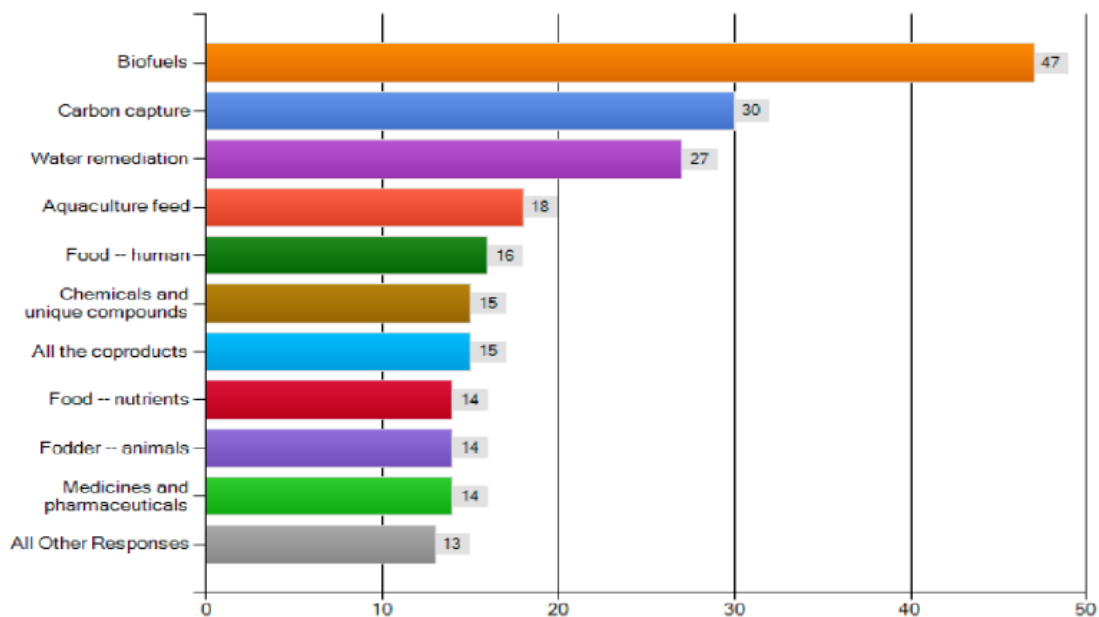
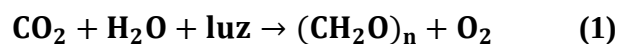


Figura 4 – Indústria do cultivo de algas [10].

2.2.1 - Biofixação de CO₂ usando microalgas

Independentemente da forma como é feito o cultivo das microalgas, ou de qualquer planta, estas podem desenvolver-se por via fotossintética, capturando o dióxido de carbono atmosférico, para na presença de água e luz, o transformarem em hidratos de carbono e oxigénio, de acordo com a equação básica seguinte:



Ou ainda pelo esquema resumido das trocas que se dão ao nível da célula conforme apresentado na figura 5 [22]:

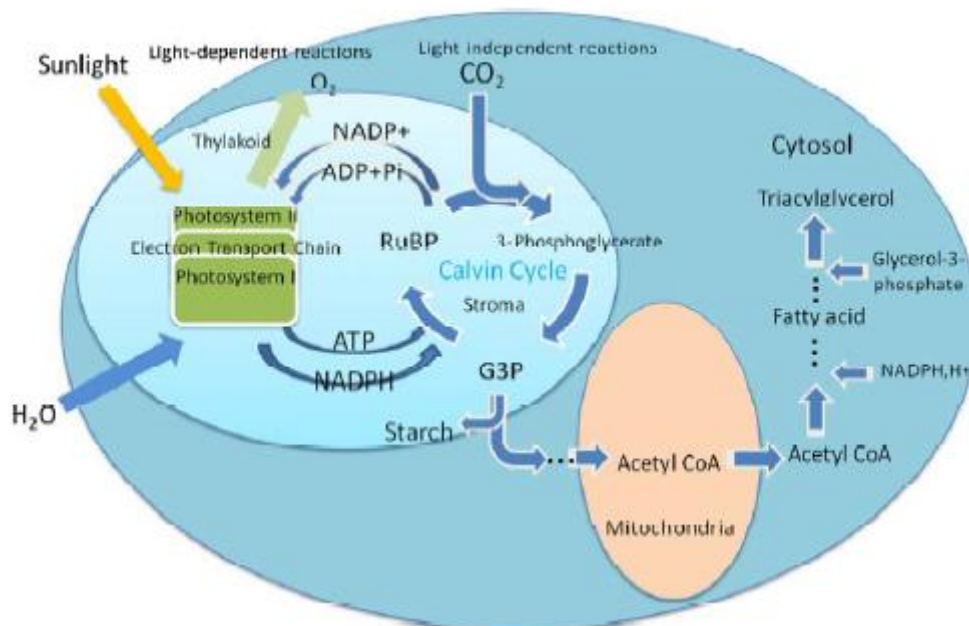


Figura 5 - Esquema da fotossíntese na célula da microalga.

De uma forma mais complexa, a biofixação do CO_2 permite para além da produção de hidratos de carbono, a produção de lípidos, proteínas e ácidos nucleicos. A figura 5 esquematiza a formação destes produtos, bem como, a utilização que pode ser dada à biomassa algal depois de produzida e separada.

Para o sucesso das microalgas na captura e fixação de carbono é necessário que elas tenham um conjunto de características que lhes permitam: adaptação a meios de cultura de baixo custo, fácil obtenção, resistência a contaminações e a toxicidade criada no meio, elevada taxa de crescimento, de captura e de transformação de CO_2 em biomassa, sendo esta biomassa de fácil remoção e capaz de gerar produtos secundários de valor económico. As tabelas 1 e 2 demonstram a capacidade de sequestro de dióxido de carbono e alguns parâmetros de crescimento apresentados por algumas espécies de microalgas.

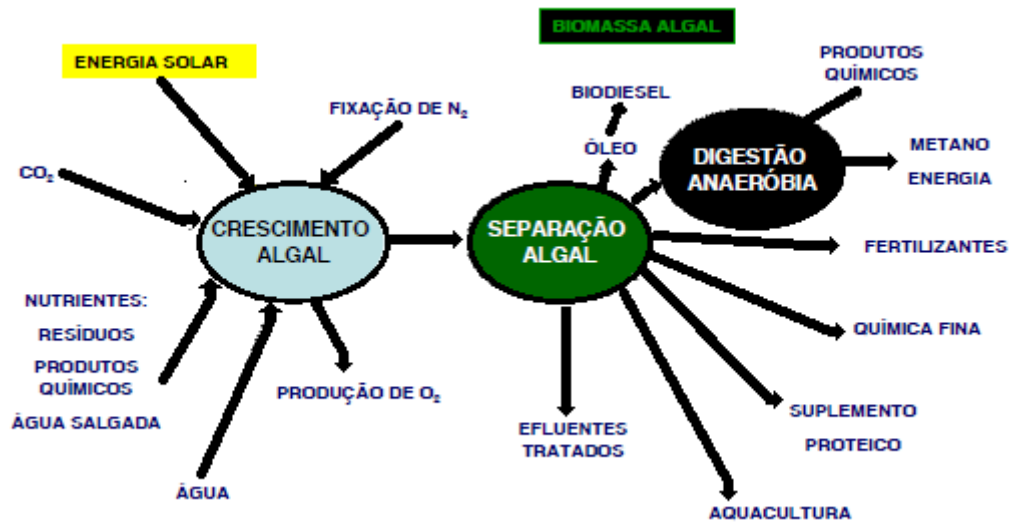
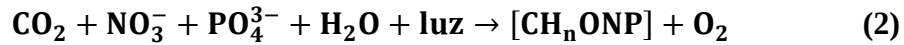


Figura 6 – Captura de CO₂ e utilização da biomassa [1].

Tabela 1 – Sequestro de Carbono por microalgas [23].

Espécie	Produtividade de carbono (Ton/(ha.ano))	CO ₂ equivalente (Ton/(ha.ano))
<i>Chlorella sp</i>	182	667,94
<i>Spirulina sp.</i>	107	392,69
<i>Scenedesmus obliquos</i>	102,7	376,91
<i>Spirulina platensis</i>	44	161,48
<i>Botryococcus braunii</i>	42,8	157,08
<i>Nannochloropsis oculata</i>	32	117,44
<i>Tetraselmis strain</i>	27,37	100,45

Tabela 2 – Propriedades de algumas microalgas [24].

Espécie	T (°C)	pH	%CO ₂	Tempo de duplicação (h)	Observações
<i>Chlorococcum</i>	15-27	4-9	Até 70	8	Taxa de fixação de CO ₂ elevada Cultura de alta densidade
<i>Chlorella</i>	15-45	3-7	Até 60	2,5-8	Crescimento rápido Tolerância a Temperaturas elevadas Cultura dispersa
<i>Euglena gracilis</i>	27	3.5			Conteúdo de aminoácidos elevado Boa digestibilidade Resistente a soluções ácidas Resistente à contaminação
<i>Galdieria sp</i>	>50	1-4	Até 100	24	Elevada resistência ao CO ₂
<i>Viridiella sp</i>	15-42	2-6	Até 100	13	Elevada resistência ao CO ₂ e temperatura Acumulação de grânulos lipídicos na célula

2.2.2 – Cinética de crescimento e necessidades nutricionais

De forma a rentabilizar o potencial de mitigação de CO₂ pelas microalgas é necessário um conhecimento profundo do mecanismo de absorção deste componente e os fatores de que depende. Descrevem-se a seguir fatores importantes como o metabolismo e a dinâmica do crescimento celular, as necessidades nutricionais, a inibição pelo oxigénio, a forma de assimilação do CO₂, a influência da luminosidade e o pH.

2.2.2-1 - Metabolismo celular

Podem-se falar de quatro tipos de metabolismo celular, que dependem dos fatores abióticos representativos do ambiente, e, aos quais diversas microalgas se conseguem adaptar. Assim, segundo Chojnacka & Marquez-Rocha [25], o cultivo pode ser **fotoautotrófico**, quando as fontes de energia disponíveis são a luz e o dióxido de carbono sendo convertida em energia através da fotossíntese, **heterotrófico**, quando a fonte de energia disponível são



compostos orgânicos, **mixotrófico**, quando estão disponíveis quer compostos orgânicos quer luz, e **fotoheterotrófico** quando é necessária a presença da luz para iniciar a obtenção de energia através de compostos orgânicos.

2.2.2.2 - Dinâmica do crescimento celular

Na figura 6 apresenta-se a curva de crescimento típica de uma microalga num sistema fechado. A cheio representa-se a curva de crescimento e a tracejado a curva de redução dos nutrientes no meio.

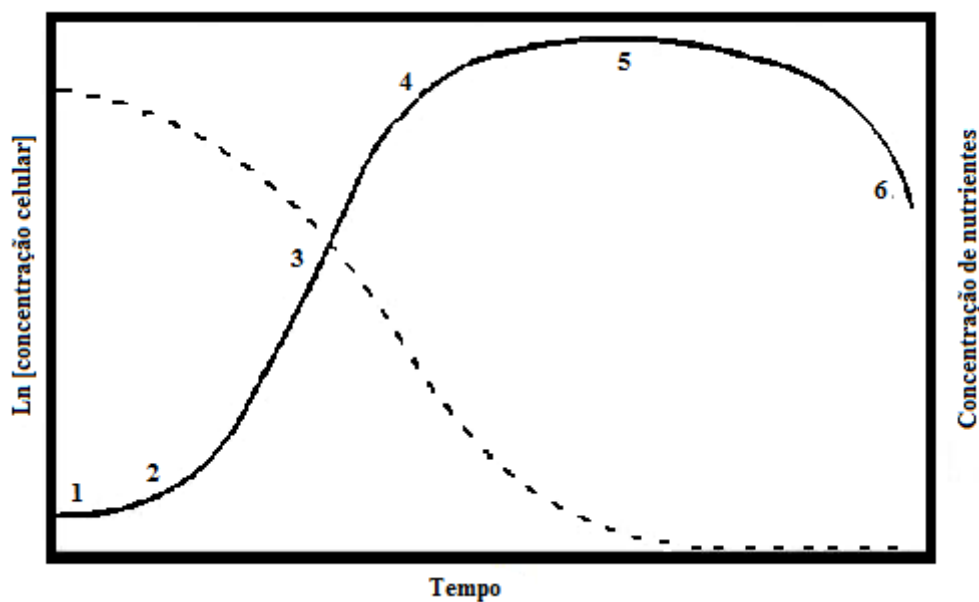


Figura 7 – Crescimento de microalga em função dos nutrientes disponíveis [7].

Podem ser identificadas seis fases de crescimento principais:

- (1) fase *lag* ou de adaptação, é uma fase de intensa atividade celular em que a microalga se adapta ao meio de crescimento mas não ocorre divisão celular, a taxa específica de crescimento é nula;
- (2) fase de aceleração, na qual a taxa de crescimento específico é superior a zero mas inferior à máxima;
- (3) fase de crescimento exponencial, na qual a taxa específica de crescimento máxima é alcançada;
- (4) fase de desaceleração, em que a taxa específica de crescimento começa a diminuir;



- (5) fase estacionária, na qual a concentração celular máxima é atingida e a taxa de crescimento específico é continuamente reduzida até se anular;
- (6) fase de declínio ou morte, em que a taxa de mortalidade supera a taxa de crescimento;

Normalmente as microalgas na fase (3) apresentam elevado teor de proteínas enquanto na fase (5) apresentam mais moléculas de reserva de energia como hidratos de carbono e glicogênio [7].

As microalgas entram na fase estacionária devido principalmente ao esgotamento de nutrientes. Por outro lado na fase de crescimento exponencial existe a quantidade de elementos ideal, tendo a microalga o crescimento e mobilidade máximas [26].

Muitos fatores influenciam o crescimento das microalgas: fatores abióticos como a luminosidade (qualidade e intensidade), temperatura, concentração de nutrientes, O_2 e CO_2 , pH, salinidade e presença de compostos tóxicos; fatores bióticos como a presença de organismos patogénicos (bactérias, fungos e vírus) e a competição com outras microalgas; e fatores operacionais como o atrito provocado pela agitação, taxa de diluição e profundidade, no caso de lagoas a céu aberto [7].

2.2.2.3 - Controlo do crescimento

O crescimento de uma microalga pode ser acompanhado basicamente através de três métodos: contagem direta de microalgas por microscopia; análise gravimétrica, através da pesagem de um determinado volume de microalgas após secagem; e por densidade ótica. Este acompanhamento pode levar a determinação de determinados parâmetros, como sejam a densidade celular máxima, a taxa específica de crescimento e o tempo de cultivo.

O uso da densidade ótica para avaliar o crescimento de microalgas fundamenta-se na obstrução física da luz pelas células. Quanto mais células estiverem presentes na amostra, maior será a absorção de luz (absorvância) e menor será a transmitância (passagem de luz pela amostra). Para esta medição utiliza-se o espectrofotómetro num comprimento de onda normalmente na gama do visível.

Uma vez que as microalgas possuem pigmentos fotossintetizantes, convém seleccionar comprimentos de onda que não correspondam ao pico de absorção de luz pelos pigmentos. Por exemplo, 570 nm, que se situa numa faixa distante da absorção máxima de luz pelas



clorofilas e pelos carotenóides. Assim, a absorvância registrada será pouco influenciada pelos pigmentos fotossintéticos, sendo atribuída, fundamentalmente, à obstrução física da passagem de luz pelas células em suspensão [27].

2.2.2.4 - Necessidades nutricionais

Os vários meios de cultura descritos na literatura foram desenhados de forma a disponibilizar no meio a quantidade de nutrientes necessária ao crescimento celular das microalgas. O carbono, o azoto, o fósforo e o enxofre são os principais constituintes das células. O azoto é dos componentes das bases que constituem o DNA/RNA e é dispensado no meio normalmente na forma de nitrato ou amônia. O fósforo é de importância fulcral, uma vez que é também constituinte do DNA/RNA, apresentando-se ainda na adenosina trifosfato, o ATP, e na membrana celular. O ATP tem um papel fundamental na transferência de energia durante a fotossíntese, sendo este um processo que envolve a participação de proteínas que são sintetizadas nos ribossomas, que são ricos em fósforo. O enxofre, o ferro e outros elementos (oligoelementos) são também fundamentais para o desenvolvimento celular. O enxofre é um componente dos aminoácidos cisteína e metionina, absolutamente necessários para a síntese proteica, sendo que, na sua ausência ela é interrompida. Outros elementos, embora em muito pequenas quantidades, desempenham um papel fundamental nas reações envolvidas na fotossíntese [28]. A fonte de carbono e azoto, o tipo e a intensidade de luz são os principais fatores que podem limitar o crescimento celular fotossintético [29].

2.2.2.5 - Inibição por oxigénio

Certos valores de concentração de oxigénio dissolvido podem fazer com que o crescimento celular seja afetado. Douskova et al. [30] cultivaram a microalga *Chlorella vulgaris* e utilizaram diversas misturas gasosas, todas com 11% de CO₂ variando a percentagem de O₂ de 0 a 19%, e usaram N₂ para completar as misturas. Os resultados indicaram a diminuição das taxas de crescimento da biomassa em função do aumento da concentração de O₂ na mistura gasosa. De acordo com os autores, a diminuição das taxas de crescimento está associada aos fenómenos de fotorrespiração e fotoinibição, que são influenciados pela pressão parcial de O₂ na mistura gasosa fornecida para o meio de cultivo. Para prevenir



essa inibição a concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo não deve exceder em 400% o valor de saturação alcançado na presença de ar, o que pode representar certa dificuldade em sistemas de cultivo tubulares longos, uma vez que a fotossíntese é um processo que efetivamente gera oxigênio, libertando-o para o meio de cultivo [31].

2.2.2.6 - Mecanismos de assimilação de CO₂

A assimilação de dióxido de carbono é feita diretamente através da membrana plasmática. Há evidências que também iões bicarbonato são assimilados da mesma forma. O dióxido de carbono é acumulado na forma de iões bicarbonato devido ao carácter neutro do meio da célula, sendo depois transformado pela enzima anidrase carbónica ficando disponível para o mecanismo da fotossíntese [29].

2.2.2.7 - Influência da luminosidade

A importância da luminosidade dá-se apenas quando este é o fator limitante, ou seja, se os nutrientes fornecidos pelo meio e o carbono inorgânico forem fornecidos em excesso, aí a luz torna-se importante, sendo a produção de biomassa tanto maior quanto maior for o tempo de exposição à luminosidade [32].

As plantas superiores estão muito mais dependentes da luz que as microalgas, de acordo com Watanabe & Hall [33], a microalga *Spirulina latensis* cultivada em fotobiorreator iluminado por lâmpadas fluorescentes e alimentado com ar enriquecido com 4% de CO₂ apresentou um aproveitamento de apenas 6,8% da totalidade da luz fornecida.

O aumento da intensidade luminosa pode inclusivamente causar um fenómeno de fotoinibição, uma vez que a partir de dado momento dá-se a saturação luminosa não havendo mais aumento de crescimento celular. No entanto, um estudo em *Chlorella vulgaris*, em que se fizeram dois ciclos de luz, um de 24 horas com luz e outro de 12 horas de luz 12 horas de escuro, demonstrou, que para esta microalga, o ciclo de luminosidade contínua apresentou uma maior taxa de crescimento que o ciclo claro-escuro [20].

Jacob et al [34], concluíram, no cultivo de *Aphanothece microcopica Nageli*, que obtinham máxima taxa de fixação de CO₂ quando estas microalgas eram sujeitas a exposição contínua à luz. Em culturas com alta concentração celular, por outro lado, a penetração da luz no meio de cultivo é prejudicada e pode levar à limitação do crescimento [31].



2.2.2.8 - pH

O carbono orgânico disponível em meio aquoso pode-se apresentar nas formas de carbonato, bicarbonato e dióxido de carbono, consoante o pH do meio. Um pH mais alcalino favorece as formas bicarbonato e carbonato e um pH mais ácido favorece o dióxido de carbono. Um estudo em *Chlorella vulgaris* em que se observou o crescimento celular num intervalo de 3-11 de pH, permitiu chegar a conclusão que o crescimento era máximo para valores de pH compreendidos entre 5 e 8 [21,35].

2.3 - Cultivo de microalgas

O cultivo de microalgas pode ser feito em sistemas abertos ou fechados, de forma autotrófica ou por fermentação heterotrófica utilizando a glucose (ou outro composto orgânico) como fonte de carbono e energia. No presente trabalho, interessa-nos tão somente a via autotrófica, uma vez que nos interesse remover dióxido de carbono inorgânico na presença de luz. Se a cultura for feita em meios abertos, estes designam-se por lagoas *raceway*, caso contrário o termo utilizado é fotobiorreator, em ambos, são dadas condições a organismos fotoautotróficos, de forma a que produzam biomassa a partir da fotossíntese [7].

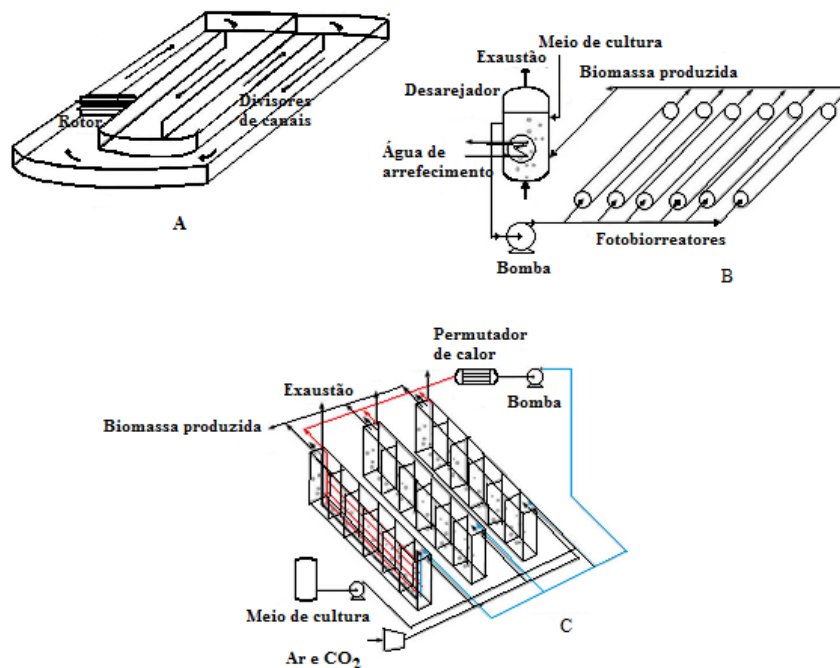


Figura 8 - Representação esquemática de três sistemas de cultivo de microalgas em larga escala: (A) lagoa *raceway*; (B) fotobiorreatores tubulares e (C) fotobiorreatores de placas paralelas [36].

A Figura 8 apresenta a representação gráfica de um sistema de cultivo aberto (lagoa *raceway*) e de dois sistemas fechados (fotobiorreator tubular e fotobiorreator de placas).

A Tabela 3 apresenta uma comparação entre os fotobiorreatores e os sistemas abertos de cultivo em relação a diversas condições e variáveis de cultivo [7].

Tabela 3 – Comparação entre sistemas abertos e fechados [7].

Variável	Fotobiorreator	Sistema aberto
Controlo de contaminação	Fácil	Difícil
Risco de contaminação	Reduzido	Alto
Esterilidade	Alcançável	Impossível
Controlo do processo	Fácil	Difícil
Controlo das espécies	Fácil	Difícil
Agitação	Uniforme	Baixa
Regime de operação	<i>Batch</i> ou contínuo	<i>Batch</i> ou contínuo
Razão Área/Volume	Alto (20-200 m ⁻¹)	Baixo (5-10 m ⁻¹)
Concentração celular	Alto	Baixo
Investimento	Alto	Baixo
Custo de operação	Alto	Baixo
Eficiência da utilização da luz	Alta	Baixa
Controlo da temperatura	Alcançável	Difícil
Produtividade	3-5 vez mais produtivo	Baixo
Tensão hidrodinâmica nas células	Baixa-Alta	Muito Baixa
Evaporação do meio de cultura	Baixa	Alta
Controlo de transferência gasosa	Alto	Baixo
Perda de CO ₂	Depende da alcalinidade, pH...	Depende da alcalinidade, pH...
Inibição por O ₂	Grande problema	Menor que no Fotobiorreator
<i>Scale-up</i>	Difícil	Difícil

Schenk et al. [37], revelam nos seus trabalhos que os altos custos associados aos fotobiorreatores são largamente compensados pela maior produtividade de biomassa. Apesar disso, existe ainda uma lacuna entre o desenvolvimento de um fotobiorreator que forneça as condições ótimas para o crescimento da biomassa e que seja economicamente viável para promover o cultivo industrial. Ainda de acordo com esses autores, o custo de construção de fotobiorreatores é dez vezes maior que o de sistemas abertos. Por outro lado,



o custo de produção de biomassa em fotobiorreatores tubulares é 22% menor do que em lagoas *raceway* [31]. A produtividade volumétrica de fotobiorreatores em geral é 8 vezes maior que a alcançada em lagoas *raceway*, enquanto a concentração celular típica de um fotobiorreator é 16 vezes maior que aquela alcançada em lagoas *raceway* [7].

2.3.1 – Sistemas abertos

As lagoas naturais podem ser utilizadas para a obtenção de microalgas, no entanto, vários estudos têm sido feitos de forma a otimizar a produção de biomassa em lagoas *raceway*. Estas lagoas são constituídas por um conjunto de canais que permitem a recirculação da biomassa e do meio de cultivo. A circulação e a agitação das microalgas são conseguidas recorrendo a um motor com pás sendo o fluxo guiado por chicanas colocadas nos canais de escoamento. Ao contrário dos fotobiorreatores não são utilizados materiais transparentes pelo que se pode fazer a sua construção com um menor investimento. Em funcionamento contínuo, é, durante o período luminoso, continuamente alimentado meio de cultivo imediatamente após o motor, sendo retirada biomassa imediatamente antes do motor. Este motor é mantido a trabalhar continuamente de forma a evitar a decantação da biomassa. Existe atualmente bastante *know-how* sobre esta forma de cultivo, uma vez que já é utilizado para produção a larga escala desde a década de 1950.



Figura 9 - Produção industrial do microalgas em lagoas *raceway* [10].



Figura 10 - Lagoas *raceway* utilizadas em investigação [10].



As lagoas *raceway* são mais baratas que fotobiorreatores, por apresentarem menores custos de construção e de operação, e podem ser facilmente limpas, sempre que necessário, para retirar o biofilme acumulado nas paredes dos canais. Apesar do menor custo, elas apresentam produtividade de biomassa baixa, ocupam grandes áreas e não podem ser operadas por longos períodos devido aos problemas de contaminação [31].

2.3.2 – Fotobiorreatores

Os fotobiorreatores são sistemas de cultivo mais flexíveis que as lagoas. Apresentam-se sob diversas formas, forma estas passíveis de serem otimizadas consoante as características biológicas e fisiológicas da espécie de interesse, além de permitir o cultivo de algumas espécies que apresentam problemas em sistemas abertos.

Fotobiorreatores de coluna de bolhas, podem incorporar CO₂ no meio, através de difusores colocados no fundo que difundam pequenas bolhas e que ao mesmo tempo agitam a cultura. Pensa-se que estes são o melhor tipo de reatores para cultura em larga escala. Estes reatores permitem uma maior homogeneidade face a reatores de coluna comuns. Têm um rácio área de superfície/volume baixo, o que permite menores flutuações de temperatura, e menores efeito de fotoinibição durante períodos solares mais longos.

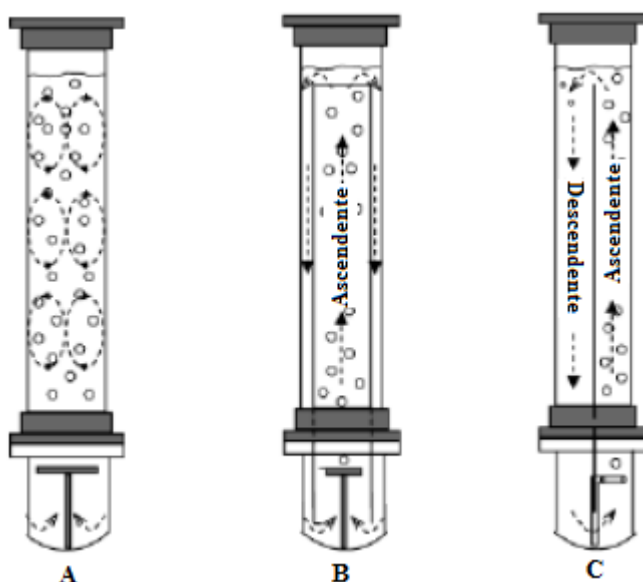


Figura 11 – Fotobiorreatores de bolhas [38]:

A - Coluna;

B - Air-lift de circulação interna;

C - Air-lift de circulação externa;

Nos fotobiorreatores não há contacto direto com o ar atmosférico externo diminuindo-se assim possíveis contaminantes (microrganismos, poeira, etc.). As espécies estão também mais protegidas uma vez que não têm a incidência direta da luz.

As vantagens dos fotobiorreatores sobre os sistemas de cultivo abertos incluem o facto de permitirem melhor controlo sobre as condições de cultivo (pH, temperatura, agitação, concentração de CO₂ e O₂), menor evaporação de água do meio de cultivo, redução das perdas de CO₂, possibilidade de sustentar cultivos com concentração celular e produtividade volumétrica de biomassa maiores e serem um ambiente mais seguro e protegido para evitar a contaminação por outros microrganismos. Por outro lado, as principais limitações são a possibilidade de sobreaquecimento, a acumulação de oxigénio, dimensionamento difícil e os elevados custos de construção [7,17].



Figura 12 - Produção industrial do microalgas em fotobiorreatores [10].

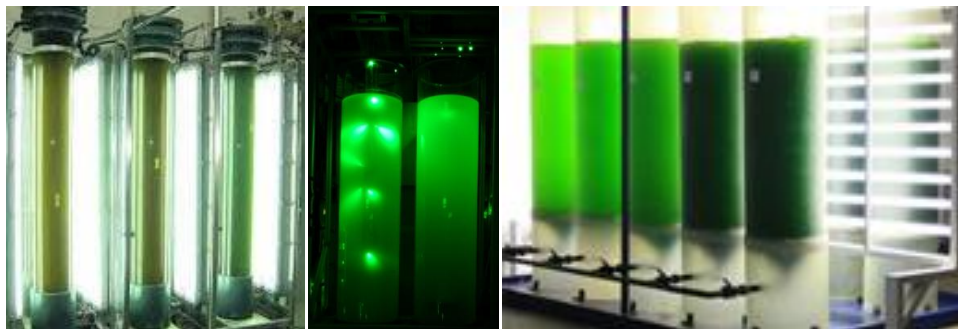


Figura 13 - Fotobiorreatores utilizados em investigação [10].



2.3.2-1 – Operação em fotobiorreatores

Os fotobiorreatores tubulares apresentam grande área de exposição à luz o que geralmente resulta em grande produtividade de biomassa, sendo que seu dimensionamento não é fácil face à possibilidade de ocorrência do fenómeno de fotoinibição (causada pela alta intensidade luminosa) e também pela ocorrência de zonas escuras que se podem formar no interior de fotobiorreatores com alta densidade celular. Devido ao facto da altura e do diâmetro não poderem ser muito grandes, um grande número de unidades são requeridas para possibilitar o cultivo em larga escala.

Os fotobiorreatores podem ser operados em modo descontínuo (*batch*) ou em modo contínuo. As vantagens da operação em modo contínuo incluem a possibilidade de regular e manter as taxas de crescimento por longos períodos, a possibilidade de controlar a concentração da biomassa variando a taxa de diluição, a obtenção de produtos mais uniformes devido ao estado estacionário atingido, e a maior facilidade de modelação e aplicação de ferramentas para otimização do sistema. Por outro lado, há desvantagens inerentes a esse modo de operação que podem torná-lo inviável para alguns tipos de reações biológicas, como a dificuldade de controlar a formação de produtos não associados ao crescimento, o crescimento de biofilmes nas paredes e a agregação celular, que podem provocar diminuição da produtividade. Além disso, períodos longos de cultivo aumentam o risco de contaminação [7].

Um fator que reduz os custos de cultivo é a utilização da luz solar como fonte de iluminação, apesar de se ter que ter em conta o clima e a variação da intensidade luminosa quer diária quer anualmente. O aumento de biomassa é em geral contínuo durante o dia, diminuindo durante a noite em cerca de 25%, face ao metabolismo respiratório. Esse valor pode variar de acordo com o nível de luminosidade com o qual a biomassa foi cultivada, a temperatura de cultivo e a temperatura durante a noite. A iluminação pode ser feita artificialmente, mas como é óbvio aumenta os custos de exploração, podendo ser usada para a produção em larga escala quando o produto de interesse é de alto valor agregado [31].

Apesar da grande variedade de microalgas existente e dos diversos estudos académicos no sentido de encontrar as melhores condições para a fixação de CO₂, as taxas de fixação continuam a ser muito baixas o que implica a utilização de instalações de grande capacidade. É importante encontrar espécies de crescimento rápido, o que por outro lado



implica uma menor utilização da luz face a elevada densidade celular atingida. Em muitos casos a alta concentração celular pode reduzir a eficiência fotossintética devido aos efeitos de zonas de escuro formadas justamente devido à alta concentração celular presente [39].

Diversos fatores operacionais podem ser estudados visando à otimização de um fotobiorreator. Por exemplo, Ryu et al. [40] estudaram o efeito da concentração de CO₂, taxa de arejamento, tamanho das bolhas e uso de chicanas sobre a eficiência de utilização de CO₂ pela microalga *Chlorella* sp. cultivada em fotobiorreatores de coluna de bolhas. Concluíram que o aumento da taxa de CO₂ levou a um aumento do crescimento celular, face ao aumento do carbono disponível. O aumento do arejamento também levou ao aumento do crescimento celular, tendo-se, no entanto, verificado que a absorção de CO₂ pelas células tenha diminuído. A utilização de chicanas e de diminuição do tamanho das bolhas de CO₂ também aumentou a biomassa uma vez que aumentou o tempo de residência no reator e a transferência de massa entre gás-líquido.

A otimização das condições de cultivo para uma estirpe específica apresenta grande complexidade, uma vez que muitos fatores inter-relacionados podem ser os limitantes. Estes fatores incluem a temperatura, a agitação, o tamanho e distribuição das bolhas de gases, as trocas gasosas, a transferência de massa, a intensidade e o ciclo luminoso, a qualidade da água, o pH, a salinidade, a quantidade de minerais e carbono disponíveis, a fragilidade celular, a concentração celular e a presença de inibidores de crescimento [37].

De acordo com Jacob-Lopes et al. [41], a eficiência de utilização de CO₂ (redução da perda de CO₂ na exaustão do sistema) pode ser aumentada através da recirculação do CO₂ no sistema e do uso de fotobiorreatores em série. Nessas condições, porém, as taxas volumétricas de consumo de CO₂ (gcarbono/(m³reator.dia)) são reduzidas devido à diminuição da disponibilidade de CO₂ para as células. Estes resultados foram obtidos durante o cultivo da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli em fotobiorreator tubular de coluna de bolhas e em fotobiorreator tipo *airlift*. Ainda de acordo com esses autores, o O₂ gerado pela reação fotossintética tende a acumular-se no sistema com recirculação de gases e deve, portanto, ser removido, uma vez que altas concentrações de O₂ podem levar à inibição do crescimento.



2.4 - Recuperação da biomassa algal

A principal característica da biomassa produzida é a elevada quantidade de água que contém e que tem que lhe ser removida para a sua posterior utilização. Existem diversos métodos para a execução deste processo de separação destacando-se entre eles a floculação, a microfiltração e a centrifugação. A escolha do processo mais eficiente terá que entrar em conta com o consumo energético mais baixo, de forma a viabilizar como um todo o processo de biofixação de CO₂ por microalgas. Sendo assim, torna-se muito relevante a escolha da microalga a utilizar e deve-se ter em conta a facilidade de recuperação da biomassa gerada, uma vez que a biomassa de algumas espécies é muito mais fácil de recuperar que a de outras [37].

Molina Grima et al. [42], referem que a recuperação da biomassa pode ser feita por mais que uma etapa, envolvendo mais que um processo de separação. À semelhança do que se faz no tratamento primário de efluentes, pode-se fazer uma floculação seguindo-se uma sedimentação gravítica. O principal problema da recuperação da biomassa é o tamanho das microalgas, que se encontram em suspensão em meios muito diluídos (<0,5kg de biomassa seca/m³). Estima-se que esta recuperação tenha uma parcela de 30-40% no custo total de produção celular. Um fator importante a ter em conta é destino final da biomassa, pois um menor grau de humidade implicará necessariamente mais custos. Caso seja necessário uma secagem térmica é de prever sempre uma operação de separação mecânica antes.

Mata et al. [7], sugerem que o principal critério para a escolha de um método adequado de recuperação é a qualidade do produto final. Assim, para produtos de baixo valor agregado a sedimentação pela ação da gravidade pode ser usada, possivelmente acompanhada de uma etapa de floculação. Um exemplo é o uso de tanques de sedimentação para recuperação de biomassa gerada em processos de tratamento de efluentes. Por outro lado, para produtos de alto valor agregado, como a recuperação de biomassa para aplicações em aquacultura ou para alimentação (humana ou animal), é geralmente recomendado o uso de centrífugas contínuas, que podem processar grandes volumes de biomassa. Apesar do elevado custo envolvido, a centrifugação é satisfatória para a rápida concentração de qualquer tipo de microrganismo. Além disso, centrífugas podem ser facilmente limpas ou esterilizadas para evitar a contaminação por microrganismos indesejados.

A filtração, operada sob pressão ou sob vácuo é o melhor método para a recuperação de microalgas filamentosas e relativamente grandes, como a *Spirulina platensis*. Para a



recuperação de células pequenas de microalgas como *Chlorella* e *Dunaliella*, a filtração convencional não é adequada, tendo-se que recorrer à microfiltração ou ultrafiltração por membranas [28].

Tabela 4 – Métodos de separação da biomassa [24].

Método	Positivo	Negativo
Centrifugação	Viável para produtos de alto valor económico / produção em larga escala Processamento rápido de grandes quantidades Não há perda de biomassa Adequado para praticamente todas as espécies de microalgas	Grande necessidade energética Processo oneroso
Filtração	Bom para microalgas grandes	Processo lento Inadequado para microalgas de tamanho reduzido
Sedimentação gravítica	Boa para produtos de baixo valor Pode ser melhorada se se usar floculação prévia	Grande quantidade de humidade
Floculação – Sedimentação	Os floculantes são baratos, não são tóxicos e bastante utilizada quando as concentrações de biomassa são baixas Não necessita de grande agitação Pode necessitar de apenas pequenos ajustes de pH	
Desidratação – Secagem	Preserva a biomassa Utilizada para produtos de grande valor acrescido	Grande necessidade energética Processo oneroso

Adicionalmente, Li et al. [17] apresentam a floculação como um processo de baixo custo, mas em contrapartida muito demorado o que poderá levar a destruição dos compostos que se querem comercializar. A filtração e centrifugação são métodos mais eficientes, mas com um elevado custo, sendo a escolha do processo baseada na qualidade do produto final.



Chisti [31], concluiu que a forma como a microalga é cultivada também é muito importante para a posterior recolha da biomassa. As microalgas criadas em fotobiorreatores apresentam uma concentração de cerca de 30 vezes superior às criadas em lagoas, o que torna mais fácil a sua recuperação.

O último passo da produção da biomassa é a sua secagem. Existem vários métodos para esta finalidade como *spray-drying*, *sun-drying*, *freeze-drying* and *vacuum-drying*, entre outros. Para produzir biomassa com qualidade farmacêutica ou alimentar, o método aconselhado é o *spray-drying*. As desvantagens deste método são o grande investimento inicial associados e os custos operacionais, mas têm a vantagem de produzir biomassa de pureza elevada [24].

Após a etapa de recuperação da biomassa é necessário uma etapa de rotura das células, uma vez que se torna necessário recuperar o metabolito intercelular de interesse comercial. De acordo com Mata et al. [7], diversos métodos podem ser usados dependendo da rigidez da parede celular e da natureza do produto a ser obtido. Estes métodos podem ser baseados na ação mecânica (homogeneizadores, moinhos, ultrassom, autoclave) ou na ação não-mecânica (congelamento, choques osmóticos ou de solventes orgânicos e reações enzimáticas, ácidas ou básicas).

A figura seguinte representa um diagrama de blocos simplificado, para a produção de biomassa algal. O tratamento final depende do produto final, podendo passar por uma queima direta, a extração do óleo ou a rotura das células para recuperação de compostos de elevado valor acrescentado.

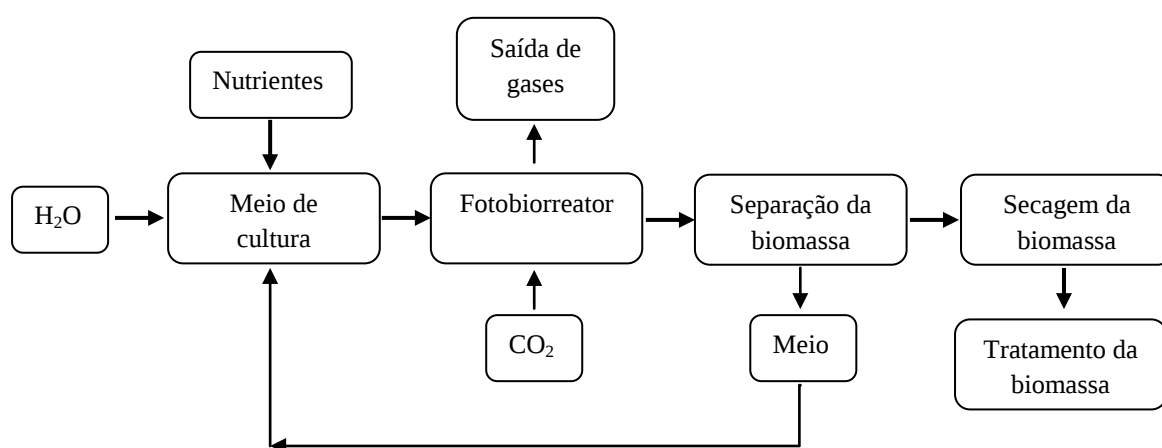


Figura 14 – Diagrama de blocos para a produção de biomassa algal.

2.5 - Microalgas para o tratamento de efluentes

Os efluentes industriais têm sido utilizados como meio de cultivo de microalgas. As vantagens são claras, diminuem-se os custos de produção de microalgas e ao mesmo tempo trata-se o efluente.

Villasclaras et al. [43], cultivaram *Chlorella pyrenoidosa* e *Scenedesmus obliquus* com efluente de um lagar de azeite. Este cultivo ocorreu de forma mixotrófica uma vez que para além da fonte de carbono do efluente foi realizado sob luz solar.

As microalgas podem, desta forma, ser utilizadas para o tratamento simultâneo de efluentes líquidos e gasosos, aproveitando os nutrientes dos efluentes líquidos e dióxido de carbono de gases de combustão. O desenvolvimento desta tecnologia resolveria problemas de ordem ambiental, servindo ainda para a produção de microalgas a baixo custo [44].

Yun et al. [45] utilizaram *Chlorella vulgaris* para tratarem simultaneamente os efluentes líquidos e gasosos de uma indústria de aço. Os resultados demonstraram que a vazão de efluente líquido de 11233 m³/dia poderia promover a fixação de 23100 kgCO₂/dia e que aproximadamente 12430 kg de biomassa de microalgas poderiam ser produzidos diariamente.

2.5.1 - Efluentes gasosos

As microalgas podem utilizar no seu crescimento celular fontes de carbono de diferentes origens. No que diz respeito ao dióxido de carbono elas podem utilizá-lo diretamente da atmosfera, de gases efluentes industriais ou na forma de bicarbonatos ou carbonatos dissolvidos em determinado meio. A atmosfera contém somente 0,03-0,06% de dióxido de carbono o que provoca um crescimento algal muito lento, no entanto, os efluentes gasosos industriais contém uma percentagem significativa de dióxido de carbono, o que torna viável a utilização de microalgas para a sua biofixação [28]. Existem ainda microalgas que toleram temperaturas altas, o que representa mais um ponto positivo para o tratamento de efluentes gasosos, normalmente gases quentes [17,28].

De acordo com Douskova et al. [30], o custo de dióxido de carbono é uma parcela importante no custo total da produção de microalgas. Estes autores cultivaram a microalga *Chlorella vulgaris* utilizando como fonte de CO₂ o gás efluente de uma instalação de incineração de lixo urbano. Desta forma baixa-se a emissão de CO₂, obtendo-se o mesmo a



custo zero para produção algal. O gás efluente utilizado apresentava concentração de CO₂ variando na gama 11-13% (v/v), de O₂ de 8-10% (v/v), de N₂ de 79-80% (v/v) e pequenas quantidades de CO, SO₂, NO_x, HCl, HF, NH₃, carbono orgânico e metais pesados. A produtividade volumétrica de geração de biomassa alcançada utilizando este gás efluente foi de 2,5 g/L/dia, maior que a atingida na condição de cultivo de controlo (mistura de CO₂ puro e ar, com concentração de CO₂ de 11% v/v), na qual a produtividade alcançada foi de 1,7 g/L/dia.

A utilização do CO₂ proveniente dos efluentes gasosos para promover o crescimento da biomassa de microalgas pode ser feita de dois modos, Maeda et al. [2]: o uso do dióxido de carbono separado do efluente gasoso, o que implica uma operação de separação prévia, ou o uso direto do dióxido de carbono proveniente dos gases de combustão, o que pode trazer problemas com altas temperaturas, outros componentes destes gases e pouco controle na concentração de CO₂. No entanto, estes mesmos autores obtiveram resultados muito favoráveis com a microalga *Chlorella* sp. a ser cultivada a 35 °C na presença de efluente gasoso de uma termoelétrica a base de carvão (composição do efluente gasoso: 13% de CO₂, 5% de O₂, 10 ppm de SO₂ e 150 ppm de NO_x).

Kadam [46], fez a avaliação económica da mitigação de CO₂ resultante dos gases de uma central termoelétrica a carvão, e concluiu que o custo associado à utilização do gás aumentava em 40% o custo total, relativamente à injeção de CO₂ puro, constatando porém que a central termoelétrica se encontrava muito longe do local de produção da biomassa algal, justificando este resultado. No entanto, entrando em conta com a produção de biodiesel com a biomassa cultivada, chegou à conclusão que o processo era economicamente viável.

Chae et al. [47] utilizaram a microalga *Euglena gracilis* em escala piloto, para remoção do CO₂ proveniente da queima de querosene de um secador industrial, em fotobiorreator na presença de luz solar. O gás efluente usado continha 11% de CO₂ (v/v), 26 ppm de óxidos de nitrogênio (NO_x), 5 ppm de óxidos de enxofre (SO_x) e 126 mg/m³ de sólidos suspensos. Mostraram conseguir gerar 113,8 g/m³/dia de biomassa. Além disso, não foram observados efeitos de inibição ao crescimento celular pela presença de NO_x e SO_x.



Otsuki [48] realizou a análise de viabilidade de implantação de uma planta industrial de biofixação de CO₂ a partir do cultivo de microalgas em fotobiorreatores de placas. O sistema foi aplicado para tratar os gases efluentes de uma central termoelétrica movida a gás natural com potência de 1000 MW. Neste sistema o caudal de gases efluentes gerados é de $8,87 \times 10^9$ m³/ano, a emissão de CO₂ é de $1,74 \times 10^6$ toneladas CO₂/ano e a concentração de CO₂ é de 10% (v/v). O sistema foi projetado para atingir uma taxa de fixação de 50 g CO₂/(m².dia) e seria composto de 580 fotobiorreatores de placas quadradas de lado igual a 2,3 m. A avaliação do sistema demonstrou que o balanço de CO₂ era positivo, ou seja, a quantidade de CO₂ fixada pelo sistema era maior que as emissões geradas pelo mesmo. Além disso, o consumo de energia do sistema foi menor do que a energia acumulada nas células através da síntese bioquímica.

2.5.2 - Efluentes líquidos

A utilização de microalgas no tratamento de efluentes líquidos simultaneamente com o seu cultivo traz diversas vantagens, nomeadamente a remoção, por algumas espécies de azoto, fósforo e metais pesados, melhorando a qualidade de um efluente após um tratamento secundário. Para além desta vantagem, apresenta ainda uma redução de custos em azoto e fósforo, presentes nos meios de cultivo, havendo ainda uma poupança de água [7,28].

Lau et al. [49], verificaram nos seus estudos com *Chlorella vulgaris* para tratamento de um afluente urbano, que as taxas de crescimento das microalgas eram menores do que quando estas microalgas eram cultivadas em meio sintético. Verificaram também que a fase *lag* era bastante maior o que pressupõe uma adaptação ao meio.

Esses autores sugerem que a melhor escolha para o tratamento de efluentes que utilizem microalgas é usar altas concentrações iniciais destes microrganismos para minimizar o tempo de retenção hidráulica.

Kaya et al. [50] relataram que dentre os fatores ambientais que afetam o crescimento da biomassa de microalgas, a disponibilidade de CO₂ é usualmente um fator limitante.



2.6 - Uso da biomassa algal

A biomassa gerada por microalgas, macroalgas ou por qualquer outra planta superior, pode servir para gerar produtos de grande interesse económico e ambientalmente sustentáveis, tornando-se no que se chama atualmente, uma biorrefinaria [17].

Tal como uma refinaria de petróleo, uma biorrefinaria usa cada um dos componentes da biomassa para produzir produtos de relevância comercial.

Tabela 5 - Comparação de matérias primas atuais com a biomassa [51].

Petróleo, carvão, gás natural	Biomassa
Não renováveis	Renovável
Não sustentável	Sustentável
Fortes emissões de CO ₂	Neutro
Emissões de metano, óxidos de enxofre e azoto, hidrocarbonetos	Baixas emissões de metano, óxidos de enxofre e azoto, hidrocarbonetos
Disponível em alguns países	Disponível em todos países
Tecnologia madura	Tecnologia não madura

O conceito de biorrefinaria compreende a utilização de todos os componentes da biomassa, baixando-se por isso o custo de produção de cada um dos produtos.



Figura 15 - Biorrefinaria industrial (USA) – Cargill-Dow NatureWorks Biorefinery [51].

Uma biorrefinaria de microalgas, dependendo da microalga utilizada, pode dar origem a produtos tão variados, como o biodiesel, o bioetanol, rações, produtos farmacêuticos, produtos alimentares, entre muitos outros [31]. Esta variedade de produtos e o seu valor comercial, promovem também a viabilidade do sequestro de dióxido de carbono no cultivo da biomassa [52].

A biomassa algal já é conhecida desde 1950, pelas suas propriedades que lhe proporcionam para aplicações farmacêuticas, cosméticas e de alimentação humana e animal [53], no entanto, devido aos elevados custos de produção ela é pouco utilizada.

Estudos indicam que a biomassa algal contém todos os aminoácidos essenciais, ácidos gordos insaturados, hidratos de carbono, fibra alimentar e uma larga gama de vitaminas e outros compostos bioativos, portanto, é claramente indicada para alimentação humana e animal. Tem ainda a vantagem de não lhe estarem associados subprodutos como casca e raízes, e que existem nas plantas superiores. Outra vantagem é poderem ser cultivadas em qualquer local não competindo com as atividades agrícolas [30].

Gouveia & Empis [54] concluíram que a biomassa de duas microalgas (*Chlorella vulgaris* e *Haematococcus pluvialis*) era uma fonte natural e relativamente concentrada de carotenóides comestíveis, que são pigmentos naturais que apresentam capacidade antioxidante.

2.6.1 - Microalgas para produção de energia

A biomassa para produção de energia representa uma alternativa bastante atrativa relativamente aos métodos que utilizam combustíveis fósseis. A energia solar é captada pelas plantas, podendo estas depois serem usadas para produção energética. Se a biomassa for processada de maneira eficiente, ela pode gerar energia e substituir fontes fósseis convencionais.

Já no início dos anos 70, quando o preço do petróleo disparou, as microalgas foram estudadas para produção de energia, no entanto, com os conhecimentos técnicos da época, o custo da sua produção era proibitivo. No entanto, e com o avanço tecnológico dos últimos 15 anos, as microalgas começam a ser encaradas como uma muito credível alternativa ao petróleo [17].



Algumas microalgas geram a nível celular, concentrações importantes de celulose, amido e óleos, A partir destes substratos é possível produzir bioetanol ou biodiesel para produção de combustível, sendo esta alternativa cada vez mais consistente [37].

Há várias maneiras de transformar a biomassa em biocombustível. Wang et al. [28] classifica-as essas técnicas em quatro grupos: conversão bioquímica, reação química, combustão direta e conversão termoquímica.

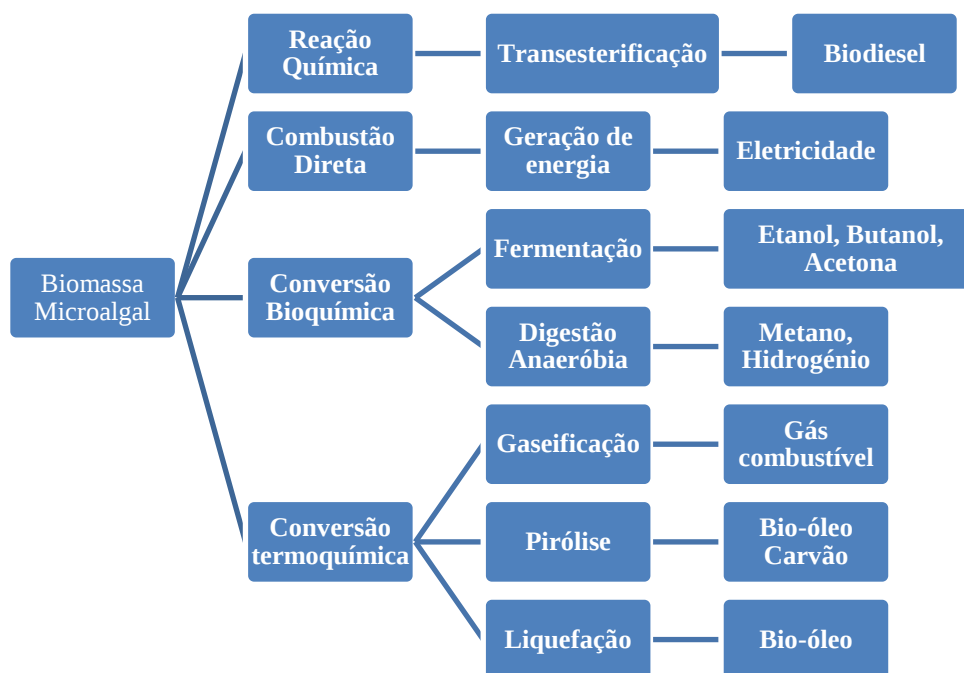


Figura 16 – Formas de converter biomassa algal em biocombustível [28].

A combustão direta é a queima da biomassa em caldeiras ou turbinas a vapor, sendo que esta queima é tão mais eficiente quanto menor for a humidade contida na biomassa [55].

A digestão anaeróbia é a formação de metano e CO₂ pela degradação da biomassa por bactérias anaeróbicas.

A pirólise envolve o processamento da biomassa a alta temperatura na ausência de oxigénio, resultando numa mistura de produtos distribuídos nas fases sólida, líquida e gasosa. A fase líquida é uma mistura complexa chamada de bio-óleo, que tem demonstrado potencial para a geração de energia por processos de combustão externa, combustão interna (motores diesel) e também pela queima conjunta com diesel ou gás natural [17].

A gaseificação é a pirólise em alta temperatura para privilegiar a formação da fase gasosa. A liquefação é um processo catalítico operado em baixa temperatura e pressão alta para a obtenção de bio-óleo a partir de biomassa húmida [55].

Processos termoquímicos de conversão (liquefação ou gaseificação) da biomassa de microalgas têm sido estudados por diversos autores [56].

Adicionalmente, processos fermentativos podem ser usados para converter os hidratos de carbono presentes na biomassa em bioetanol [57].

2.6.2 - Produção de biodiesel

O biodiesel é um produto fabricado a partir de óleos com origem em plantas, ou mesmo em óleo já utilizado promovendo a sua reciclagem, e é uma alternativa ao gasóleo obtido através do petróleo. Estudos indicam que tem as mesmas características do gasóleo mas um menor efeito ambiental, visto que as emissões de material particulado, monóxido de carbono, hidrocarbonetos e óxidos de enxofre são menores [19].

A produção de biodiesel tem vindo a aumentar na Europa, como se pode ver no gráfico seguinte:

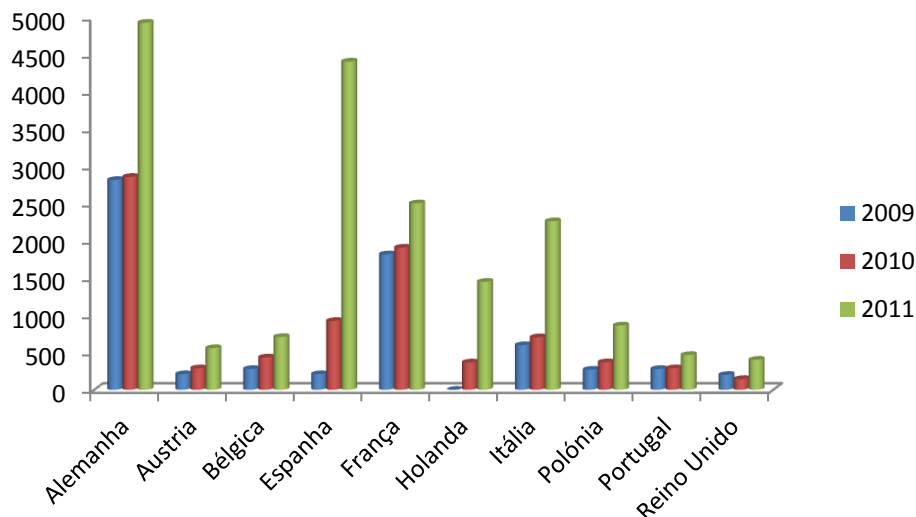


Figura 17 – Produção de Biodiesel na Europa (valores em tonelada) [58].



Igual tendência tem-se verificado no resto do mundo. A seguir representa-se a evolução do biodiesel nos EUA.

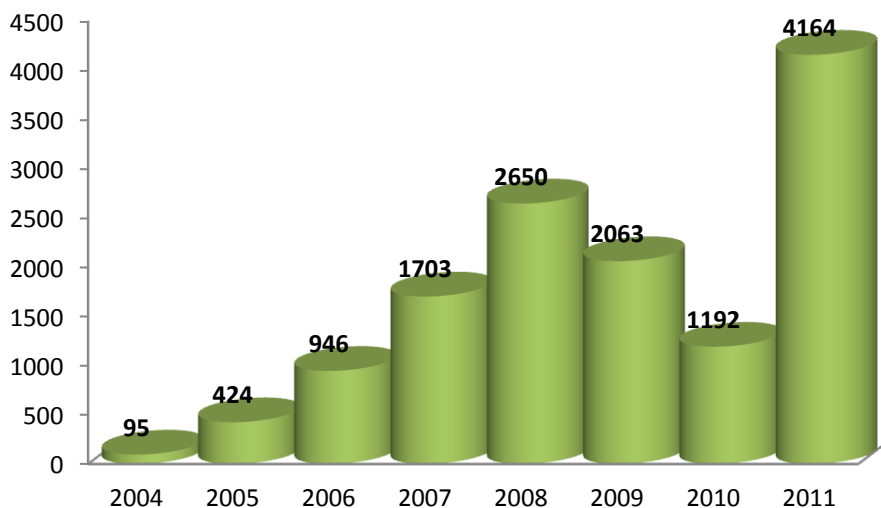


Figura 18 – Produção de Biodiesel nos EUA (milhões de litros) [59].

O biodiesel é produzido por um processo conhecido como transesterificação, que consiste na reação química entre uma gordura, ou óleo, e um álcool, na presença de um catalisador. O produto da reação é uma mistura de ésteres metílicos, chamada de biodiesel, e glicerol, que por si só é um produto com elevado valor económico [60].

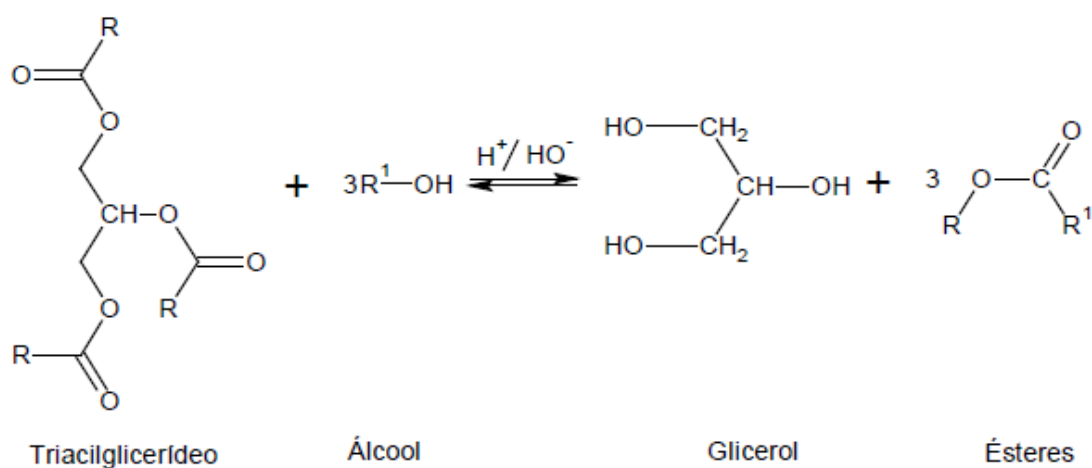


Figura 19 – Reação de transesterificação [61].

Como já foi referido, a utilização da biomassa das microalgas para a produção de biodiesel, apresenta uma clara vantagem pelo facto de não competir com a agricultura nem com produtos destinadas a alimentação humana [7].

A Tabela 6 mostra que apesar de os teores de óleo serem similares entre as plantas oleaginosas e as microalgas, há uma variação muito considerável na produtividade com clara vantagem para as microalgas. Por outro lado o balanço entre o dióxido de carbono emitido pela combustão do biodiesel e a quantidade que foi fixada durante o crescimento fotossintético é nulo [7].

De acordo com Chisti [31], se o óleo de palma fosse usado para produzir a quantidade de gasóleo que é utilizado nos EUA seria necessário usar 61% de toda área agrícola. Através da utilização de uma microalga com 15% de óleo (base seca) seriam necessários apenas 3% de área de plantio.

Tabela 6: Comparação de microalgas com outras fontes de óleo para fabricação de biodiesel [7].

Fonte de óleo	Teor de óleo (% de biomassa em base seca)	Produção de óleo (L óleo (ha.ano))	Uso de terra (m²/(kg biod.ano))	Produtividade de biodiesel (kg biod./(ha.ano))
Milho (<i>Zea mays</i>)	44	172	66	152
Cânhamo (<i>Cannabis sativa</i>)	33	363	31	321
Soja (<i>Glycine max</i>)	18	636	18	562
Pinhão-manso (<i>Jatropha curcas</i>)	28	741	15	656
Camelina (<i>Camelina sativa</i>)	42	915	12	809
Canola (<i>Brassica napus</i>)	41	974	12	862
Girassol (<i>Helianthus annuus</i>)	40	1070	11	946
Mamona (<i>Ricinus communis</i>)	48	1307	9	1156
Óleo de palma (<i>Elaeis guineensis</i>)	36	5366	2	4747
Microalga (baixo teor de óleo)	30	58700	0,2	51927
Microalga (médio teor de óleo)	50	97800	0,1	86515
Microalga (alto teor de óleo)	70	136900	0,1	121104



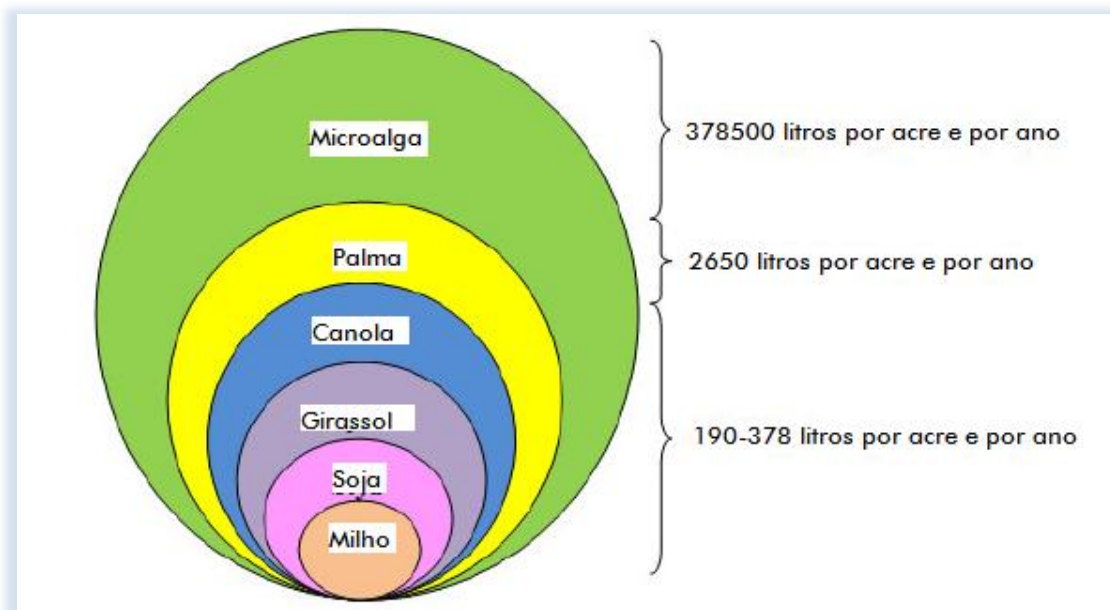


Figura 20 - Comparação de microalgas com outras fontes de óleo para fabricação de biodiesel [62].

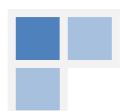
A Tabela 7 apresenta o teor de óleo e a produtividade de diversas espécies de microalgas, quer de água salgada quer de água doce.

Tabela 7: Teor de óleo e produtividade de diferentes espécies de microalgas [7].

Espécies de microalga	Teor de óleo (% de biomassa em base seca)	Produtividade de óleo (mg/L/dia)	Produtividade volumétrica de biomassa (g/L/dia)	Produtividade superficial de biomassa (g/m ² /dia)
<i>Chlorella emersonii</i>	25,0-63,0	10,3-50,0	0,036-0,041	0,91-0,97
<i>Chlorella vulgaris</i>	5,0-58,0	11,2-40,0	0,02-0,20	0,57-0,95
<i>Chlorella minutíssima</i> [62]	57			
<i>Chlorella</i> sp.	10,0-48,0	42,1	0,02-2,5	1,61-16,47
<i>Dunaliella salina</i>	6,0-25,0	116	0,16-0,24	1,6-3,5
<i>Nannochloris</i> sp.	12,0-53,0	37,6-90,0	0,17-1,43	1,9-5,3
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18,0-57,0	44,8	0,003-1,9	2,4-21
<i>Porphyridium cruentum</i>	9,0-18,8	34,8	0,36-1,50	25
<i>Scenedesmus</i> sp.	19,6-21,1	40,8-53,9	0,03-0,26	2,43-13,52
<i>Tetraselmis suecica</i>	8,5-23,0	27,0-36,4	0,12-0,32	19

Uma forma de maximizar a produção de lípidos numa microalga, é tornar um dos nutrientes limitante (normalmente o azoto) enquanto se fornece carbono em excesso que ao ser assimilado é convertido em lípidos pelas células [63,64]. Assim supõe-se que um crescimento de biomassa algal em dois estágios em contínuo poderia ser vantajoso para o enriquecimento da alga em óleo. Numa primeira fase seria feita o crescimento da biomassa com abundância de nutrientes, e numa segunda fase suprimam-se os nutrientes de modo a aumentar a fração lipídica [65].

A produção de biodiesel em larga escala a partir da biomassa de microalgas, requer um controlo minucioso de todas as variáveis, tornando-se economicamente viável se se utilizarem efluentes líquidos como nutrientes e dióxido de carbono de efluentes gasosos gerados em instalações industriais e com a extração de componentes de alto valor acrescentado [7].





Capítulo 3 - Material e Métodos

Todos os materiais utilizados na manutenção dos cultivos e nos ensaios experimentais foram criteriosamente esterilizados, a fim de evitar possíveis contaminações cruzadas. As tomas para medição foram feitas em atmosfera estéril à chama de bico de Bunsen. Todo o material de vidro foi esterilizado em estufa a 180°C durante 2 horas. As pontas das micropipetas foram esterilizadas em autoclave a 120°C, por 30 min, conforme rotina do laboratório.

Os fotobiorreatores foram lavados com hipoclorito de sódio 5mL/L durante 15min, fazendo-se de seguida a neutralização do cloro ativo com tiosulfato de sódio com 2,5ml/l de concentração 250g/L [66].

3.1 - Meio de cultura e reagentes

3.1.1 - Meio de cultura

O meio de cultura utilizado foi o meio sintético M₇, meio este indicado pela Algoteca da Universidade de Coimbra e cuja composição e preparação se indicam nas tabelas seguintes.

Tabela 8 – Composição de 1L de meio M₇.

	Solução aquosa (% m/V)	Volume de solução
KNO ₃	1	10
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1	10
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,2	5
CaSO ₄	Saturada	10
Extrato de solo	-	20
Extrato de <i>Spaghnum</i>	-	10
Água destilada	-	930
Micronutrientes	-	5
Vitamina B12	5x10 ⁻⁶ g	-



Extrato de solo – Pesar 200g de solo de jardim não muito rico em húmus, fertilizantes ou outros agentes químicos. Juntar 1 litro de água e esterilizar por aquecimento durante 1 hora. Separar o decantado por centrifugação. Levar à autoclave durante 1 hora, a 1 atm, três dias consecutivos. Guardar no frigorífico.

Extrato de *spaghnum* – Pesar 50g de *spaghnum* seco, juntar 1,5 litro de água e esterilizar por aquecimento durante 1 hora. Decantar. Levar à autoclave durante 1 hora, a 1 atm, três dias consecutivos. Guardar no frigorífico.



Figura 21 – Colheita de *spaghnum* no campus do IPT.

Vitamina B₁₂ - Juntar em solução esterilizada depois de levar à autoclave.

Tabela 9 – Composição da solução de micronutrientes.

	Solução aquosa (% m/V)	Volume de solução
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1	1 ml
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,1	2 ml
H ₃ BO ₃	0,2	5 ml
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,02	5 ml
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,02	5 ml
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0005	1 ml
Água destilada	-	981 ml
FeSO ₄ .7H ₂ O	-	0,7g
EDTA	-	0,8 g

Preparar as duas soluções seguintes:

Sol. I - 881 ml de água destilada + volumes indicados dos sais sem FeSO₄.7H₂O + 0.4 g EDTA;

Sol. II - 100 ml de água destilada + 0.7 g de FeSO₄.7H₂O + 0.4 g EDTA;

Autoclavar em separado.

Juntar após arrefecimento.

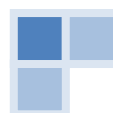
3.1.2 – Reagentes

A seguir apresenta-se a lista de reagentes utilizados na preparação do meio M₇.

- ▶ Sulfato de cálcio anidro, Fisher Chemical, pureza química
- ▶ Sulfato de zinco heptahidratado, Panreac, >99%
- ▶ EDTA, May & Baker, >98.5%
- ▶ Cloreto de cobalto hexahidratado, Riedel-de-Haen, >99%
- ▶ Dihidrogenofosfato de amónio, Panreac, >96%
- ▶ Nitrato de potássio, Panreac, >99%
- ▶ Ácido bórico, Pronalab, P.A.
- ▶ Sulfato de magnésio heptahidratado, Pronalab, P.A.
- ▶ Molibdato de sódio, May & Baker, >99%
- ▶ Sulfato de ferro heptahidratado, Fluka, P.A.
- ▶ Sulfato de manganês (II) tetra hidratado, Riedel-de-Haen, >99%
- ▶ Sulfato de cobre pentahidratado, Pronalab, >99%
- ▶ Vitamina B12, Merck, P.A.

3.2 - Microalga e condições de manutenção

Na realização desta pesquisa foram utilizadas estirpes de microalgas *Chlorella sp* e *Chlorella minutíssima*. A escolha das microalgas teve em conta o seu elevado teor em óleo referido na literatura, próximo dos 40% para a *Chlorella sp* [7] e 57% para a *Chlorella minutíssima* [62].



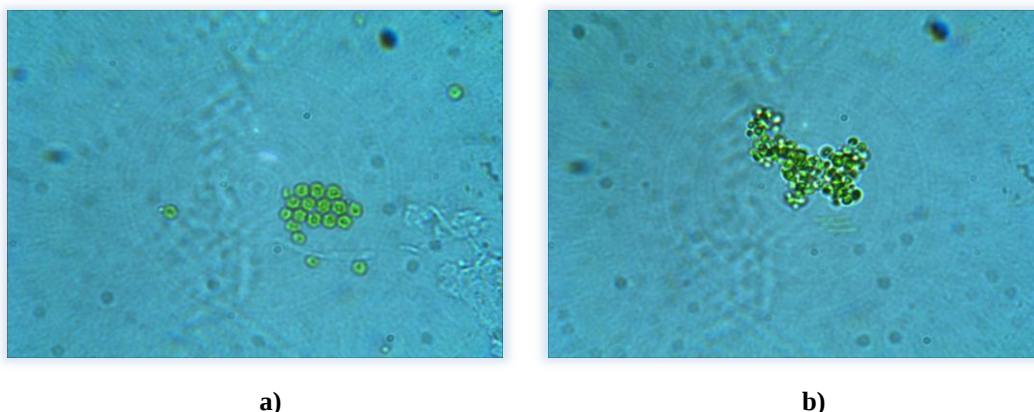


Figura 22, a e b – Fotografia de *Chlorella sp* e *Chlorella minutissima* (Observada em microscópio Olympus CH30, ampliação 1000x, fotografado com câmara BMS Systems ST070320007)

As estirpes das microalgas foram compradas à algoteca da Universidade de Coimbra (ALGOI), em *blisters* de 5 ml. Um mililitro da estirpe original foi diluído de 1:5 em meio M₇, e colocado em balão Erlenmeyer esterilizado com rolha permeável a gases, tendo sido guardado em local iluminado com luz natural para manutenção da estirpe pura.

A restante quantidade foi inoculada de 1:5 em meio M₇, e colocado em balão Erlenmeyer esterilizado com rolha permeável a gases, os quais foram mantidos em incubadora Stuart scientific orbital incubator SI50 com agitação orbital permanente de 100 rpm, à temperatura de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e dotada de sistema de iluminação com 2 lâmpadas de 20W promovendo uma intensidade luminosa de 2000 Lux e controlo de fotoperíodo 12 horas de dia 12 horas de noite, utilizadas posteriormente como inóculos nos vários ensaios experimentais.



Figura 23 – Crescimento de inóculos em incubadora orbital.

A estirpe original foi mantida fazendo-se repicagens e diluições de 1:10 em meio M₇ de 3 em 3 semanas e conservando sempre três gerações. As gerações descartadas foram inoculadas de 1:10 em meio M₇ num total de 100ml, nas mesmas condições já indicadas e utilizadas como inóculos nos ensaios experimentais.

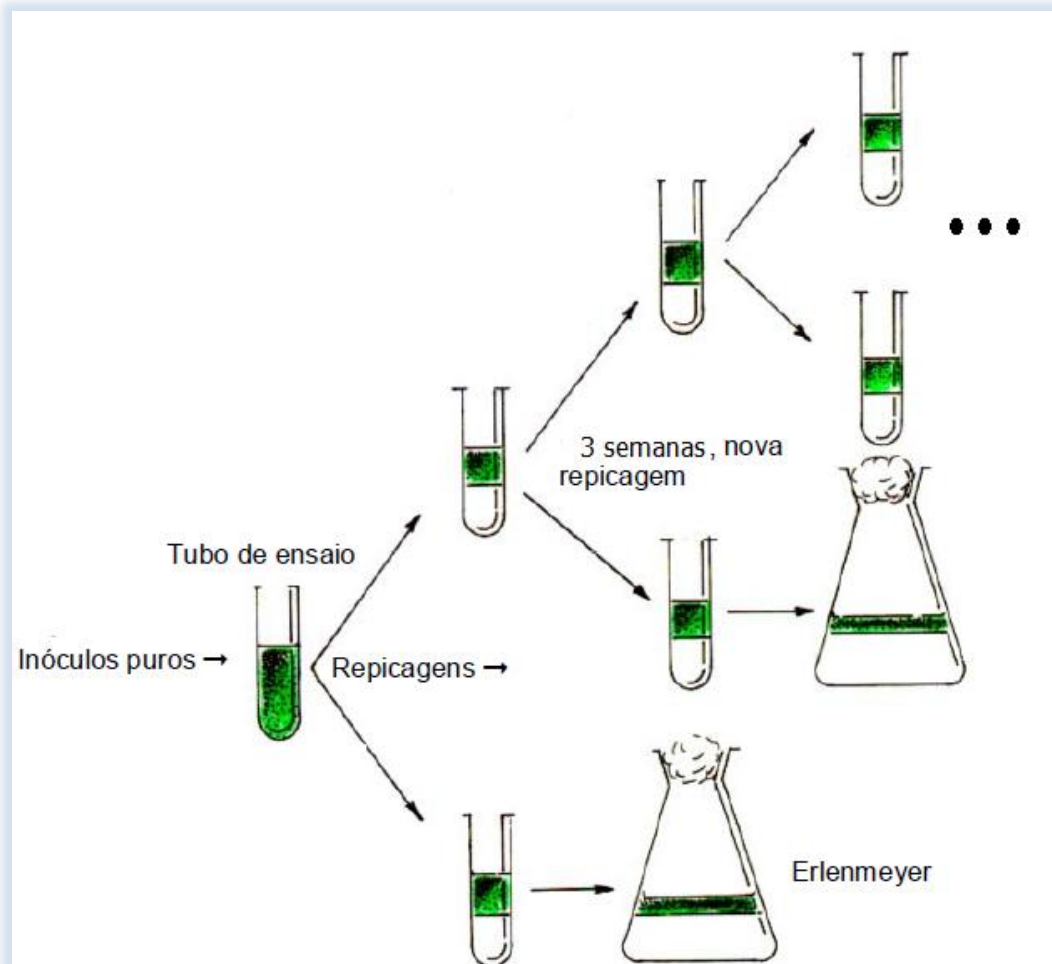


Figura 24 – Esquema de manutenção da estirpe inicial do inóculo puro [67].

3.3 - Fotobiorreator

Após análise pormenorizada dos diversos tipos de fotobiorreatores, optou-se por dimensionar um reator tubular de coluna de bolhas. Escolheu-se este tipo de reator devido a sua fácil montagem/desmontagem permitindo uma melhor lavagem entre crescimentos. As bolhas ascendentes na coluna homogeneizam o meio diminuindo a sedimentação da microalga, esta agitação é também relativamente inócua para o microrganismo o que não

aconteceria num reator com agitação mecânica. O material escolhido foi o acrílico devido ao seu fácil dimensionamento e transparência permitindo a passagem da luz.

Saliente-se ainda que neste tipo de reatores é maximizada a área de exposição à luz.

Para o dimensionamento foram tidos em conta os parâmetros recolhidos na literatura [29], [68], [69], [70]:

- Razão diâmetro-altura: 1:10;
- Razão área superficial/volume: elevada;
- Camisa de arrefecimento/aquecimento;

O reator é constituído por dois tubos cilíndricos concêntricos, sendo o interior o reator propriamente dito, e o de fora a camisa de termostatização. O reator foi construído em tubo acrílico, com espessura de 3 mm, altura 49,5 cm e diâmetro 7 cm. Por razões de disponibilidade industrial do acrílico, não foi possível manter a razão diâmetro-altura de 1:10, ficando com o valor de 1:7.

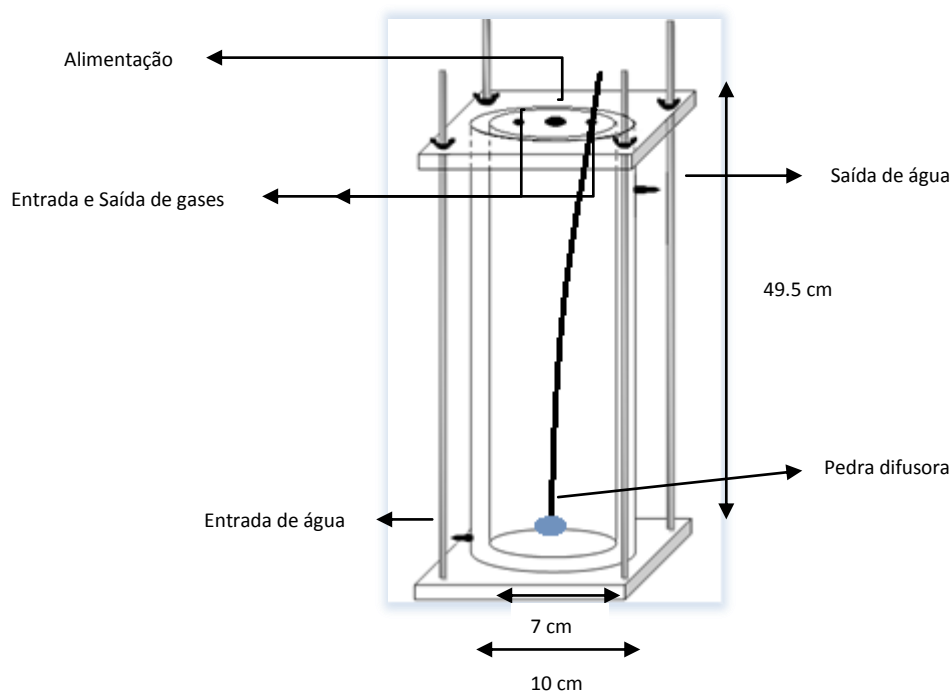
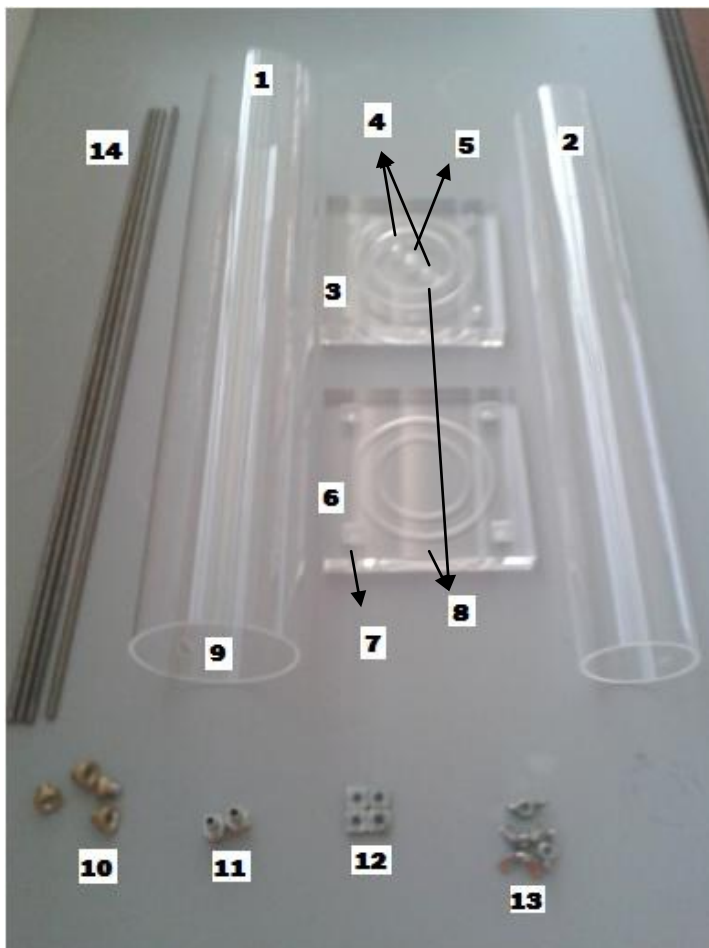


Figura 25 – Representação esquemática do reator.

A camisa tem um diâmetro de 10 cm e altura de 49,5 cm. Foram cortadas bases quadradas com dois encaixes rebaixados de 3mm de largura e espessura, com 4 furos onde entram os varões roscados de inox para selagem do reator. A tampa do reator contém mais três furos, dois de 6 mm para passagem das mangueiras de ar e de CO₂, e outro de 10 mm para alimentação do reator.

A estanquicidade do reator foi garantida pela utilização de *o-rings* de diâmetro igual ao dos encaixes cortados nas bases.

O reator apresenta um volume útil de 1,9L e uma razão área superficial/volume de valor 57m⁻¹.



1. Tubo exterior;
2. Tubo interior;
3. Topo do reator, com encaixes (8), furação para entrada e saída de gases;(4) e furação para alimentação (5);
6. Base do reator, com encaixes (8) e furação para fixação do varão roscado (7);
9. Orifício para entrada de água de termostatização, no topo oposto tem um orifício igual para saída de água;
10. e 11. Peças roscadas para encaixe da mangueira de água de termostatização;
12. Porcas quadradas em inox de encaixe em (7);
13. Porcas de orelhas em inox para fixação da base, aos tubos e ao topo do reator;
14. Varão roscado em inox;

Figura 26 – Material utilizado na montagem do reator.



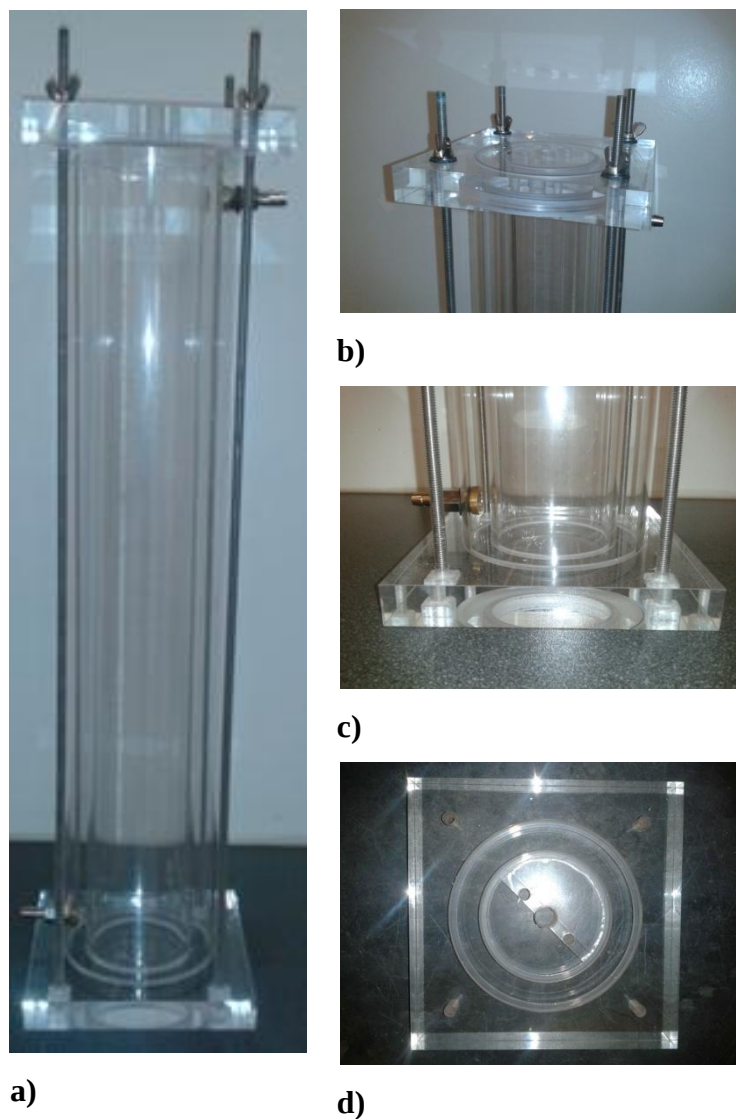


Figura 27 – Fotografias do fotobiorreator:

- a) Fotobiorreator;
- b) Pormenor de topo, onde se destaca a saída de água;
- c) Pormenor da base, onde se destaca a entrada de água;
- d) Pormenor da tampa, onde se destacam o orifício central para alimentação do reator, e os dois orifícios periféricos destinados à entrada e saída de gases;

3.4 - Ensaios de crescimento em balão Erlenmeyer com meio M₇

O crescimento das microalgas foi realizado em balão Erlenmeyer de 1L esterilizado com rolha permeável a gases, inoculada de 1:10 em meio M₇ num total de 400mL com os



crescimentos feitos previamente, os quais foram mantidos em incubadora stuart scientific orbital incubator SI50 com agitação permanente de 100 rpm, à temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e dotada de sistema de iluminação com 2 lâmpadas de 20W, tipo luz-do-dia, promovendo uma intensidade luminosa de 2000 Lux e controlo de fotoperíodo 12 horas de dia 12 horas de noite.

O acompanhamento do crescimento foi feito diariamente, medindo a densidade ótica (DO) em tomas de 2mL, recolhidas sob atmosfera esterilizada à chama do Bico de Bunsen. As absorvâncias foram lidas a 570nm em espectrofotómetro DRLANGE Cadas 100, e posteriormente convertidas em concentração através de curvas de calibração que relacionam o valor da concentração da microalga em suspensão com o valor da DO. A cada amostra foi controlado também o pH da cultura, através de medições feitas em aparelho CRISON Microph2000.

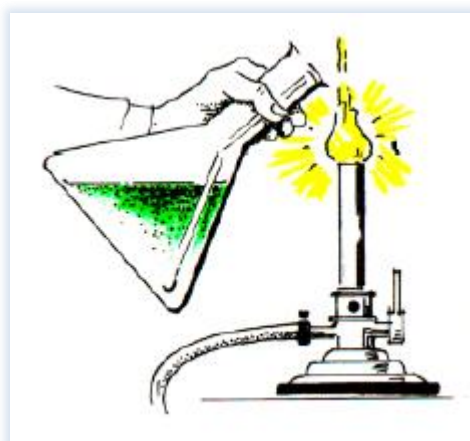


Figura 28 – Desinfecção da boca do balão Erlenmeyer à chama, com a consequente recolha de 2mL com micropipeta em atmosfera esterilizada [67].

3.5 - Ensaios de crescimento em Fotobiorreator

3.5.1 – Crescimento com CO₂ em meio M₇

Os crescimentos foram efetuados em fotobiorreator climatizado com sistema de iluminação fornecido por 2 lâmpadas fluorescentes de 20W cada (2000 lux no total) tipo luz-do-dia e fotoperíodo de 12 horas claro/escuro. A agitação foi realizada pela injeção de ar de 5 em 5 horas e por injeção contínua de CO₂ puro a um caudal de 2,9 L/hora, através de pedras difusoras colocadas no fundo reator. Para cada crescimento foi utilizado 1,4L de meio de cultura M₇ em conjunto com a microalga nele inoculada, com um fator de diluição de 1:10.



A temperatura foi mantida a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$, temperatura considerada ideal [71], sendo água termostatzada reciclada pela camisa do reator, proveniente de banho Grant Lauda A100 equipado com bomba peristáltica Watson Marlow 313s.

O acompanhamento do crescimento foi feito diariamente, medindo a densidade ótica (DO) em tomas de 2mL, recolhidas com pipeta esterilizada através do orifício de alimentação do reator. As absorvâncias foram lidas a 570nm em espectrofotômetro DRLANGE Cadas 100, e posteriormente convertidas em concentração através de curvas de calibração que relacionam o valor da concentração da microalga em suspensão com o valor da DO. A cada amostra foi controlado também o pH da cultura, através de medições feitas em aparelho CRISON Microph2000.

3.5.2 - Crescimento com CO₂ em meio M₇ três vezes mais concentrado

As condições deste crescimento são quase na totalidade iguais às indicadas no crescimento anterior. A única alteração feita foi a concentração do meio M₇, que foi preparado utilizando o triplo dos valores indicados nas tabelas 8 e 9, resultando, por inerência um meio três vezes mais concentrado.

3.5.3 - Crescimento com CO₂ em efluente do tratamento terciário com macrófitas

O efluente terciário utilizado neste ensaio, resulta de um projeto existente no IPT, em que é utilizado um tanque com enchimento de filtralite® onde foi plantado caniço (*Phragmites australis*), para tratar um afluente sintético. Este afluente apresenta uma concentração de fósforo total 9mg/L, azoto total 28mg/L, CQO 35 mg/L e um pH de 7,3. A filtralite e a macrófita utilizada removem praticamente todo o carbono contido no afluente, apresentando também um bom rendimento na remoção de fósforo e azoto.

Para a preparação do meio utilizado neste ensaio, pesaram-se 100g da filtralite do tanque que se colocaram num litro de água destilada. Esta mistura foi agitada durante 48 horas após as quais foi filtrada e esterilizada em autoclave, apresentando uma concentração de fósforo total de 2 mg/L e de azoto total de 8 mg/L.

Este meio foi inoculado com *Chlorella* sp, sendo as restantes condições as mesmas dos crescimentos anteriores.



3.4 - Recuperação da biomassa algal

O método utilizado para a separação da biomassa algal em suspensão foi a centrifugação. Foram feitos ensaios de filtração, mas face ao tamanho da alga atingia-se facilmente a colmatagem da membrana.

Assim, a biomassa foi separada do meio por centrifugação, durante 15 minutos a uma velocidade de 5300 rpm em centrífuga Labofuge 200.

Após centrifugação a biomassa foi colocada numa caixa de Petri e deixada secar em estufa WTC Binder à temperatura de 40°C até se atingir peso constante em balança analítica Mettler Toledo AB204.

3.5 - Extração do Óleo das Microalgas

Para a quantificação de lipídios totais foi utilizada a metodologia proposta por Bligh e Dyer (1959), porém modificada. A extração por Soxhlet seria o método mais eficaz, no entanto a quantidade de alga era muito pequena, optando-se por utilizar o método indicado [65].

3.5.1 – Método de Bligh e Dyer

1. Pesar 0,5 g de amostra;
2. Adicionar 2 mL de clorofórmio, 4 mL de metanol e 1,6 mL de sulfato de sódio 1,5%;
3. Agitar em agitador orbital por 30 minutos;
4. Adicionar 2 mL de clorofórmio e 2 mL de sulfato de sódio 1,5%;
5. Agitar em agitador orbital 2 minutos;
6. Separar as camadas por decantação ou centrifugar a 1000 rpm por 10 minutos;
7. Pipetar a camada superior para um tubo de ensaio;
8. Adicionar 1 mL de sulfato de sódio 1,5%;
9. Filtrar em papel filtro para um tubo de centrífuga previamente tarado;
10. Deixar em estufa a 100°C por 24 horas para evaporar os solventes;
11. Arrefecer em exsiccador por 15 minutos;
12. Pesar;



3.5.2 - Reagentes

Metanol, Panreac, >99.5%

Clorofórmio, Riedel-de-Haen, >99%

Sulfato de Sódio, Riedel-de-Haen, >99%

3.6 - Reta de calibração

As retas de calibração para as duas microalgas foram estabelecidas pela leitura da absorvância de 10 soluções padrão preparadas após o crescimento das microalgas, como indicado na tabela seguinte:

Tabela 10 – Quantidades medidas para a preparação dos padrões.

Padrão	Volume da solução mãe (ml)	Água destilada (ml)
1	5	45
2	10	40
3	15	35
4	20	30
5	25	25
6	30	20
7	35	15
8	40	10
9	45	5
10	50	0

De cada padrão foram retirados 2 ml para leitura da absorvância em espectrofotômetro DRLANGE Cadas 100, os restantes 48 ml foram filtrados a vácuo em membrana de 0,45 µm e secas em estufa WTC Binder a 80°C até peso constante em balança analítica Mettler Toledo AB204.



Capítulo 4 - Resultados e Discussão

4.1 – Microalgas

As microalgas estudadas pertencem à divisão *Chlorophyta*, ordem *Chlorococcales*, género *Chlorella*. Estas espécies, quando cultivadas em meio líquido e com agitação constante, apresentam células individualizadas de coloração verde. Têm forma esférica e possuem clorofilas a e b responsáveis pela sua cor. A espécie *Chlorella minutíssima* tem tendência para se agrupar em colónias, o que implica uma sedimentação mais rápida, sendo necessário ter atenção à agitação para impedir a sua sedimentação no fundo do no fotobiorreator.

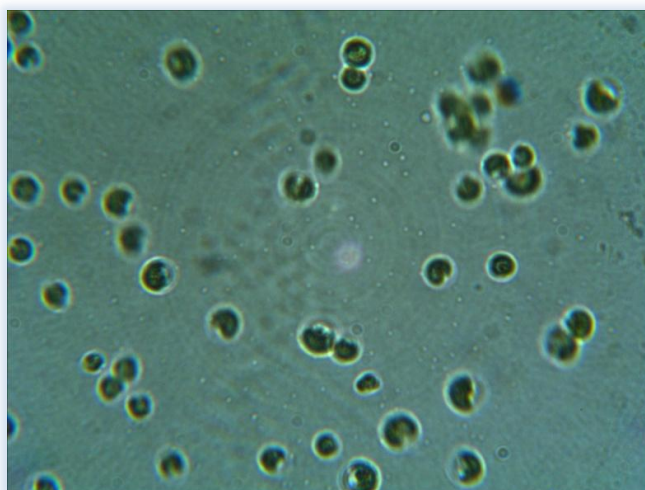


Figura 29 - Fotografia de *Chlorella sp*, com ampliação 1000x em microscópio Olympus CH30.

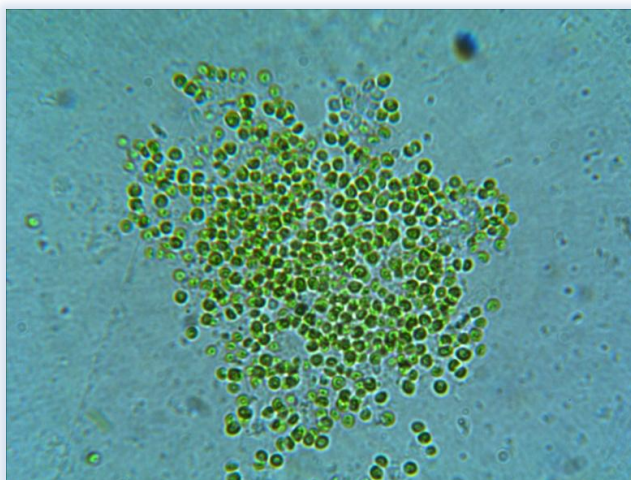


Figura 30 - Fotografia de *Chlorella minutíssima*, com ampliação 1000x em microscópio Olympus CH30.



A partir da observação microscópica, foi possível medir o seu tamanho em pixéis, convertendo-se depois para micrómetros com a escala a seguir indicada.

- 26 pixel (em média) corresponde a 10µm numa escala de 100x;
- 104 pixel (em média) corresponde a 10µm numa escala de 400x;
- 254 pixel (em média) corresponde a 10µm numa escala de 1000x.

Foram feitas medidas a 1000x resultando o tamanho das microalgas como indicado na tabela seguinte:

Tabela 11 – Tamanho das microalgas.

Microalga	Tamanho
<i>Chlorella sp</i>	7±1 µm
<i>Chlorella minutíssima</i>	4±1 µm

4.2 - Curvas de Calibração

4.2.1 - *Chlorella sp*

Para a obtenção da curva de calibração foi seguido o procedimento indicado anteriormente, e para o qual se apresentam a seguir algumas imagens:



Figura 31 – Fotografia dos 10 padrões preparados.



Figura 32 – Fotografia das membranas após filtração por vácuo.

A tabela 10 representa os resultados do procedimento experimental.

Tabela 12 – Resultados da absorvância, do peso da biomassa e da concentração para cada solução padrão.

Padrão	Absorvância	Peso da biomassa (g)	Concentração do padrão (mg/L)
1	0,028	0,0010	20,8
2	0,054	0,0027	56,3
3	0,083	0,0044	91,7
4	0,113	0,0061	127,1
5	0,146	0,0078	162,5
6	0,184	0,0098	204,2
7	0,253	0,0116	241,7
8	0,29	0,0142	295,8
9	0,321	0,0156	325,0
10	0,365	0,0178	370,8

A reta obtida após regressão encontra-se no gráfico seguinte e relaciona a concentração em mg/L com a absorvância lida:

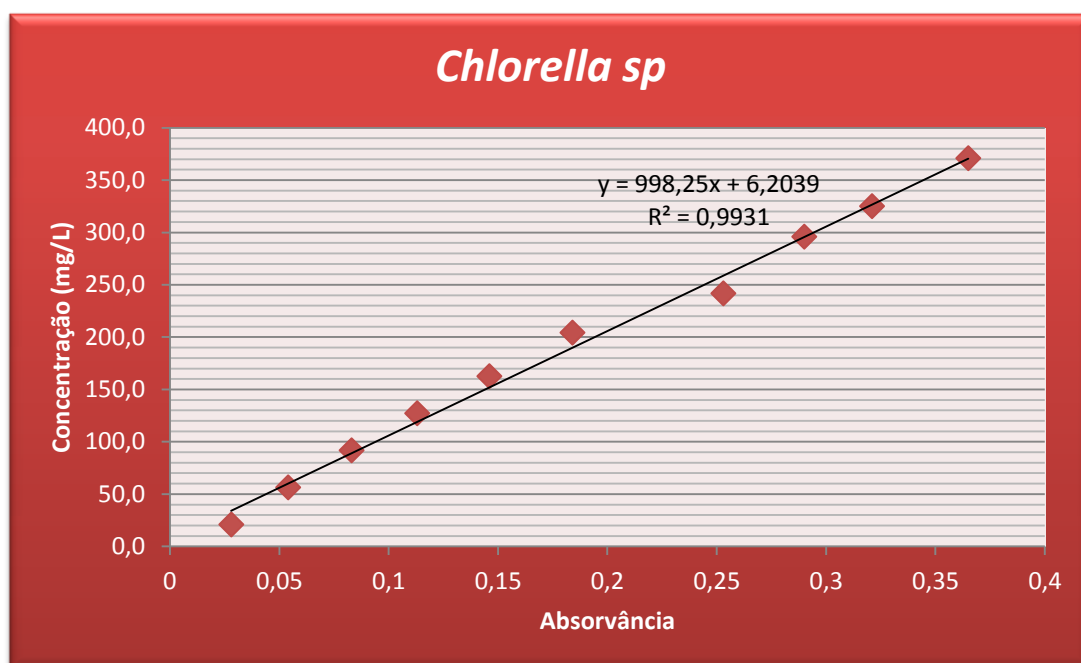


Figura 33 – Curva de calibração para a *Chlorella sp*.

O coeficiente de correlação dos dados com a reta obtida, é de 0.997 o que indica uma muita boa relação entre a concentração da biomassa algal com a absorvância lida em espectrofotômetro.

Se se quiser obter a concentração quando lida a absorvância utiliza-se a expressão:

$$C \text{ (mg/L)} = 998.25 \text{ ABS (570nm)} + 6.2039$$

4.2.2 - *Chlorella minutíssima*

Para esta alga o procedimento experimental foi repetido.

Tabela 13 – Resultados da absorvância, do peso da biomassa e da concentração para cada solução padrão.

Padrão	Absorvância	Peso da biomassa (g)	Concentração do padrão (mg/L)
1	0,021	0,0004	8
2	0,045	0,0019	40
3	0,067	0,0038	79
4	0,078	0,0050	104
5	0,107	0,0065	135
6	0,127	0,0080	167
7	0,147	0,0098	204
8	0,171	0,0113	235
9	0,198	0,0129	269
10	0,217	0,0144	300

A reta obtida após regressão encontra-se no gráfico seguinte e relaciona a concentração em mg/L com a absorvância lida:



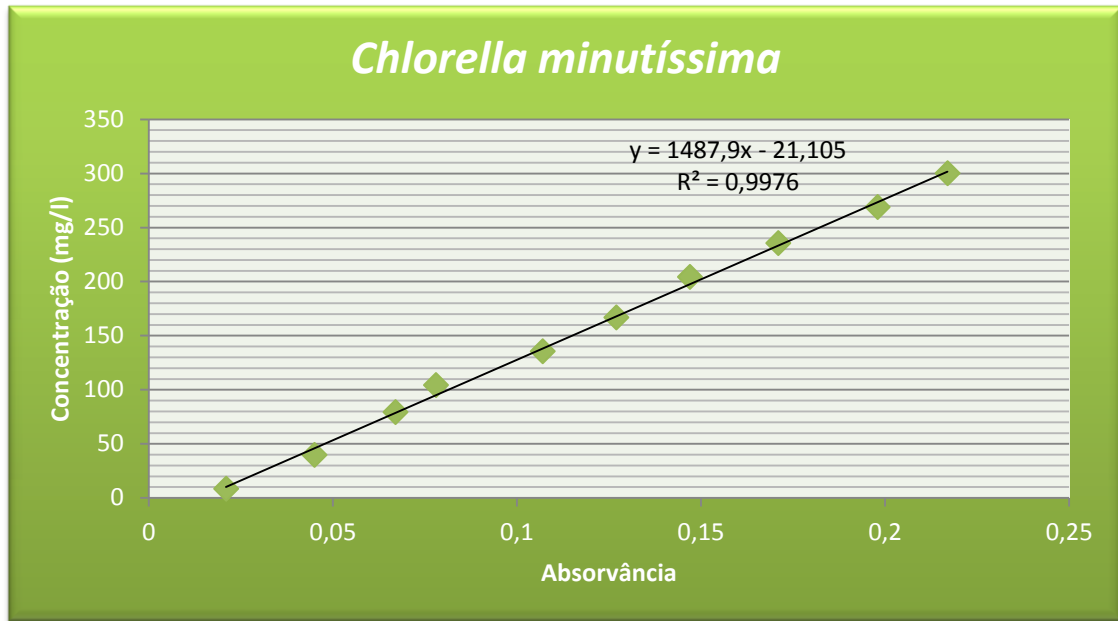


Figura 34 – Curva de calibração para a *Chlorella minutíssima*.

O coeficiente de correlação dos dados com a reta obtida, é de 0.999 o que indica uma muita boa relação entre a concentração da biomassa algal com a absorvância lida em espectrofotômetro.

Se se quiser obter a concentração quando lida a absorvância utiliza-se a expressão:

$$C \text{ (mg/L)} = 1487.9 \text{ ABS (570nm)} - 21.1$$

4.3 - Crescimento em balão Erlenmeyer

4.3.1 - *Chlorella* sp

Após a recolha diária da absorvância e do valor do pH do meio, foram calculadas as respectivas concentrações através da curva de calibração estabelecida previamente, tendo resultado a curva de crescimento e de evolução do pH, apresentadas a seguir:

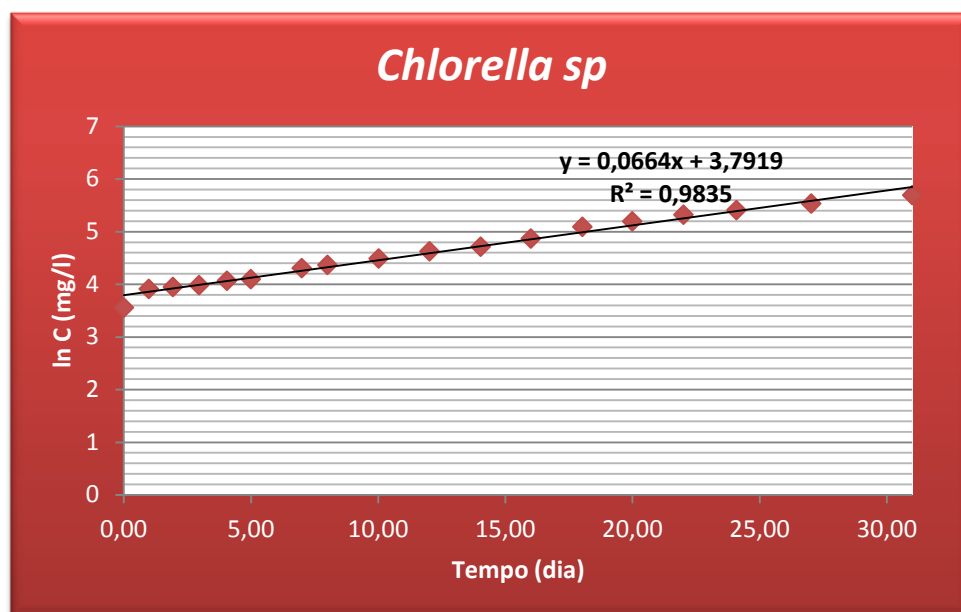


Figura 35 – Curva de crescimento para a *Chlorella sp* em balão Erlenmeyer.

Como é facilmente observável pelo gráfico, pode-se concluir que a microalga não apresenta uma curva de crescimento característica, não apresentando uma fase estacionária nem a fase de morte, mostrando apenas uma fase de crescimento exponencial, mas com uma taxa específica máxima, constante e muito baixa. Este facto explica-se pelo facto de o meio M₇ não ser um meio de crescimento mas sim de manutenção da microalga, com claro défice do nutriente carbono.

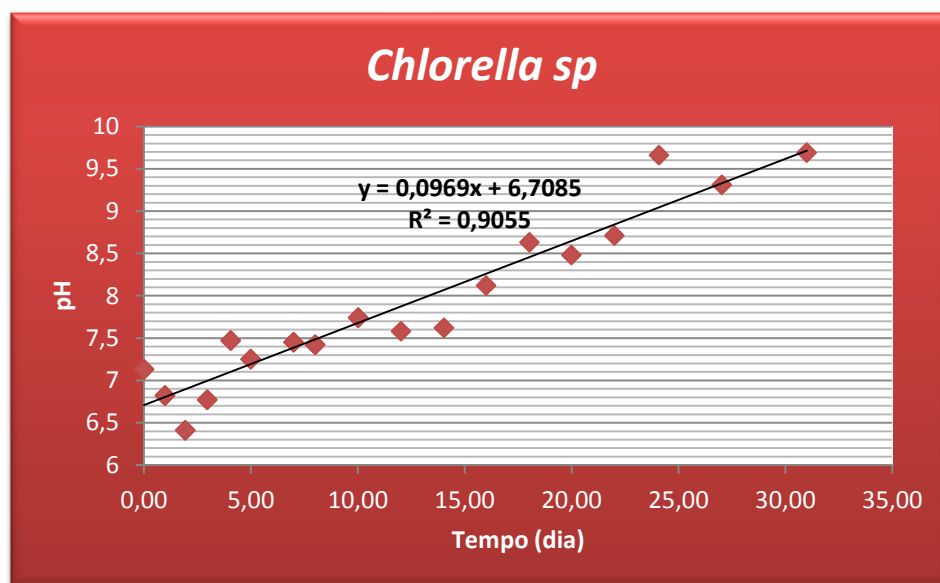


Figura 36 – Variação do pH para *Chlorella sp* em balão Erlenmeyer.

Por observação do gráfico pode-se observar que o pH foi aumentando de uma forma linear ao longo do crescimento.

4.3.2 – *Chlorella minutíssima*

Procedeu-se de igual modo como indicado para a microalga *Chlorella sp*, resultando a curva de crescimento e de variação de pH indicadas a seguir:

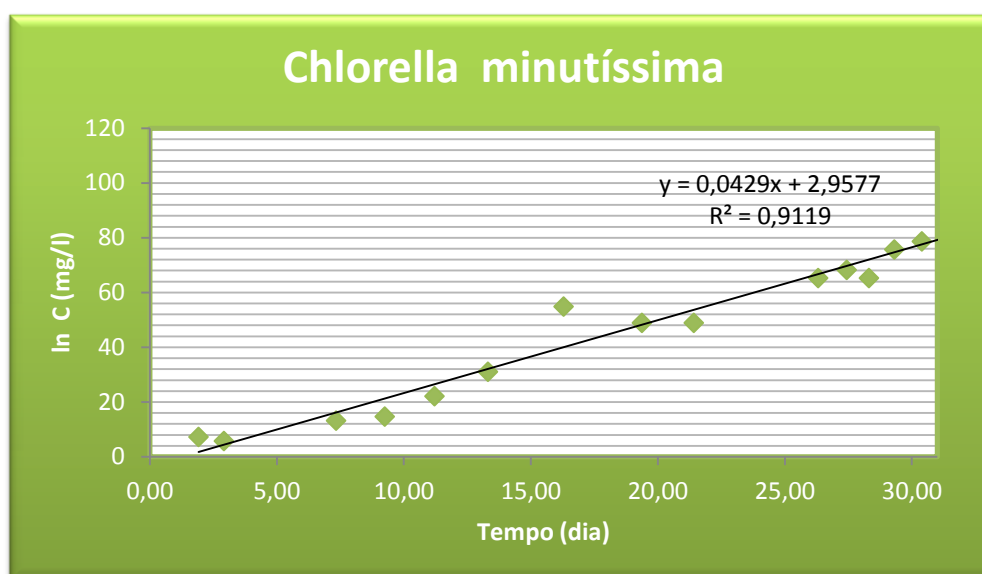


Figura 37 – Curva de crescimento para a *Chlorella minutíssima* em balão Erlenmeyer.

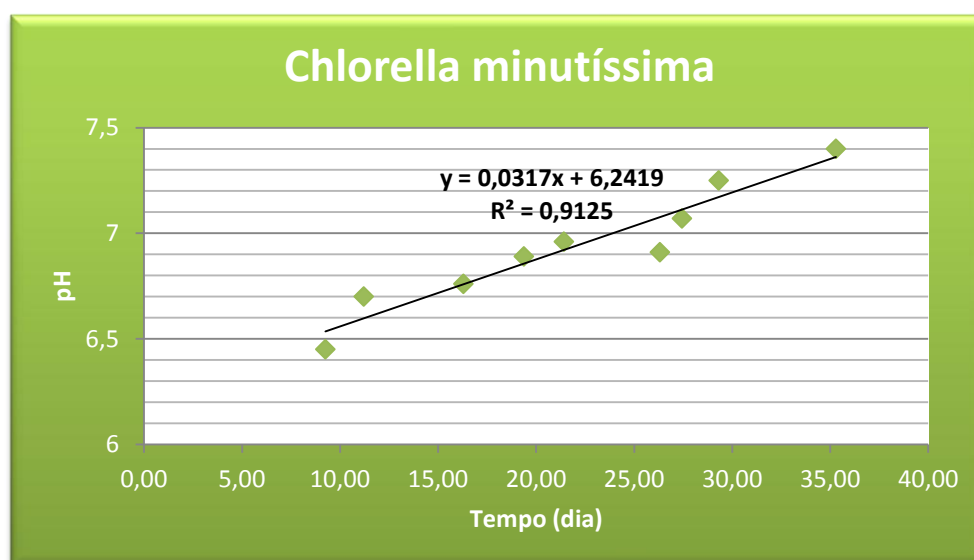


Figura 38 – Variação do pH para *Chlorella minutíssima* em balão Erlenmeyer.

Por observação das figuras 36 e 37 podem-se tirar as mesmas conclusões já feitas para a microalga *Chlorella sp.*

4.4 – Ensaios em fotobiorreator

4.4.1 - Crescimento com CO₂ em meio M₇

4.4.1.1 - *Chlorella sp*

O crescimento desta microalga foi feito de acordo com as condições já mencionadas. A imagem seguinte retrata o reator com a respectiva alga.



Figura 39 – Imagem do fotobiorreator com microalga *Chlorella sp.*

Após recolha diária do valor da absorvância e da medida do pH, construi-se a curva de crescimento e curva de variação do pH a seguir indicadas.

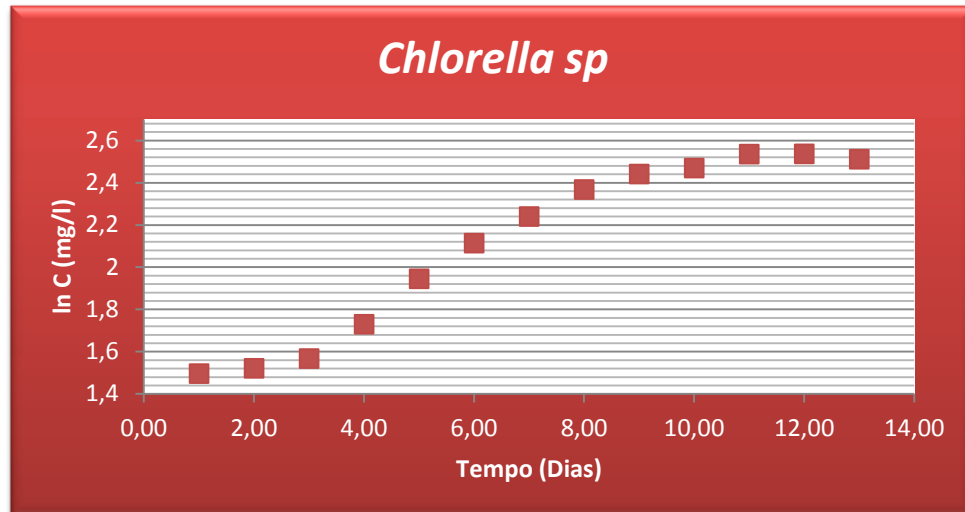


Figura 40 – Curva de crescimento para a *Chlorella sp* em fotobiorreator.

Observa-se claramente uma curva característica de crescimento de uma microalga, em que a fase exponencial de crescimento se situa entre 3º e o 9º dias.

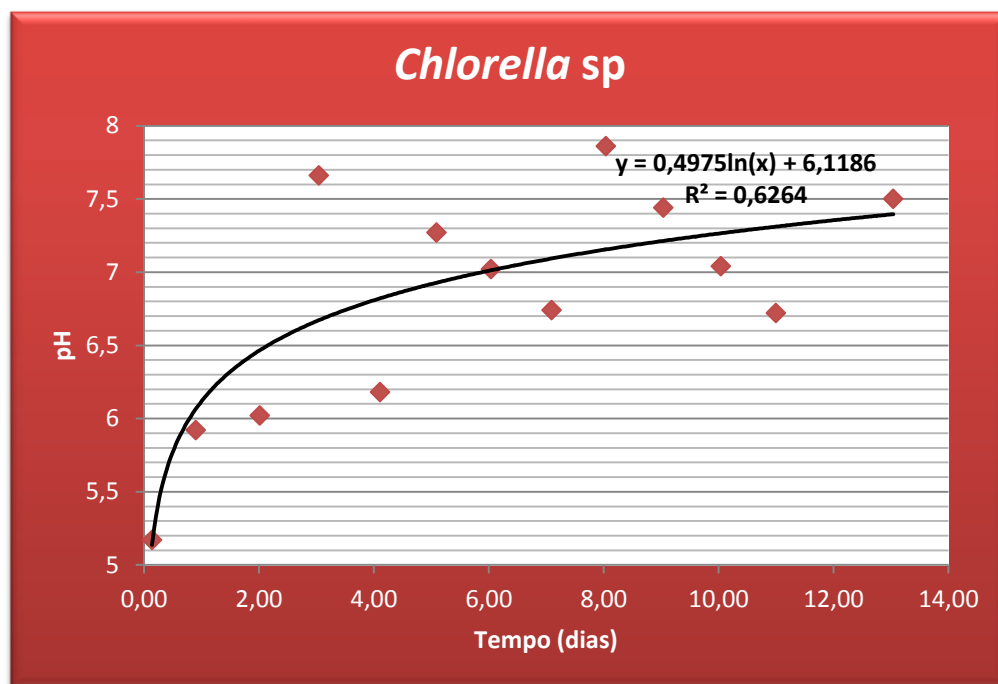


Figura 44 – Variação do pH para *Chlorella sp* em fotobiorreator.

O pH variou bastante ao longo do crescimento. A melhor correlação é um crescimento logarítmico como demonstrado na figura, e que confirma o observado por outros autores [78].

4.4.1.2 - *Chlorella minutíssima*

O ensaio com esta microalga encontra-se descrito nas imagens seguintes:



Figura 42 – Imagem do fotobiorreator com microalga *Chlorella minutíssima*.

Nesta imagem pode-se observar no topo do reator, que esta microalga forma um bio filme sobre a parede de acrílico, o que não aconteceu com a *Chlorella sp.*

Após recolha diária do valor da absorvância e da medida do pH, construi-se a curva de crescimento e curva de variação do pH a seguir indicadas.

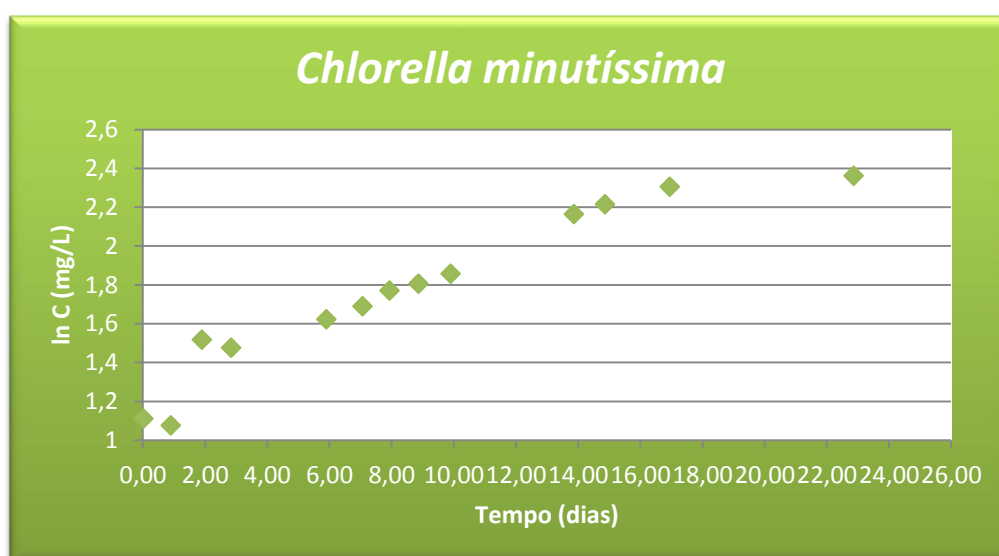


Figura 43 – Curva de crescimento para a *Chlorella minutíssima* em fotobiorreator.

O gráfico não é tão delineado como aconteceu para a *Chlorella sp.*, no entanto, permite observar uma zona clara de evolução exponencial entre o 6º e o 17º dia.

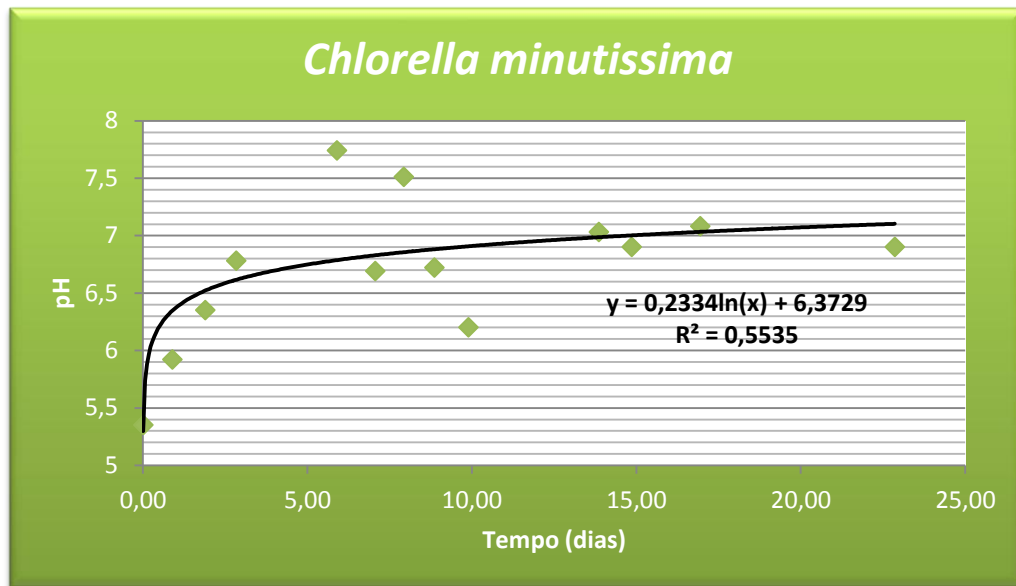


Figura 44 – Variação do pH para *Chlorella minutissima* em fotobiorreator.

O pH variou bastante ao longo do crescimento. Verificou-se também que a melhor correlação é um crescimento logarítmico como demonstrado na figura.

4.4.2 – Crescimento com CO₂ em meio M7 três vezes mais concentrado

4.4.2.1 - *Chlorella sp*

O crescimento foi feito como já indicado. A imagem seguinte representa os dois reatores que permitiram o crescimento das duas microalgas em meio mais concentrado.



Figura 45 – Imagem dos fotobiorreatores com microalga *Chlorella minutissima* à esquerda e microalga *Chlorella sp.* à direita.



Com os dados recolhidos foram construídas as curvas de crescimento e de variação do pH da microalga.

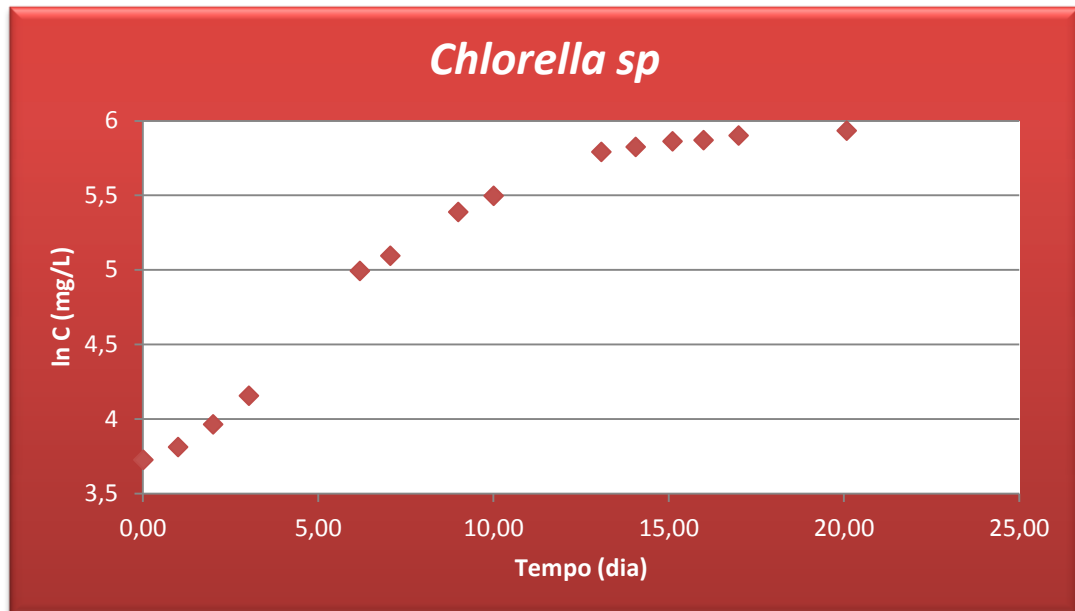


Figura 46 – Curva de crescimento para a *Chlorella sp* em fotobiorreator com meio mais concentrado.

Pode-se observar que a fase *lag* foi mais curta que no crescimento em meio menos concentrado. Observa-se a curva característica de crescimento de uma microalga, em que a fase exponencial de crescimento se situa entre 3º e o 13º dias.

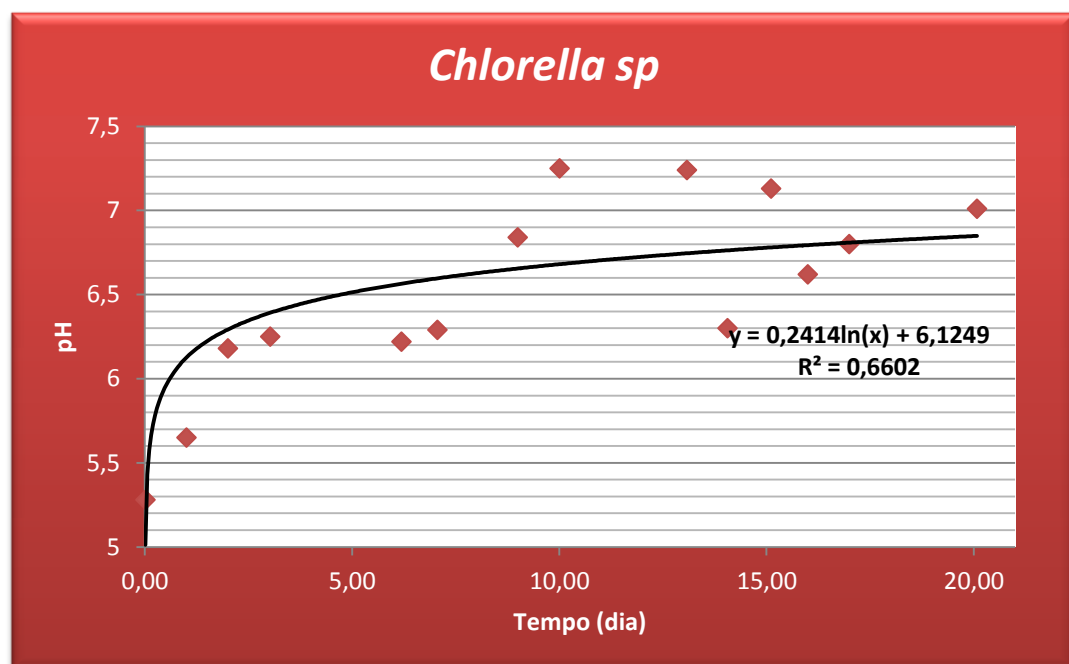


Figura 47 – Variação do pH para *Chlorella sp* em fotobiorreator com meio mais concentrado.

Volta-se a observar uma variação muito grande do pH, em que a melhor correlação é a logarítmica indicada.

4.4.2.2 - *Chlorella minutíssima*

Os ensaios com esta microalga foram inconclusivos. Fizeram-se dois crescimentos mas em ambos a microalga morreu.

4.4.3 - Crescimento com CO₂ em efluente do tratamento terciário com macrófitas

Este estudo foi feito apenas para a microalga *Chlorella sp.* Observou-se um crescimento muito lento. Por falta de tempo não foi possível repetir o ensaio pelo que não foi possível tirar conclusões.

4.5 - Parâmetros cinéticos

Modelagem matemática de processos biotecnológicos

Existem diversos parâmetros que podem ser acompanhados no desenvolvimento celular através de equações matemáticas. Parâmetros como a taxa máxima específica de crescimento, μ (dia⁻¹), a concentração mássica máxima, $C_{\max}$ (mg/L), a produtividade máxima, $P_{\max}$ (mg/(L.dia)) e o tempo de duplicação da biomassa podem assim ser calculados, durante o crescimento equilibrado (quando os microrganismos se encontram completamente adaptados e inseridos num meio adequado), a duplicação da biomassa é acompanhada da duplicação de todas as outras propriedades mensuráveis (proteína, DNA, RNA, entre outras moléculas orgânicas).

Taxa máxima específica de crescimento

O crescimento equilibrado apresenta, normalmente, uma cinética equivalente a uma reação de primeira ordem igual à que é apresentada na equação [64]:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (3)$$



Onde:

dX/dt – Variação da concentração de biomassa em relação ao tempo (mg/(L.dia));

X – Concentração de biomassa (mg/L);

μ - Taxa específica de crescimento (dia⁻¹);

Na fase de crescimento exponencial, a esta equação pode ser integrada entre X_{t_0} e X_t , no intervalo de tempo em que dura a fase de crescimento exponencial, se se considerar que a fase de crescimento exponencial se inicia no tempo t_0 e termina no tempo t , obtém-se a equação:

$$\ln(X) = \ln(X_0) + \mu \cdot (t - t_0) \quad (4)$$

A equação (4) corresponde à linearização da equação (3) e apresenta como declive a taxa específica de crescimento. Na figura a seguir apresenta-se a interpretação gráfica da equação.

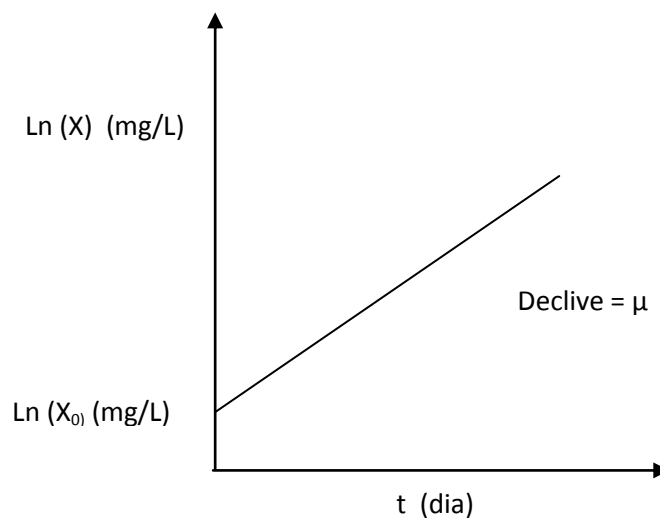


Figura 48 – Regressão linear da curva de crescimento na fase de crescimento exponencial.

Tempo de duplicação

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (5)$$



Concentração máxima

A concentração celular máxima é o máximo valor de concentração obtido em mg/L.

Produtividade máxima

$$P = \frac{X_f - X_0}{t_f - t_0} \quad (6)$$

Em que,

P – Produtividade (mg/(L.dia))

A produtividade máxima é a maior das produtividades calculadas.

Remoção de carbono [72]

A acumulação de carbono pelas células pode ser calculada somando as parcelas obtidas pela equação seguinte, no tempo que demorou o ensaio.

$$RC = (X_2 - X_1) \cdot \alpha_C \cdot V \cdot \frac{M_{CO_2}}{M_C} \quad (7)$$

Em que:

RC – Remoção de carbono (g)

α_C – Fração mássica de carbono na microalga

V – Volume líquido do reator (L)

M_{CO_2} – Massa molar do dióxido de carbono (g/mol)

M_C – Massa molar do carbono (g/mol)

A tabela seguinte apresenta os valores de taxa máxima específica de crescimento, tempo de duplicação, produção máxima e de remoção de carbono para os ensaios realizados. Os cálculos pormenorizados apresentam-se no anexo I.

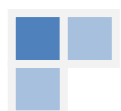


Tabela 14 – Parâmetros cinéticos

Condições e microalga		Taxa máxima específica crescimento μ (dia ⁻¹)	Tempo de duplicação t_D (dia)	Concentração Máxima $C_{m\acute{a}x}$ (mg/L)	Produção máxima $P_{m\acute{a}x}$ (mg/(L.dia))	Remoção de carbono (mg)
Balão	<i>Chlorella sp</i>	0.07	10	296	9	191
Erlenmeyer	<i>Clorella minutíssima</i>	0.04	16	98	4	67
Fotobiorreator	<i>Chlorella sp</i>	0.15	4,6	343	31	800
Meio M ₇	<i>Clorella minutíssima</i>	0.07	10	230	11	557
Fotobiorreator	<i>Chlorella sp</i>	0.16	4,3	378	22	862
Meio M ₇ (3x)	<i>Clorella minutíssima</i>	Morte da microalga				
Fotobiorreator	<i>Chlorella</i>	A Crescimento muito lento				
Meio filtralite	<i>sp</i>					

Pela análise dos parâmetros registados na tabela anterior podemos concluir que os valores obtidos são bastante mais baixos que os indicados na literatura [7, 23, 24]. Este facto deve-se muito provavelmente à grande dificuldade verificado no controlo do caudal de CO₂ injetado, bem como um défice de luminosidade, que prejudicaram o crescimento mais rápido das microalgas.

4.6 - Recuperação da biomassa algal

Após os crescimentos realizados, procedeu-se a centrifugação da microalga em suspensão, para a sua recuperação. As imagens seguintes mostram a microalga colocada em tubos de centrífuga, antes e depois da centrifugação.



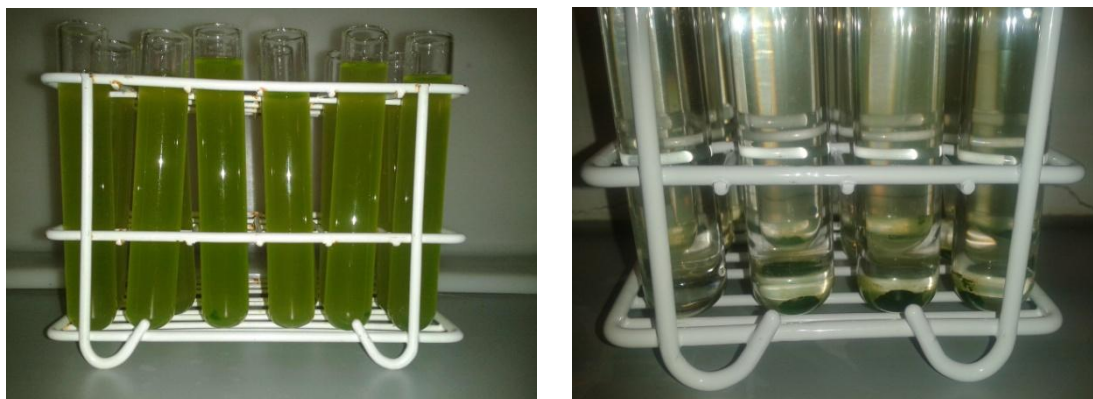


Figura 49 – Centrifugação da microalga:

a) Microalga antes da centrifugação

b) Microalga depois da centrifugação

Após centrifugação a microalga foi seca até peso constante. As figura 47 retratam a microalga *Chlorella sp* após secagem em estufa e as figuras 48 a) e b) as duas microalgas após serem retiradas da caixa de Petri.

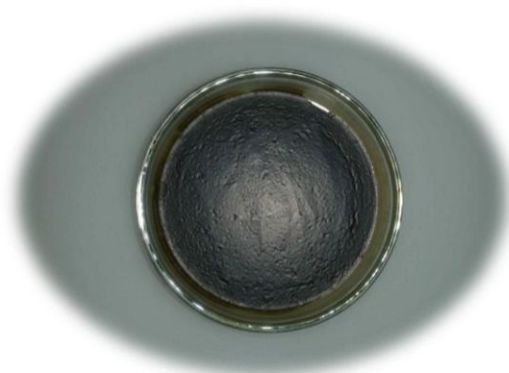


Figura 50 – Microalga *Chlorella sp* após secagem.



(a)



(b)

Figura 51 – *Chlorella sp* seca (a) e *Chlorella minutíssima* seca (b)



4.7 - Extração do Óleo das Microalgas

A extração do óleo foi feita pelo método indicado, as figuras seguintes documentam algumas das fases desse método.

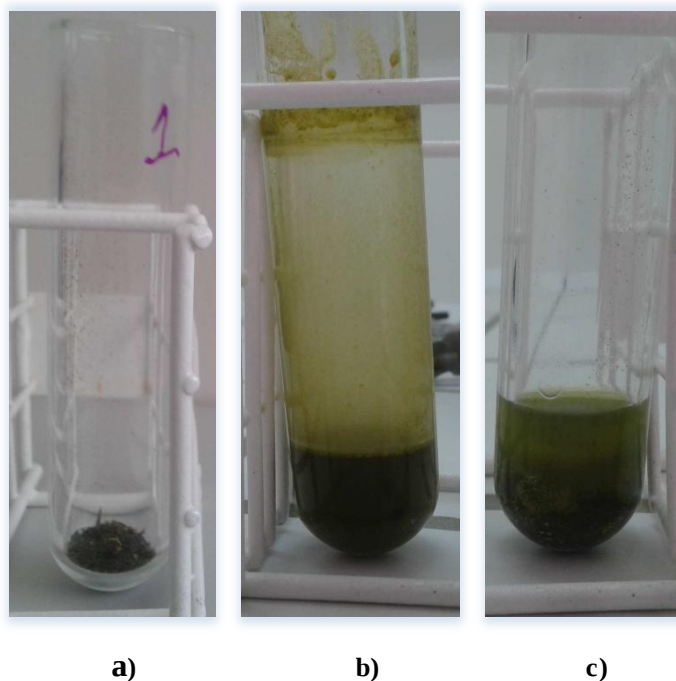


Figura 52 – Fases da extração do óleo:

a) alga seca

b) Após agitação com solventes

c) Após centrifugação

Após secagem em estufa até peso constante registou-se um teor em óleo de 38.5% para a *Chlorella sp* e de 20.6% para *Chlorella minutíssima*, valores consonantes noutros trabalhos [7], mas que devem ser confirmados em trabalhos futuros.

Capítulo 5 - Conclusão e sugestões de trabalhos futuros

A primeira parte deste trabalho passou pelo dimensionamento de um fotobiorreator, capaz de promover o crescimento de biomassa algal. Este objetivo foi claramente conseguido, o fotobiorreator desenhado é claramente funcional, resistente e de fácil limpeza. Garantiu-se a estanquicidade, a termostatização do meio de crescimento e uma muito fácil operação. Este sucesso comprova-se pelos ensaios conseguidos, sob diversas condições e com diferentes microalgas.

A grande dificuldade verificada esteve relacionada pela agitação do meio de crescimento. Em trabalhos futuros poderá ser ponderada uma forma e uma colocação diferentes para a difusão do gás carbónico. Esta solução poderá passar pelo desenho de um difusor, dispensando a pedra difusora, e a sua fixação no fundo do reator. Poder-se-á ainda ponderar a colocação de uma chicana no centro do reator, de forma a obter-se um reator do tipo *air-lift*, que vários autores consideram mais eficiente na difusão gás-líquido [68, 69].

Após a realização dos ensaios descritos, pode-se concluir que a microalga *Chlorella sp*, é claramente mais eficiente do que a *Chlorella minutíssima*, isto apesar de diversas referências bibliográficas consultadas afirmarem o contrário. Foram feitos contactos com a Algoteca de Coimbra no intuito de encontrar uma explicação para o facto, não se tendo chegado a uma razão satisfatória. É provável que a estirpe adquirida estivesse enfraquecida, por alguma razão, o que só se poderá confirmar fazendo ensaios com uma outra estirpe de *Chlorella minutíssima* em trabalhos futuros.

Pela análise dos parâmetros cinéticos da tabela 13, pode-se concluir que embora o crescimento da microalga *Chlorella sp* não tenha acontecido conforme o esperado, atingindo valores de taxa máxima específica de crescimento, tempo de duplicação, produção máxima, concentração máxima e de remoção de dióxido de carbono bastante modestos, é uma microalga que pode ser claramente utilizada para o fim proposto. Assim pode-se concluir que o crescimento desta microalga em meio M₇ será o mais indicado para a mitigação de dióxido de carbono, mesmo tendo em conta, que os parâmetros cinéticos são ligeiramente inferiores aos obtidos com meio M₇ mais concentrado, mas que obviamente será economicamente mais favorável, visto que a diferença verificada nos dois



crescimentos ser muito pequena, quando comparada com o custo do deste meio mais concentrado, três vezes superior. Os valores obtidos permitem observar, que para um crescimento de 1000 m³ de meio, valor bastante conservador em termos industriais, conseguem-se produzir aproximadamente 310 kg de biomassa algal, que correspondem a uma mitigação de 570 kg de CO₂, isto para um ciclo de 11 dias. Se considerarmos 25 ciclos anuais, obtém-se 7750 kg de biomassa produzida, dos quais cerca de 3000 kg são óleo e fixando 14250 kg de CO₂.

Otimizando o processo estes valores poderão ser substancialmente aumentados. A otimização do processo passa por um estudo de parâmetros como luminosidade e pH mais adequados, que possibilitem um mais rápido e maior crescimento, um meio não sintético, mesmo que tenha que ser enriquecido com oligoelementos e vitaminas, ou ainda uma microalga com maior rendimento. A temperatura é outro fator a ter em conta, considerando-se, no entanto, que se trabalhou com a temperatura ideal, como indicado por Grossman et al. [65], ou Chinnasamy *et al.* [71]. Apresenta-se assim um vasto campo de investigação futuro.

Luminosidade

A iluminação do reator foi feita recorrendo-se a duas lâmpadas tipo luz do dia, num ciclo de 12 horas claro, 12 horas de escuro, e que produziam uma intensidade luminosa de 2000 lux. Relativamente ao ciclo claro-escuro escolhido, parece-nos ser o mais indicado, uma vez que se caminha para uma instalação a ser implementada ao ar livre, portanto com condições próximas das utilizadas, no entanto, este tópico já foi alvo do estudo de autores, e que concluíram que não é o que produz maior rendimento, o ensaio de Bouterfas *et al.* [73], em que se fez variar o fotoperíodo, mostrou que o crescimento máximo se verifica sob radiância constante (24 h). No entanto, a partir das 15 h de radiância a variação no crescimento ficou cada vez mais impercetível. O autor concluiu que 9h na ausência de luz são suficientes para a fase escura da fotossíntese.

Face aos estudos feitos por outros autores, parece-nos que a luminosidade utilizada foi claramente insuficiente. Jacob-Lopes *et al.* [34], fizeram um estudo com diferentes intensidades luminosas verificando que mesmo com 11000 lux não provocou o fenómeno



de foto inibição celular, uma vez que nestas condições, registaram elevadas taxas de crescimento. Por outro lado, observaram que quando os cultivos foram conduzidos a 960 lux, houve redução pronunciada do crescimento celular, sugerindo que nestas condições há limitação da energia necessária para a sequência da reação fotossintética. Diversos trabalhos, Kitaya *et al.* [74], Molina Grima *et al.* [75], Pulz & Scheinbenbogen [76] e Lee & Low [77], demonstram o efeito inibidor de luminosidades inadequadas. De acordo com estes autores, a atividade fotossintética eleva-se com o aumento da irradiação até determinados valores em que começa a ocorrer inibição do crescimento celular.

Em trabalho futuro dever-se-á ponderar o aumento do número de lâmpadas, aumentando, assim, a intensidade luminosa.

pH

Nos estudos efetuados em fotobiorreator constatou-se uma clara dificuldade no controlo do pH, como é facilmente perceptível nas figuras 40, 43 e 46. Aliás esta foi a principal dificuldade ao longo de o trabalho experimental, e está diretamente relacionada com o facto de não se dispor de controladores de caudal de gases. Existiu, portanto, uma enorme dificuldade em controlar a quantidade de CO₂ injetada o que provocou flutuações nos valores do pH, uma vez que tendencialmente deveria subir ao longo do crescimento da microalga, mas quando um excesso de gás era injetado acidificava o meio prejudicando o crescimento. Em ensaios futuros, este será quanto a nós, o primeiro problema a abordar, de forma a permitir um controlo do valor do pH, que deverá aumentar durante o crescimento.

A elevação gradual do pH em função do tempo de residência no reator é acompanhada do aumento da massa celular no fotobiorreator. De acordo com Lee, Apel e Walton [78], a elevação do pH em cultivos fotossintéticos é um indicador do consumo de carbono inorgânico devido ao crescimento celular. Estes autores reportam que o incremento do pH no meio de cultivo é atribuído a dois mecanismos principais; primeiro, ocorre o transporte de iões hidróxido para o exterior da célula, através da reação catalisada pela enzima anidrase carbónica durante a conversão dos iões bicarbonato dentro da célula para fornecer CO₂ à reação fotossintética, elevando o pH do meio de cultivo. Um segundo mecanismo potencial é o aumento do pH devido à atividade da enzima ribulose-1,5-bifosfato



carboxilase cuja atividade depende sensivelmente do pH, aumentando à medida que o pH se eleva.

Todo o trabalho experimental foi realizado com injeção de CO₂ puro pressurizado. Em trabalhos futuros será interessante diluir o dióxido de carbono num solvente inerte como por exemplo o azoto, considerando diversas concentrações até se atingir a concentração ótima. Até porque embora as microalgas utilizadas suportem muito elevados teores de CO₂ em solução, em condições industriais, a percentagem de dióxido de carbono em gases efluentes é reduzida. Numa utilização prática do processo para sequestro de carbono será interessante ter valores mais próximos possível de efluentes gasosos reais, nomeadamente 10-12% que são os valores típicos para a queima de combustíveis fósseis [79]. Diversos autores já fizeram estes estudos, de acordo com Cheng et al. [80], a concentração de dióxido de carbono na corrente de ar do fotobiorreator é um parâmetro determinante no cultivo fotossintético de microalgas, já que a concentração deste composto não deverá ser excessivamente baixa, de modo a limitar a disponibilidade de carbono às células, e também não deverá exceder um limite superior, evitando problemas de inibição de crescimento.

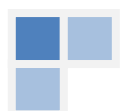
Meio

O meio utilizado foi o meio sintético M₇ que tem as condições necessárias para o crescimento das microalgas estudadas. Face aos baixos parâmetros cinéticos registados tentou-se aumentar a concentração deste meio, até porque é um meio de manutenção e não de crescimento. O efeito da concentração não foi significativo. Tentou-se ainda optar por um meio de um tratamento resultante do tratamento terciário de um efluente sintético por macrófitas. A microalga não morreu neste meio mas também não cresceu, provavelmente por falta de oligoelementos e vitaminas necessárias ao seu desenvolvimento. Será interessante em trabalhos futuros trabalhar este meio, uma vez que resultaria num ponto importante a ter em conta para a redução das despesas de um projeto que vise a mitigação de dióxido de carbono de gases efluentes de chaminés industriais, tornando-o viável economicamente.



Óleo

O teor de óleo obtido encontra-se entre os encontrados por outros autores. Uma análise futura passaria por determinar se seria mais viável queimar diretamente a biomassa algal obtida na caldeira de uma unidade industrial, ou se por outro lado se deveria investir na produção de biodiesel. Em nosso entender fechar-se-ia um ciclo, aproveitando a biomassa produzida nos fotobiorreatores para produção de energia por queima nas caldeiras, recirculando o dióxido de carbono daí resultante aos fotobiorreatores. Esta situação representaria claramente um enorme saldo positivo, quer ambientalmente, quer economicamente, uma vez que reduziria as despesas com material combustível na unidade fabril.





6 - Bibliografia

- [1] – REIS, ALBERTO, **As microalgas na produção do biodiesel**, Jornadas do curso de Engenharia do Ambiente e Biológica, Ambiente e Bioenergias, Instituto Politécnico de Tomar, Tomar, Março 2011.
- [2] – MAEDA, K.; OWADA M.; KIMURA N.; OMATA K.; KARUBE I.; **CO₂ fixation from the fuel-gas on coal-fired thermal power plant by microalgae**. Energy conversion and management, vol.36, pág.717-720, 1995.
- [3] – MORAIS, M.; COSTA, J. **Bioprocessos para remoção de dióxido de carbono e óxido de nitrogênio por microalgas visando a utilização de gases gerados durante a combustão do carvão**, Quim. Nova, Vol. 31, No. 5, 1038-1042, 2008.
- [4] – BORGES, L; FARIA, B; ODEBRETCH, C; ABREU, P. **Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas usadas na aquicultura: primeiros passos para o desenvolvimento de um “mecanismo de desenvolvimento limpo”**. Atlântica, Rio Grande, 29(1): 35-46, 2007.
- [5] – ARONSON, E.L.; MCNULTY, S.G. **Appropriate experimental ecosystem warming methods by ecosystem, objective and practicality**. Agricultural and forest meteorology, vol.149, pag.1791-1799, 2009.
- [6] - BENETTO, E.; POPOVICI, E.; ROUSSEAU, P. **Life cycle assessment of fossil CO₂ emissions reduction scenarios in coal-biomass based electricity production**. Energy Conversion and Management, n°45, pág.3053–3074, 2004.
- [7] - MATA, T.M.; MARTINS, A.A.; CAETANO, N.S. **Microalgae for biodiesel production and other applications: A review**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, vol.14, p.217-232, 2010.
- [8] - www.worldmapper.org, em 07.07.2012.
- [9] - DAGOUMAS, A.S.; PAPAGIANNIS, G.K.; DOKOPOULOS, P.S. **An economic assessment of the Kyoto Protocol application**. Energy Policy, n°34, pág.26–39, 2006.
- [10] – www.oilgae.com, em 05.05.2012.
- [11] - HHOO, H. H.; TAN, R. B. H. **Life Cycle Investigation of CO₂ Recovery and Sequestration**. Environ. Sci. Technol., vol.40, pag.4016-4024, 2006.
- [12] - PLASYNSKI, S. I.; CHEN, Z. Y. **Review of CO₂ capture technologies and some improvement opportunities**. Preprints of the Division of Fuel Chemistry of the American Chemical Society, vol.45, n°4. pág.644-649, 2000.



- [13] - HUSSAIN, A.; HAGG, M.. **A feasibility study of CO₂ capture from flue gas by a facilitated transport membrane.** Journal of Membrane Science, v.359, p.140-148, 2010.
- [14] - CARBON DIOXIDE CAPTURE AND STORAGE Special Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge University Press, 2006.
- [15] - HAUGEN, H. A.; EIDE, L. I. **CO₂ Capture and disposal: the realism of large scenarios.** Energy Convers. Mgmt, vol.37, Nos 6-8, pág.1061-1066, 1996.
- [16] – BILANOVIC, D.; ANDARGATCHEW, A; KROEGER, T; SHELEF, G; **Freshwater and marine microalgae sequestering of CO₂ at different C e N concentrations – response surface methodology analysis.** Energy Conversion and Management, nº50, pág.262–267, 2009.
- [17] - LI, Y.; HOSMAN, M.; WU, N.; LAN, C.Q.; DUBOIS-CALERO, N. **Biofuels from Microalgae.** Biotechnol. Prog, vol.24, pág.815-820, 2008.
- [18] – GUIMARÃES, J.; AMARAL, R.; SANTOS, M.F.; SANTOS, L.M.A.; **Colheita, identificação e conservação de microalgas.** ACOI, Algoteca do Departamento de Botânica da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 2009.
- [19] - SONG, D.; FU, J.; SHI, D. **Exploitation of Oil-bearing Microalgae for Biodiesel.** Chinese Journal of Biotechnology, vol.24, nº3, pág. 341-348, 2008.
- [20] – SANTOS, L.; CALAZANS, N.; MARINHO, Y.; SANTOS, A.; NASCIMENTO, R.; VASCONCELOS, R.; DANTAS D.; GÁLVEZ, A. **Influência do fotoperíodo no crescimento da *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae) visando produção de biodiesel.** Comunicação apresentada na Semana Nacional da Ciência e Tecnologia, Recife, 2011.
- [21] - SANTOS, L.; CALAZANS, N.; MARINHO, Y.; SANTOS, A.; NASCIMENTO, R.; VASCONCELOS, R.; DANTAS D.; GÁLVEZ, A. **Avaliação do crescimento da *Chlorella vulgaris* em diferentes pH objetivando a sua inserção na matéria prima do biodiesel.** Comunicação apresentada na Semana Nacional da Ciência e Tecnologia, Recife, 2011.
- [22] – ZHENG, X.; MICHAEL, K; DANQUAH, M. K.; CHEN, X. D.; LU, Y., **Microalgae bioengineering: from CO₂ fixation to biofuel production,** Renewable and sustainable Energy Reviews, vol.15, pág.3252-3260, 2011.
- [23] – Congresso Internavional de Bioenergia, Curitiba, 2009.
- [24] – LI, Y.; MARKLEY, B; MOHAN, A.; RODRIGUEZ-SANTIAGO, V.; THOMPSON, D.; NIEKERK, D., **Utilization of carbon dioxide from Coal-fired power**



plant for the Production of value-added products, Submitted in partial fulfillment of the requirements for the Design Engineering of Energy and Geo-Environmental Systems Course (EGEE 580), abril, 2006.

[25] - CHOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F. J. **Kinetic and Stoichiometric Relationships of the Energy and Carbon Metabolism in the Culture of Microalgae**. vol.3, nº1, pág.21-34, 2004.

[26] - DANQUAH, M.K.; GLADMAN, B.; MOHEIMANI, N.; FORDE, G.M. **Microalgal growth characteristics and subsequent influence on dewatering efficiency**. Chemical Engineering Journal, vol.151, pag.73-78, 2009.

[27] – PEQUENO, M., **Avaliação do Potencial Produtivo de Óleos Obtidos a Partir de Microalgas por Cromatografia Gasosa**, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Paraíba, 2010.

[28] - WANG, B.; LI, Y.; WU, N.; LAN, C.Q. **CO₂ bio-mitigation using microalgae**. Appl. Microbiol. Biotechnol., nº79. pág.707-718, 2008.

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

[30] - DOUSKOVA, I.; DOUCHA, J.; LIVANSKY, K.; MACHAT, J.; NOVAK, P.; UMYSOVA, D.; ZACHLEDER, V.; VITOVA, M. **Simultaneous flue gas bioremediation and reduction of microalgal biomass production costs**. Appl. Microbiol. Biotechnol. vol.82, pág.179-185, 2009.

[31] - CHISTI, Y. **Biodiesel from microalgae**. Biotechnology Advances. vol.25, pág.294-306, 2007.

[32] - PRUVOST, J.; VOOREN, G.V.; COGNE, G.; LEGRAND, J. **Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactors**. Bioresource Technology, vol.100, pág.5988-5995, 2009.

[33] - WATANABE, Y.; HALL, D.O. **Photosynthetic CO₂ conversion technologies using a photobioreactors incorporating microalgae -energy and material balances-**. Energy Convers. Mgmt. vol.37, nº6-8, pág.132-1326, 1996.



- [34] - JACOB-LOPES, et al., **Biomass production and carbon dioxide fixation by *Aphanothece microscopica Nageli* in a bubble column photobioreactor**, Biochem. Eng. J., 2008.
- [35] - MAYO, A. W.; NOIKE. T. **Response of mixed culturas of *Chlorella vulgaris* e heterotrophic bacteria to varia of pH**. Pergamon. Wat. Sci.Tech. vol. 30, pág.285-294. 1994.
- [36] - JORQUERA, O.; KIPERSTOK, A.; SALES, E.A.; EMBIRUÇU, M.; GHIRARDI, M.L. **Comparative energy life-cycle analyses of microalgae biomass production in open ponds and photobioreactors**. Bioresource Technology. v.101.p.1406-1413, 2010.
- [37] - SCHENK, P.M.; THOMAS-HALL, S.R.; STEPHENS, E.; MARX, U.C.; MUSSGNUG, J.H.; POSTEN, C.; KRUSE, O.; HANKAMER, B. **Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production**. Bioenerg. Res. vol.1, pág.20-43, 2008.
- [38] - SEVILLA, J. M. F.; GARCIA, M. C. C.; MIRON, A. S.; BELARBI, E. H.; CAMACHO, F. G.; GRIMA, E. M., **Pilot-plant-scale outdoor mixotrophic cultures of *Phaeodactylum tricornutum* using glycerol in vertical column and airlift photobioreactors: studies in fedbatch mode**. *Biotechnology Progress* 2004, 20, 728-736.
- [39] - LEE, J.S.; LEE, J.P. **Review of Advances in Biological CO₂ Mitigation Technology**. Biotechnology and Bioprocess Engineering. vol.8, pág.354-359, 2003.
- [40] - Ryu HJ, Oh KK, Kim YS. **Optimization of the influential factors for the improvement of CO₂ utilization efficiency and CO₂ mass transfer rate**. J. Ind. Eng. Chem. 15: 471-475., 2009.
- [41] - 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. vol.153, pág.120-126, 2009.
- [42] - MOLINA GRIMA, E.; BELARBI, E. H.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; MEDINA, A. R.; CHISTI, Y. **Recovery of microalgae biomass and metabolites: process options and economics**. Biotechnology Advances, vol. 20, pág. 491-515, 2003.
- [43] - VILLASCLARAS, S.S.; SANCHO, A.E.M.; CABALLERO, M.T.E.; PÉREZ, A.D. **Production of Microalgae from Olive Mill Wastewater**. International Biodeterioration & Biodegradation. pág.245-247, 1996.



- [44] - LEE, B.K.; KIM, J.K. **Production of *Candida utilis* biomass on molasses in different culture types.** Aquacultural Engineering. v.25.p.11-124, 2001.
- [45] - YUN, Y.S.; LEE, S.B.; PARK, J.M.; LEE, C.I.; YANG, J.W. **Carbon Dioxide Fixation by Algal Cultivation Using Wastewater Nutrients.** J. Chem. Tech. Biotechnol. N°69, pág.451-455, 1997.
- [46] - KADAM, K. L. **Power plant flue gas as a source of CO₂ for microalgae cultivation: economic impact of different process options.** Energy Convers. Mgmt. Vol 38, pág. S505-S510, 1997.
- [47] - CHAE, S.R.; HWANG, E.J.; SHIN, H.S. **Single cell protein production of *Euglena gracilis* and carbon dioxide fixation in an innovate photo-bioreactor.** Bioresource Technology. vol.97, pág.322-329, 2006.
- [48] - OTSUKI, T. **A study for the biological CO₂ fixation and utilization system.** The Science of the Total Environment. vol.277, pág.21-25, 2001.
- [49] - LAU, P.S.; TAM, N.F.Y.; WONG, Y.S. **Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater.** Environmental Pollution. vol.89, pág.59-66, 1995.
- [50] - KAYA, V.M.; GOULET, J.; NOUE, J. ; PICARD, G. **Effect of intermittent CO₂ enrichment during nutrient starvation on tertiary treatment of wastewater by alginate-immobilized *Scenedesmus bicellularis*.** Enzyme and Microbial Technology.n°18, pág.550-554, 1996.
- [51] – SIMÕES, ALBERTO, **Biorrefinaria – um conceito para um futuro sustentável,** Jornadas do curso de Engenharia do Ambiente e Biológica, Ambiente e Bioenergias, Instituto Politécnico de Tomar, Tomar, Março 2011.
- [52] - ONO, E.; CUELLO, J.L. **Feasibility Assessment of Microalgal Carbon Dioxide Sequestration Technology with Photobioreactor and Solar Collector.** Biosystems Engineering. vol.95, n°4, pág.597-606, 2006.
- [53] - VÍLCHEZ, C.; GARBAYO, I.; LOBATO, M.V.; VEGA, J.M. **Microalgae-mediated chemicals production and wastes removal.** Enzyme and Microbial Technology. N°20, pág.562-572, 1997.
- [54] - GOUVEIA, L.; EMPIS, J. **Relative stabilities of microalgal carotenoids in microalgal extracts, biomass and fish feed: effect of storage conditions,** Innovate Food Science and Emerging Technologies, vol.4, pág. 227-233, 2003.



- [55] - ARESTA, M.; DIBENEDETTO, A.; BARBERIO, G. **Utilization of macro-algae for enhanced CO₂ fixation and biofuels production: Development of a computing software for an LCA study.** Fuel Processing. vol.86, pág.1679-1693, 2005.
- [56] - TSUKAHARA, K.; SAWAYAMA, S. **Liquid Fuel Production Using Microalgae.** Journal of the Japan Petroleum Institute. v.48.n.5.p.251-259, 2005.
- [57] - POWELL, E.E.; HILL, G.A. **Economic assessment of an integrated bioethanol-microbial fuel cell facility utilizing yeast and photosynthetic algae.** Chemical Engineering Research and design. vol.87, pág.1340-1348, 2009.
- [58] - www.ebb-eu.org, consultado em 24.07.2011
- [59] - www.biodiesel.org, consultado em 24.07.2011
- [60] - UM, B.H.; KIM, Y.S. **Review: A chance for Korea to advance algal-biodiesel technology.** Journal of Industrial and Engineering Chemistry. vol.15, pág.1-7, 2009.
- [61] – SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R.; **Transesterification of vegetable oils: a review**, Journal Brazil Chemical Society, Vol.9, nº3, pag.199-210, 1998.
- [62] – VERMA, N.; MEHROTRA, S., SHUKLA, A; MISHRA, B.; Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories: A comprehensive discussion, African Journal of Biotechnology Vol. 9 (10), pág. 1402-1411, 8 March, 2010.
- [63] - MENG, X.; YANG, J.; XU, X.; ZHENG, L. ; NIE, Q. ; XIAN, M. **Biodiesel production from oleaginous microorganisms.** Renewable Energy. vol.34, pág.1-5, 2009.
- [64] – RADMANN, E.; COSTA, J.; **Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO**, Quim. Nova, Vol. 31, No. 7, pag. 1609-1612, 2008.
- [65] - GROSSMAN, A.R.; SCHAEFER, M.R.; CHIANG, G.G.; COLLIER, J.L. **The Responses of cyanobacteria to environmental conditions: light and nutrients.** In: Bryant, D.A. The Molecular Biology of Cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers, pág.641-668, 1994.
- [66] – JARENKOW, A.; **Influência da vazão de entrada de ar no crescimento de microalgas em reatores tipo *airlift***, Universidade Federal do Rio Grande, 2011.
- [67] – FERREIRA, P. **Manual de cultivo e bio encapsulação da cadeia alimentar para larvicultura de peixes marinhos**, IPIMAR, 2009.



- [68] – JACOB-LOPES, E., SCOPARO C., QUEIRÓS, M. FRANCO, T., **Biotransformations of carbon dioxide in photobioreactors**, Energy Conversion and Management, 51, pág. 894-900, 2009.
- [69] – ESPINDOLA, J.; MUNIZ, L.; BORGES, F.; FARENZENA, M.,; TRIERWEILER, J. **Análise Hidrodinâmica de Fotobiorreatores para a produção de Microalgas**, XVIII SIMPOSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, Caxias do Sul, Brasil, 2011.
- [70] - Redaelli, C.; Kochem, L.; Dierings, T.; Jarenkow, A.; Roman, J.; Marcilio, N.; Rech, R. **Influência da intensidade da luz sobre a biofixação de carbono em *Chlorella minutíssima***, Universidade Federal do Rio Grande, 2011.
- [71] – CHINNASAMY, S.; RAMAKRISHNAN, B.; BHATNAGAR, A.; DAS, K. **Biomass production potential of a wastewater alga *Chlorella vulgaris* under elevated levels of carbon dioxide and temperature**, International Journal of Molecular Sciences, 10, pp. 518-532, 2009.
- [72] – MORAIS, M.; COSTA, J. Bioprocessos para remoção de dióxido de carbono e óxido de nitrogênio por microalgas visando a utilização de gases gerados durante a combustão do carvão, Quim. Nova, Vol. 31, No. 5, pág. 1038-1042, 2008.
- [73] - BOUTERFAS, R.; BELKOURA, M. E DAUTA, A. **The effects of irradiance and photoperiod on the growth rate of three freshwater green algae isolated from a eutrophic lake**, *Limnetica*, 25, Vol. 3, pág. 647-656, 2006.
- [74] - KITAYA, Y.; AZUMA, H. ; KIYOTA, M. **Effects of temperature, CO₂/O₂ concentrations and light intensity on cellular multiplication of microalgae, *Euglena gracilis***. Advances in Space Research. Vol. 35, pág. 1584-1588, 2005.
- [75] - MOLINA GRIMA, E.; FERNANDÉZ, F.G.A.; CAMACHO, F.G.; CHISTI, Y. **Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scale up**. *Journal of Biotechnology*. Vol. 70, pág 231-247, 1999.
- [76] - PULZ, O. ; SCHEINBENBOGEN, K. **Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input**. *Advances Biochemical Engineering and Biotechnology*. Vol.59, pág. 123-152, 1998.
- [77] - LEE, Y.K.; LOW, C.S. **Productivity of outdoor algal cultures in enclosed tubular photobioreactors**. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol.40, pág. 1119-1122, 1992.



- [78] - LEE, B.D.; APEL, W.A.; WALTON, M.R. **Calcium carbonate formation by *Synechococcus* sp. strain PCC 8806 and *Synechococcus* sp. strain PCC 8807.** Bioresource Technology. Vol.97, pág. 2427-2434, 2006.
- [79] - LEE, J.S.; KIM, D.K.; LEE, J.P.; PARK, S.C.; KOH, J.H.; CHO, H.S.; KIM, S.W. **Effects of SO₂ and NO on growth of *Chlorella* sp. KR-1.** Bioresource.Technology, Vol. 8, pág. 1–4, 2002.
- [80] - CHENG, L.; ZHANG, L.; CHEN, H.; GAO, C. **Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in a membrane-photobioreactor.** Separation and Purification Technology, Vol. 50, pág. 324-329, 2006.

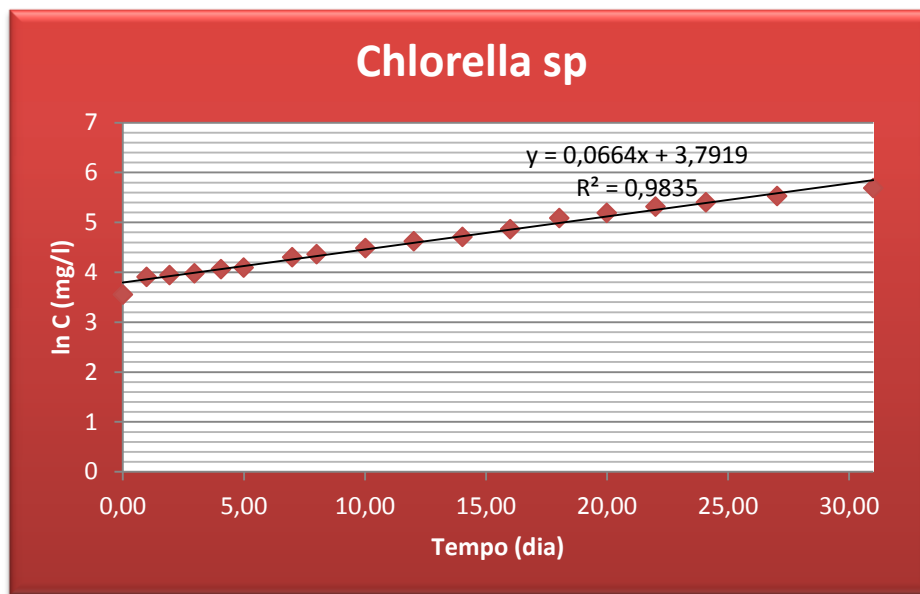


Anexo I – Cálculo de parâmetros cinéticos

Balão Erlenmeyer – *Chlorella sp*

Taxa específica máxima

Para o cálculo desta taxa foi linearizada a zona de crescimento exponencial, de acordo com a figura seguinte:



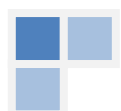
$$\mu_{\text{máx}} = 0,07 \text{ dia}^{-1}$$

Tempo de duplicação

$$t_D = \frac{\ln 2}{0,07} = 10 \text{ dia}$$

Concentração máxima

$$C_{\text{máx}} = 296 \text{ mg/l}$$



Produtividade máxima

De acordo com a equação (6), construiu-se a tabela:

Tabela I.1 – Dados para o cálculo da produtividade máxima

Intervalo de tempo (dia)	$t_f - t_0$ (dia)	$X_f - X_0$ (mg/L)	P (mg/L.dia)
[0,00-0,98]	0,98	14,9	15,17
[0,98-1,93]	1,93	16,7	8,67
[1,93-2,95]	2,95	18,6	6,28
[2,95-4,05]	4,05	23,2	5,73
[4,05-4,99]	4,99	25,1	5,02
[4,99-6,99]	6,99	39,0	5,58
[6,99-8,00]	8,00	43,6	5,45
[8,00-10,02]	10,02	53,8	5,37
[10,02-12,02]	12,02	66,8	5,56
[12,02-14,03]	14,03	76,1	5,43
[14,03-16,00]	16,00	94,7	5,92
[16,00-18,03]	18,03	127,2	7,05
[18,03-19,99]	19,99	144,8	7,24
[19,99-22,00]	22,00	168,9	7,68
[22,00-24,09]	24,09	187,5	7,79
[24,09-27,03]	27,03	217,2	8,04
[27,03-31,00]	31,00	260,8	8,41

$$P_{\text{máx}} = 9 \text{ mg/(L.dia)} = 0,009 \text{ g/(L.dia)}$$

Remoção total de carbono

De acordo com

$$RC = (X_2 - X_1) \cdot \alpha_C \cdot V \cdot \frac{M_{CO_2}}{M_C}$$



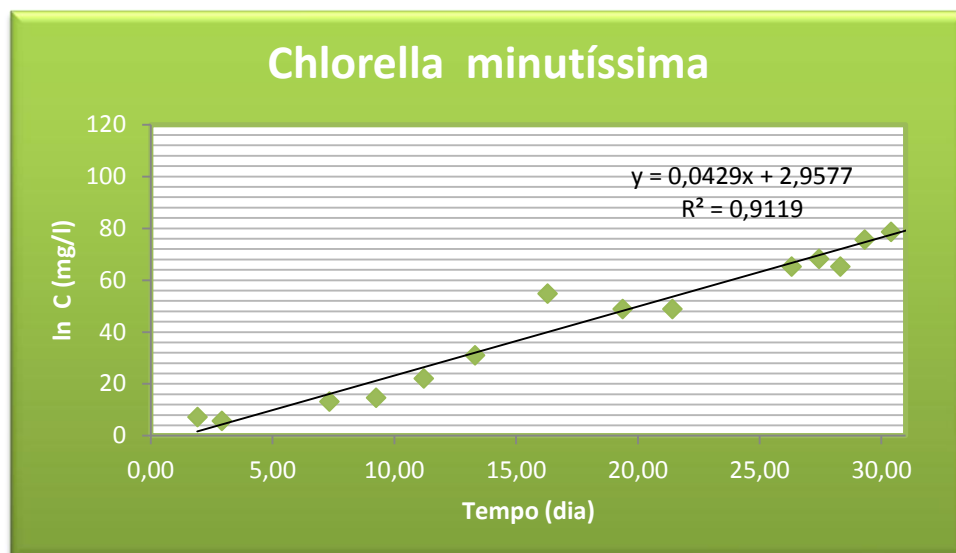
E considerando que as microalgas apresentam um valor médio de 50% do seu peso em carbono, obtém-se

$$RC = 191 \text{ mg de CO}_2$$

Balão Erlenmeyer – *Chlorella minutíssima*

Taxa específica máxima

Para o cálculo desta taxa foi linearizada a zona de crescimento exponencial, de acordo com a figura seguinte:



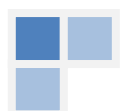
$$\mu_{\text{máx}} = 0,043 \text{ dia}^{-1}$$

Tempo de duplicação

$$t_D = \frac{\ln 2}{0,043} = 16 \text{ dia}$$

Concentração máxima

$$C_{\text{máx}} = 98 \text{ mg/l}$$



Produtividade máxima

De acordo com a equação (6), construiu-se a tabela:

Tabela I.4 – Dados para o cálculo da produtividade máxima

Intervalo de tempo (dia)	$t_f - t_i$ (dia)	$X_f - X_i$ (mg/L)	P (mg/L.dia)
[0,00-1,03]	1,02	11,9	11,66
[1,03-1,91]	1,90	19,3	10,17
[1,91-2,91]	2,90	17,9	6,15
[2,91-7,33]	7,32	25,3	3,46
[7,33-9,25]	9,24	26,8	2,90
[9,25-11,20]	11,19	34,2	3,06
[11,20-13,31]	13,30	43,1	3,24
[13,31-16,29]	16,28	67,0	4,11
[16,29-19,37]	19,36	61,0	3,15
[19,37-21,41]	21,40	61,0	2,85
[21,41-26,31]	26,30	77,4	2,94
[26,31-27,43]	27,42	80,3	2,93
[27,43-28,31]	28,30	77,4	2,73
[28,31-29,31]	29,30	87,8	3,00
[19,31-30,39]	30,38	90,8	2,99
[30,39-34,27]	34,26	98,2	2,87
[34,27-35,29]	35,28	110,1	3,12

$$P_{\text{máx}} = 4 \text{ mg/(L.dia)} = 0,004 \text{ g/(L.dia)}$$

Remoção total de carbono

De acordo com



$$RC = (X_2 - X_1) \cdot \alpha_C \cdot V \cdot \frac{M_{CO_2}}{M_C}$$

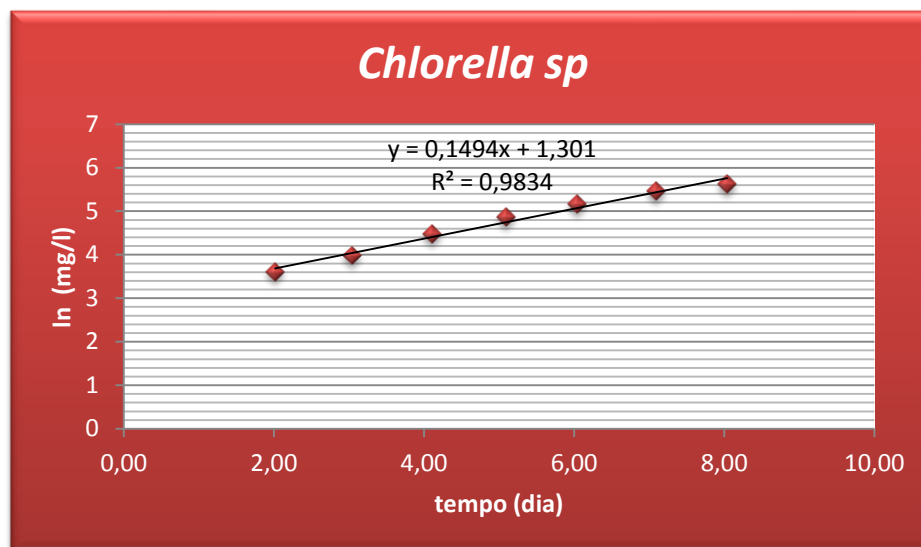
E considerando que as microalgas apresentam um valor médio de 50% do seu peso em carbono, obtém-se

$$RC = 67 \text{ mg de CO}_2$$

Fotobiorreator com meio M₇ – *Chlorella sp*

Taxa específica máxima

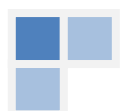
Para o cálculo desta taxa foi linearizada a zona de crescimento exponencial, de acordo com a figura seguinte:



$$\mu_{\text{máx}} = 0,15 \text{ dia}^{-1}$$

Tempo de duplicação

$$t_D = \frac{\ln 2}{0,15} = 4,6 \text{ dia}$$



Concentração máxima

$$C_{\text{máx}} = 343 \text{ mg/l}$$

Produtividade máxima

De acordo com a equação (6), construiu-se a tabela:

Tabela I.3 – Dados para o cálculo da produtividade máxima

Intervalo de tempo (dia)	$t_f - t_0$ (dia)	$X_f - X_0$ (mg/L)	P (mg/L.dia)
[0,10-0,90]	0,76	1,9	2,44
[0,90-2,01]	1,88	5,6	2,97
[2,01-3,04]	2,90	22,3	7,67
[3,04-4,11]	3,97	56,6	14,27
[4,11-5,09]	4,95	98,4	19,87
[5,09-6,04]	5,90	142,0	24,07
[6,04-7,09]	6,95	201,4	28,96
[7,09-8,04]	7,90	244,1	30,91
[8,04-9,04]	8,90	262,7	29,52
[9,04-10,04]	9,90	311,0	31,41
[10,04-11,00]	10,86	311,9	28,72
[11,00-13,04]	12,90	292,4	22,66

A produtividade máxima registou-se no 9º dia:

$$P_{\text{máx}} = 31,41 = 0,021 \text{ g/(L.dia)}$$

Remoção total de carbono

De acordo com

$$RC = (X_2 - X_1) \cdot \alpha_C \cdot V \cdot \frac{M_{\text{CO}_2}}{M_C}$$



E considerando que as microalgas apresentam um valor médio de 50% do seu peso em carbono, obtém-se

$$RC = 800 \text{ mg de CO}_2$$

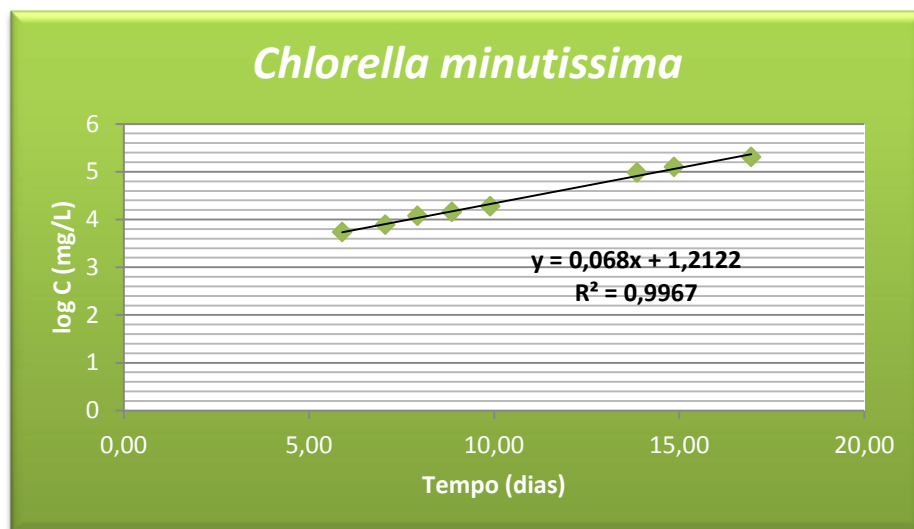
Rendimento médio da remoção de dióxido de carbono

O reator recebeu cerca de 1,5 kg de CO₂ durante o tempo que durou a experiência, o que representa um rendimento muito baixo de remoção, aproximadamente 0,05%.

Fotobiorreator com meio M₇ – *Chlorella minutissima*

Taxa específica máxima

Para o cálculo desta taxa foi linearizada a zona de crescimento exponencial, de acordo com a figura seguinte:



$$\mu_{\text{máx}} = 0,068 \text{ dia}^{-1}$$



Tempo de duplicação

$$t_D = \frac{\ln 2}{0.068} = 10 \text{ dia}$$

Concentração máxima

$$C_{\text{máx}} = 230 \text{ mg/l}$$

Produtividade máxima

De acordo com a equação (6), construiu-se a tabela:

Tabela I.4 – Dados para o cálculo da produtividade máxima

Intervalo de tempo (dia)	$t_f - t_i$ (dia)	$X_f - X_i$ (mg/L)	P (mg/L.dia)
[0,00-0,89]	0,88	-1,0	-1,13
[0,89-1,89]	1,88	20,0	10,62
[1,89-2,83]	2,82	17,0	6,02
[2,83-5,90]	5,89	29,0	4,93
[5,90-7,06]	7,05	36,0	5,11
[7,06-7,93]	7,92	46,0	5,81
[7,93-8,86]	8,85	51,0	5,76
[8,86-9,89]	9,88	59,0	5,97
[9,89-13,86]	13,85	133,0	9,60
[13,86-14,86]	14,85	151,0	10,17
[16,94-22,86]	16,93	189,0	11,16
[14,86-16,94]	22,85	217,0	9,50

A produtividade máxima registou-se entre o 17º e o 22º dias:

$$P_{\text{máx}} = 11 \text{ mg/(L.dia)} = 0,011 \text{ g/(L.dia)}$$



Remoção total de carbono

De acordo com

$$RC = (X_2 - X_1) \cdot \alpha_C \cdot V \cdot \frac{M_{CO_2}}{M_C}$$

E considerando que as microalgas apresentam um valor médio de 50% do seu peso em carbono, obtém-se

$$RC = 557 \text{ mg de CO}_2$$

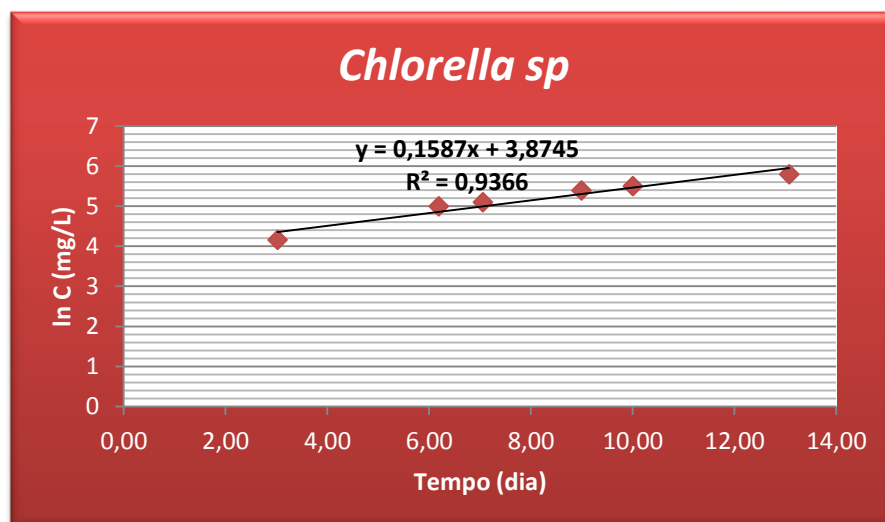
Rendimento médio da remoção de dióxido de carbono

O reator recebeu cerca de 6.2kg de CO₂ durante o tempo que durou a experiência, o que representa um rendimento muito baixo de remoção, aproximadamente 0,01%.

Fotobiorreator com meio M₇ mais concentrado – *Chlorella sp*

Taxa específica máxima

Para o cálculo desta taxa foi linearizada a zona de crescimento exponencial, de acordo com a figura seguinte:



$$\mu_{\text{máx}} = 0,16 \text{ dia}^{-1}$$

Tempo de duplicação

$$t_D = \frac{\ln 2}{0,16} = 4,3 \text{ dia}$$

Concentração máxima

$$C_{\text{máx}} = 378 \text{ mg/l}$$

Produtividade máxima

De acordo com a equação (6), construiu-se a tabela:

Tabela I.5– Dados para o cálculo da produtividade máxima

Intervalo de tempo (dia)	$t_f - t_0$ (dia)	$X_f - X_0$ (mg/L)	P (mg/L.dia)
[0,00-1,00]	0,99	3,7	3,75
[1,00-2,00]	1,99	11,1	5,60
[2,00-3,02]	3,01	22,3	7,40
[3,02-6,19]	6,18	105,8	17,13
[6,19-7,06]	7,05	121,6	17,26
[7,06-8,99]	8,98	177,3	19,74
[8,99-10,00]	9,99	202,4	20,25
[10,00-13,08]	13,07	285,9	21,88
[13,08-14,06]	14,05	297,0	21,15
[14,06-15,11]	15,10	310,0	20,54
[15,11-15,99]	15,98	312,8	19,57
[15,99-16,99]	16,98	324,0	19,08

A produtividade máxima registou-se no 13º dia:



$$P_{\text{máx}} = 21,88 = 0,022 \text{ g/(L.dia)}$$

Remoção total de carbono

De acordo com

$$RC = (X_2 - X_1) \cdot \alpha_C \cdot V \cdot \frac{M_{\text{CO}_2}}{M_C}$$

E considerando que as microalgas apresentam um valor médio de 50% do seu peso em carbono, obtém-se

$$RC = 862 \text{ mg de CO}_2$$

Rendimento médio da remoção de dióxido de carbono

O reator recebeu cerca de 1,5 kg de CO₂ durante o tempo que durou a experiência, o que representa um rendimento muito baixo de remoção, aproximadamente 0,03%.

