



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Instituto de Química

Luciana Nascimento Rocha

**Estudo da concentração de biomassa de microalgas por
filtração e floculação**

Rio de Janeiro

2010

LUCIANA NASCIMENTO ROCHA

Estudo da concentração de biomassa de microalgas por filtração e floculação

Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre, ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Biotecnologia.

Orientadores: Prof. Dr. Márcio Luis Lyra Paredes
Prof. Dr. Fábio Merçon

Rio de Janeiro
2010

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/NPROTEC

R672 Rocha, Luciana Nascimento
Estudo da concentração de biomassa de microalgas por
filtração e floculação. / Luciana Nascimento Rocha. – 2010.
98f.

Orientador: Márcio Luis Lyra Paredes
Orientador: Fábio Merçon
Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de
Janeiro, Instituto de Química.

1. Microalga - Teses. 2. Filtração por membranas – Teses. 3.
Floculação - Teses. 4. Biocombustíveis – Teses. I. Paredes,
Márcio Luis Lyra. II. Merçon, Fábio. III. Universidade do Estado
do Rio de Janeiro. Instituto de Química. IV. Título.

CDU 57.08

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial
desta dissertação.

Assinatura

Data

Luciana Nascimento Rocha

Estudo da concentração de biomassa de microalgas por filtração e floculação

Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação do Instituto de Química da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovado em: 19 de outubro de 2010

Banca examinadora:

Prof. Dr. Márcio Luis Lyra Paredes (Orientador)
Instituto de Química da UERJ

Prof. Dr. Fábio Merçon (Orientador)
Instituto de Química da UERJ

Prof^a. Dr^a. Ofélia de Queiroz Fernandes Araújo
Escola de Química da UFRJ

Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Torres
Faculdade de Tecnologia da UERJ

Prof. Dr. Antônio Carlos Augusto da Costa
Instituto de Química da UERJ

Rio de Janeiro

2010

Dedicatória

*À minha família:
Minha mãe querida e amada Neusa,
Ao meu pai que hoje infelizmente já não está mais presente,
aos meus tios Duilhon e Volney,
e ao meu noivo Thiago.*

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ser meu guia em todas as etapas da minha vida, pelas vitórias e todas as conquistas ao longo da minha vida.

A minha família, em especial a minha mãe, primeiramente por ser para mim um exemplo de superação, pela luta incansável, o apoio nos momentos de tristeza e desânimo, o incentivo e todo o esforço para eu estar aqui.

Aos meus orientadores e amigos Fábio Merçon e Márcio Luis Lyra Paredes pela paciência, conselhos, oportunidades e confiança. Obrigada por acreditar no meu potencial (em certos momentos mais que eu) e por me ajudar a crescer a cada dia.

Ao meu noivo Thiago pela presença constante ao meu lado, pelo apoio, companheirismo e por me passar muita confiança, carinho e amor.

A minha querida amiga Rejane por torcer e vibrar com as minhas conquistas e pela capacidade de ser eternamente minha amiga.

Aos técnicos e colegas Flávia e Veiga pelo profissionalismo, dedicação, sugestões e a amizade que sempre tiveram comigo.

Ao professores Antônio Carlos e André pelo auxílio, pela paciência e carinho.

À colega Marta Picardo pelo ensinamento compartilhado, pela atenção, paciência e carinho. Por contribuir de forma direta nessa dissertação.

À Capes pelo apoio financeiro

E a todos que passaram em minha vida durante esta etapa, que me auxiliaram, elogiaram e me apoiaram e que aqui não citei, deixo aqui meu MUITO OBRIGADA.

Epígrafe

Sucesso é uma questão de não desistir, e fracasso é uma questão de desistir cedo demais.

Walter Burke

RESUMO

Rocha, Luciana Nascimento. *Estudo da concentração de biomassa de microalgas por filtração e floculação*. 2010. 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

O cultivo de microalgas é uma matéria prima para produção de biocombustível e de captura de carbono devido a vantagens como alta produção de biomassa e rápido crescimento quando comparado com outras fontes de energia e não necessitar de terra fértil. O presente trabalho teve como objetivo estudar métodos de concentração da biomassa. A microalga utilizada foi a *Isochrysis galbana*. Os cultivos tiveram duração de 20 dias e concentração inicial de $7 \cdot 10^4$ cel/mL no meio de cultivo F2/Guillard. e foram realizados em fotobioreatores de 500 mL, 3 L e 12 L. Os experimentos foram conduzidos em foto-período de 12 h claro/escuro, com temperatura de 27 a 29 °C. Ao final dos cultivos, as amostras foram levadas para a sequência de processos de separação. Inicialmente, foram realizados ensaios de microfiltração em membrana com porosidade de 0,45 µm em procedimento do tipo “dead-end” e constatou-se a rápida e intensa formação de camada de fouling. Acrescentou-se uma etapa de separação por floculação preliminar à microfiltração, utilizando-se $Al_2(SO_4)_3$ como agente floculante. O meio coagulado foi então filtrado e microfiltrado. O estudo combinado das 3 etapas de separação possibilitou 99% de remoção de biomassa. O teor de óleo obtido foi de 22,4%. Portanto, o trabalho apresenta uma configuração de concentração da biomassa *Isochrysis galbana* visando o processo de produção de biocombustíveis.

Palavra – chave: Microalgas, Biocombustíveis, Filtração por membranas, Floculação

ABSTRACT

The cultivation of microalgae is a feedstock for biofuel production and carbon sequestration due to advantages such as high-biomass production and, fast growth when compared to other energy sources and does not require fertile land. This work aimed to study methods for biomass concentration. The microalgae used was *Isochrysis galbana*. The cultivation lasted 20 days and initial concentration of 70,000 cells / mL F2/Guillard culture medium and were performed in. Photobioreactors of 500 mL, 3 L and 12 L. The experiments were conducted in photoperiod of 12 h light / dark, temperature of 27-29 ° C. At the end of cultivation, samples were taken for the sequence of separation processes

Initially, tests were performed on microfiltration membrane with 0.45 µm pore diameter in a dead-end procedure, and the rapid and intense formation of fouling layer was noted. One step of preliminary separation by flocculation previous to microfiltration was added to the process, using $Al_2(SO_4)_3$ as flocculant agent. The coagulated medium was then filtered and microfiltered. The combined study of three separation steps allowed 99% removal of biomass. Oil content obtained was 22.4%. Therefore, the work presents a configuration in biomass concentration of *Isochrysis galbana* aiming at the process of production of biofuels.

Key-word: Microalgae, biofuel, Membrane filtration, flocculation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Figura 1- Balanço Energético ano base de 2008-----	17
Tabela 1- Teor de lipídios e produtividades de diferentes espécies de microalga ---	24
Tabela 2- Alguns produtos obtidos por microalgas -----	25
Tabela 3- Composição de ácidos graxos da <i>Isochrysis galbana</i> -----	27
Figura 2- Cultivo de <i>Spirulina platensis</i> em larga escala em vias fluviais-----	30
Figura 3- Cultivo de microalga em fotobioreatores fechados-----	30
Figura 4- Transporte por molecular por membrana-----	32
Tabela 4- Processos de filtração por membranas comerciais-----	39
Figura 5- Transporte por molecular por membrana -----	40
Tabela 5- Exemplos de aplicabilidade para processo de separação por membrana----	42
Figura 6- Diferença entre a filtração convencional e a filtração tangencial -----	43
Figura 7- Estágios do declínio de fluxo do permeado -----	44
Tabela 6- Suplementação do meio nutricional “f/2” -----	51
Tabela 7- Fatores de multiplicação para cálculo densidade de células -----	51
Tabela 8- Composição química do Lugol acético-----	52
Figura 8- Manutenção e propagação do inóculo em meio f/2 Guillard-----	53
Figura 9- Câmara de <i>Fuchs Rosenthal espelhada</i> .-----	55

Figura 10- Divisões da câmara de <i>Fuchs Rosenthal</i> -----	55
Tabela 9 - Fatores de multiplicação para cálculo densidade de células-----	57
Figura 11- Agitação mecânica realizados com jar test-----	59
Figura 12- Formação de flocos do meio de cultura-----	60
Figura 13- Processo de decantação do meio de cultura-----	60
Figura 14- Formação de sedimentos-----	61
Figura 15- Biomassa retida no papel de filtro -----	61
Figura 16 - Esquema do sistema de filtração-----	62
Figura 17- Célula de microfiltração-----	63
Figura 18. Biomassa retida na membrana de microfiltração-----	64
Figura 19- Processo de extração com éter de petróleo realizado durante 4h -----	65
Figura 20- Extração da fração lipídica com uma mistura de clorofórmio/metanol realizado durante 4h-----	65
Figura 21- Densidade óptica da <i>Isochrysis galbana</i> -----	68
Figura 22- . Curva de crescimento biomassa <i>I.galbana</i> com e sem agitação-----	69
Figura 23 - Vazão de permeado na microfiltração direta-----	72
Tabela 10- Valores de fluxos encontrados em diferentes pressões para membrana de 0,2 μ m-----	74

Tabela 11- Valores de fluxos encontrados em diferentes pressões para membrana de 0,45 μm -----	75
Figura 24- Variação do fluxo permeado com membrana de 0,2 μm com o tempo em diferentes pressões-----	76
Figura 25 - Variação do fluxo permeado com membrana de 0,45 μm com o tempo em diferentes pressões-----	76
Figura 26- Fluxo médio permeado para membrana de 0,22 μm e 0,45 μm -----	77
Figura 27 - Fluxograma do processo de concentração de microalga-----	78
Tabela 12 – Teor de alumínio de meio cultura após os processos de separação----	79
Tabela 13- Resultados de massa retida no processo de filtração/floculação-----	79
Tabela 14- Resultados de massa retida no processo de separação usando membrana de diâmetro nominal de poro de 0,2 μm -----	80
Tabela 15- Resultados de massa retida no processo de separação usando membrana de diâmetro nominal de poro de 0,45 μm -----	80
Tabela 16- Resultados de biomassa microalgal e rejeição no processo de separação com a membrana de diâmetro nominal de poro de 0,2 μm -----	81
Tabela 17- Resultados de biomassa microalgal e rejeição no processo de separação com a membrana de diâmetro nominal de poro de 0,45 μm -----	82
Tabela 18 - Rendimentos da fração lipídica-----	83

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
1.1. Microalgas	21
1.2. <i>Isochrysis galbana</i>	26
1.3. Características do cultivo de Microalgas	28
1.3.1. <u>Temperatura</u>	31
1.3.2. <u>Iluminação</u>	32
1.3.3. <u>Controle de ph</u>	33
1.3.4. <u>Aeração</u>	34
1.4. Métodos de coleta e concentração	35
1.4.1. <u>Centrifugação</u>	35
1.4.2. <u>Floculação</u>	36
1.4.3. <u>Filtração</u>	37
1.4.4. <u>Separação por membrana</u>	38
1.4.4.1. <u>Microfiltração</u>	45
1.5 Parâmetros de desempenho	46
1.5.1. <u>Fluxo de permeado</u>	46
1.5.2. <u>Coefficiente de Rejeição</u>	47
1.6. Extração lipídica	47

2	MATERIAIS E MÉTODOS	48
2.1	Material	48
2.2	Métodos	50
2.2.1.	<u>Cultivo do microrganismo</u>	50
2.2.2.	<u>Quantificação celular</u>	54
2.2.2.1	Contagem_direta_	54
2.2.2.2	Espectrofotometria	57
2.2.3.	<u>Concentração celular</u>	58
2.2.3.1	Floculação	58
2.2.3.2	Filtração	59
2.2.3.3	Microfiltração	62
2.2.4	<u>Extração da fração lipídica</u>	64
2.2.5.	<u>Análise de alumínio</u>	66
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	67
3.1	Crescimento celular	67
3.1.1	<u>Contagem celular e Espectrofotometria</u>	67
3.1.2	<u>Curva de crescimento.</u>	68
3.2.	Concentração celular	71
3.2.1	<u>Floculação e filtração</u>	71
3.2.2	<u>Microfiltração</u>	71

3.2.2.1 Fluxo permeado do meio após floculação e filtração	73
3.3 Balanço de massa e fluxograma do processo	78
3.3.1 <u>Fluxograma</u>	78
4 CONCLUSÕES	84
5 Sugestões para trabalhos futuros	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

INTRODUÇÃO

A queima do carvão e do petróleo significou um marco para o desenvolvimento econômico no século XVIII. A Revolução Industrial deu origem ao capitalismo moderno e expandiu extraordinariamente, e continua expandindo até hoje com uma velocidade muito grande. Porém esse desenvolvimento trouxe conseqüências negativas à natureza (HAWKEN, LOVINS, 1999).

O rápido esgotamento dos combustíveis fósseis e a crescente demanda de energia fazem com que a busca de combustíveis alternativos, a partir de fontes renováveis seja de necessidade obrigatória. A situação que enfatizou a utilização de combustíveis derivados de fontes renováveis foi o aquecimento global devido às emissões de gases do efeito estufa. (SHEEHAN *et al.*, 1998)

Impedir o desenvolvimento é algo possível tomando medidas necessárias para controlar esses desastres ecológicos. A saída está em modificar os meios de produção de forma que seja garantida a sustentabilidade. Para lidar com estes problemas graves, como a deterioração da situação em todo o abastecimento mundial de energia, o meio ambiente e a segurança energética, os biocombustíveis surgem como alternativas renováveis viáveis e tem atraído a maior atenção em todo mundo (ADAMS, 2002; HILL *et al.*,2006).

A produção de biocombustíveis e energias limpas têm sido apontadas como um dos grandes desafios tecnológicos para viabilizar o desenvolvimento sustentável no século XXI.

A partir da década de 90, devido a um aumento da conscientização acerca dos problemas ambientais causados pela queima de combustíveis fósseis, o biocombustível também tem sido apontado como uma grande alternativa. De fato, diversos estudos apontam que o uso deste biocombustível diminui a emissão de gases relacionados com o efeito estufa, tais como hidrocarbonetos, monóxido e dióxido de carbono, além de materiais particulados e óxidos de enxofre, esse último responsável pela chuva ácida (MA; HANNA,1999).

O constante crescimento econômico do Brasil acelera o desenvolvimento das indústrias, que conseqüentemente aumentam o consumo de combustível. Segundo resultados do Balanço Energético Nacional de 2008, o petróleo e seus derivados atingiram 36,7% de participação na matriz energética nacional (Figura 1), mas as reservas de combustíveis fósseis são finitas e não-renováveis (EPE, 2009).

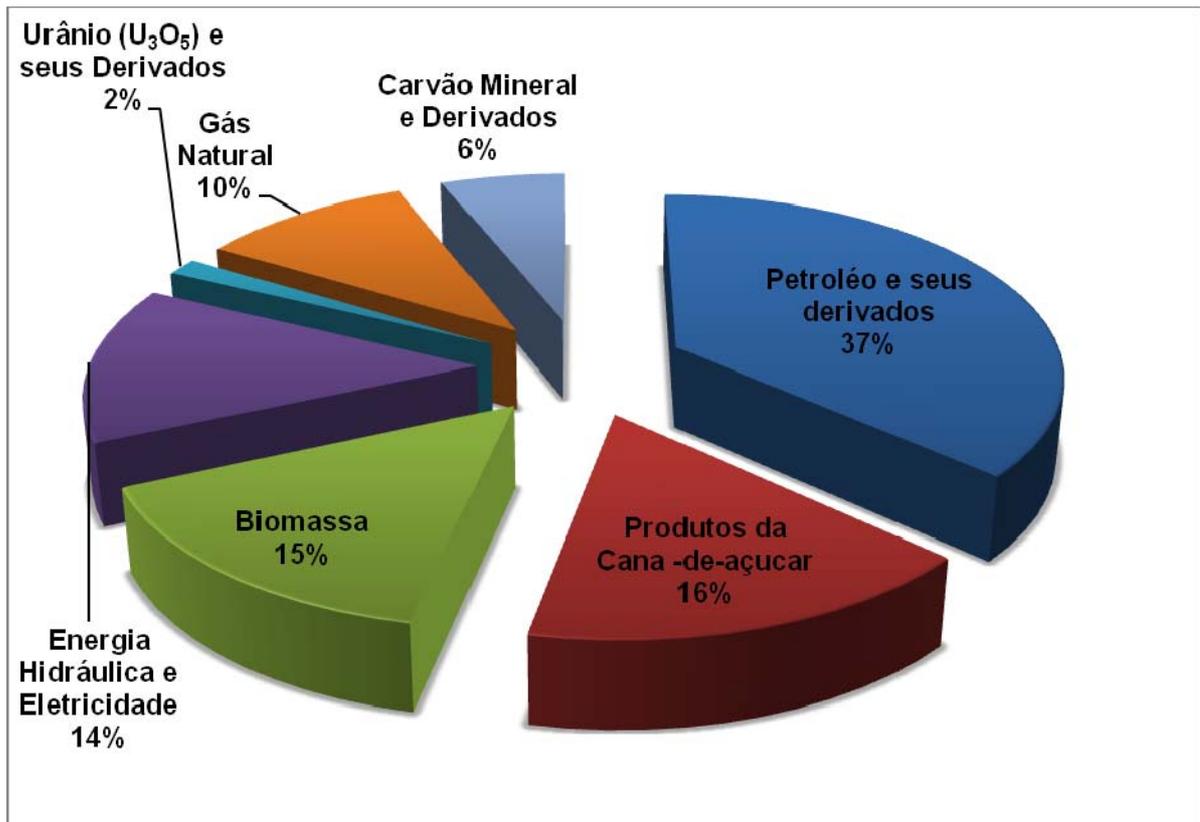


Figura 1. Balanço Energético de 2008
Fonte: EPE (2009)

O combustível líquido alternativo mais popular para o diesel derivado do petróleo é o biodiesel, que é essencialmente um alquil (metil ou etil) éster de ácido graxo. O biodiesel é sintetizado pelo processo de transesterificação no qual os triacilgliceróis de óleos vegetais reagem com um álcool de cadeia curta, como metanol e etanol para produção de ésteres de ácidos graxos e glicerol como produtos importantes na presença de um catalisador básico, ácido ou enzimático. As matérias-primas utilizadas para a produção de biodiesel são os óleos vegetais a partir de culturas como soja, palma e canola (GERPEN, 2005; MEHER *et al*, 2006).

Para a maioria dessas culturas, a produtividade de óleo por hectare raramente fica superior a 1,5 toneladas, mesmo para espécies geneticamente modificadas. Uma fonte alternativa de matéria-prima de óleo está na forma de lipídios obtidos a partir de microalgas (CHISTI, 2007; NEENAN *et al.*, 1986; HUANG *et al.*, 2010).

Convencionalmente microalgas foram cultivadas para utilização e enriquecimento de produtos alimentícios, tais como betacaroteno, vitamina C, ômega 3, ácidos graxos, etc. No entanto, algumas espécies de microalgas contêm uma elevada quantidade de lipídios (aproximadamente 50% ou mais em espécies geneticamente modificadas) e, portanto, o cultivo de microalgas está emergindo como uma fonte econômica para produção de bicomcombustível (MIAO; WU, 2006).

Shay (1993) relatou que as algas são uma das melhores fontes de biodiesel. De fato as algas são as mais elevadas produtoras de matéria-prima para o biodiesel. Segundo o autor, ela pode produzir até 250 vezes a quantidade de óleo por hectare que a soja. Produzir biodiesel a partir de algas pode ser a maneira de obter combustível suficiente para substituir o uso do combustível automobilístico. Ainda segundo o autor, algas produzem 7 a 31 vezes mais óleo do que o óleo de dendê e é uma técnica simples a extração de óleo de algas.

Além disso, o cultivo de microalgas tem sido um meio eficaz de utilizar (ou fixar) o CO₂ emitido industrialmente. Normalmente, a produção de 100 toneladas de biomassa de microalgas fixa cerca de 183 toneladas de CO₂ (CHISTI, 2008). Assim, a redução na emissão de gases de efeito estufa é um benefício complementar na rota de produção de biodiesel a partir de microalgas.

A melhor classe de alga para produção de biodiesel é a microalga. Microalgas são microrganismos capazes de realizar fotossíntese que converte luz solar, água e dióxido de carbono em biomassa algal e são inferiores a 2 mm de diâmetro. As microalgas são algas com dimensões microscópicas, que vivem em sistemas aquáticos sob incidência de luz solar. Filogeneticamente, as microalgas são compostas de espécies procarióticas ou eucarióticas, antigas ou mais recentes, conforme o período em que surgiram no planeta (RAVEN *et al.*, 2001). Muitas

microalgas são extremamente ricas em óleo que pode ser convertido em biodiesel utilizando as tecnologias existentes.

Macroalgas, como algas, não são tão amplamente utilizadas na produção de biodiesel. Microalgas possuem muito mais óleo do que as macroalgas e é muito mais rápido e mais fácil o seu crescimento (SHAY, 1993).

Biodiesel de microalgas parece ser o único bicomcombustível renovável que tem potencial para substituir completamente os combustíveis derivados do petróleo sem prejudicar a produção de produtos vegetais e nem o fornecimento de alimentos. A maioria das culturas que servem como substitutos do petróleo, como óleo de palma, não chegaram nem próximos das microalgas em serem capazes de fornecer de forma sustentável as quantidades necessárias de biodiesel (CHISTI,2008).

As microalgas são compostas basicamente de proteínas, carboidratos e lipídios. Os teores de lipídios de microalgas encontrados na literatura variam de 5 a 75% em porcentagem de biomassa seca, mas a maioria das espécies estudadas apresenta de 20 a 50% de lipídios. Os triglicerídios das microalgas conhecidas apresentam composição em ácidos graxos (14 a 22 átomos de carbono) semelhante a dos óleos vegetais usados na produção de biodiesel (METTING, 1996; SPOLAORE *et al.*, 2006; SONG; FU; SHI, 2008; MATA; MARTINS; CAETANO, 2009).

O crescente interesse no estudo de microrganismo, como microalgas, alguns fungos (leveduras, por exemplo) e bactérias, deve se à essencial importância destes nas diversas cadeias tróficas e na possibilidade da aplicação comercial em distintas áreas como nutrição, saúde humana animal, no tratamento de águas residuais, na produção de energia e na obtenção de compostos de interesse das indústrias: alimentar, química e farmacêutica dentre outras (BOROWITZKA, 1997 ; CERTIK ; SHIMIZU, 1999 ; LEMAN , 1997; BRUNO 2001; GROBBELLAR, 2004; RICHMOND 2004).

Segundo Henrikson (1994) e Vonshak (1997) a biomassa da microalga *Spirulina* (*Arthrospira*) já era utilizada na produção de alimentos pelos povos antigos que habitavam margens de lagos da África e do México. Todavia, somente no século XX, pesquisadores desenvolveram tecnologias de cultivo, usando tanques abertos, fotobiorreatores fechados (PBRs) e reatores (tipo fermentadores), que permitiram a sua produção comercial (OLAIZOLA, 2003). Segundo esse mesmo autor, as microalgas são consideradas uma fonte potencialmente rica de vários produtos químicos, os quais podem ser aplicados na indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica, bem como, na obtenção de biocombustíveis.

O cultivo de microalgas pode ser considerado um sistema biológico muito eficiente no armazenamento de energia solar, através da produção de compostos orgânicos via processo fotossintético, sendo que a maioria das espécies apresenta crescimento mais rápido que as plantas terrestres, possibilitando maior rendimento de biomassa (VONSHAK, 1990). As plantas apresentam composição química diferenciada para cada órgão, já as microalgas são organismos unicelulares, apresentando a mesma composição química em toda a biomassa numa cultura (RAVEN *et al.*, 2001).

Estes microorganismos podem ser cultivados em águas que são impróprias para o uso da agricultura, possuem elevadas taxas de crescimento, apresentam um alto teor de lipídios e necessitam de uma área de cultivo muito menor do que aquela utilizada para produção agrícola, comparando rendimento de óleo com área utilizada. Esses motivos fazem com que o estudo de microalgas seja bastante motivante e promissor (SHEEHAN *et al.*, 1998; CHISTI, 2007; ROSENBERG *et al.*, 2008; RODOLFI *et al.*, 2009)

Um dos fatores importantes no processo econômico para produção de biocombustíveis a partir de microalgas é o custo e a eficiência do método de separação da biomassa. Neste sentido, faz-se necessário o estudo e a aplicação de técnicas para concentração e/ou separação da biomassa microalgal. Métodos de separação são sistematicamente exigidos no processo biotecnológico a fim de se concentrar o microrganismo. A biomassa pode ser concentrada por diferentes métodos como: filtração, sedimentação e centrifugação. O processo de

centrifugação é o método mais utilizado tendo uma rápida resposta quanto a concentração de células porém é um método que gasta mais energia logo mais caro quando pensa-se no processo industrial de um produto de baixo valor agregado.

Este trabalho tem como principal objetivo o cultivo e aplicação de alguns métodos de separação para concentração de biomassa como floculação seguida de filtração e microfiltração e como consequência a extração do óleo por soxhlet.

Este trabalho está dividido em 6 capítulos. O capítulo 1 apresentará de forma simplificada o estudo de microalgas levando em consideração suas principais características, os processos de separação e extração. A metodologia experimental empregada será apresentada no capítulo 2 e os resultados experimentais serão apresentados e discutidos no capítulo 3. A conclusão do trabalho bem como sugestões para trabalhos futuros estão presentes nos capítulos 4 e 5, respectivamente.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Microalgas

As algas são um grupo diverso de organismos aquáticos, fotossintéticos, que geralmente são caracterizados como macroalgas ou microalgas. O termo microalgas não tem valor taxonômico, engloba microrganismos algais com clorofila *a* e outros pigmentos fotossintéticos, os quais são capazes de realizar a fotossíntese oxigênica e, sua caracterização (sistemática) implica na consideração de uma série de critérios (HOEK; MANN; JAHNS, 1995; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

As microalgas têm sido tradicionalmente classificadas por diversos critérios como os tipos de pigmentos, a natureza química dos produtos de reserva, e pelos constituintes da parede celular. Também têm sido considerados outros aspectos como critérios citológicos e morfológicos, tais como ocorrência de células flageladas, a estrutura dos flagelos, os processos de formação do núcleo e da divisão celular, a presença e a caracterização de envoltório do cloroplasto e a possível conexão entre o retículo endoplasmático e a membrana nuclear. (TOMASELLI, 2004).

Sob a denominação microalgas estão incluídos organismos com dois tipos de estrutura celular: estrutura procariótica, com representantes nas divisões Cyanophyta (cianobactérias) e Prochlorophyta; estrutura celular eucariótica, com representantes nas divisões Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Haptophyta (Prymnesiophyta), Heterokontophyta (Bacillariophyceae, Chrysophyceae, Xantophyceae etc.), Cryptophyta e Dinophyta. (HOEK *et al.*, 1995).

As microalgas são unicelulares, o que permite uma composição uniforme das células de um meio de cultura, o que não ocorre com as oleaginosas, que podem ser divididas em diferentes partes (frutos, folhas, sementes e raízes). Esta uniformidade celular torna mais prática a manipulação e o controle das condições de crescimento para otimização (SHEEHAN *et al.*, 1998; CHISTI, 2007; ROSENBERG *et al.*, 2008; RODOLFI *et al.*, 2009).

O número exato de espécies de microalgas ainda é desconhecido. Atualmente são encontradas citações relatando que podem existir entre 200.000 até alguns milhões de representantes deste grupo. Tal diversidade também se reflete na composição bioquímica e, desta forma, as microalgas são fonte de uma quantidade ilimitada de produtos como ácidos graxos poliinsaturados, corantes, enzimas e etc. (NORTON *et al.*, 1996; PULZ, GROSS, 2004). Cabe ressaltar que algumas espécies sintetizam compostos que podem ser altamente tóxicos para outras espécies de organismos, inclusive para o homem. Estes compostos também têm sido explorados comercialmente e são objetos de inúmeras pesquisas (TEIXEIRA, 2002).

As microalgas são capazes de produzir de forma eficiente celulose, amido e óleos em grandes quantidades. Dentre inúmeros compostos, a obtenção de ácidos graxos poliinsaturados a partir de culturas de microalgas representa uma fonte alternativa de produção desta classe de lipídios, bem como, também proporciona uma série de vantagens quando comparada com fontes convencionais de obtenção desta substância (MEDINA *et al.*, 1998).

O cultivo de microrganismos fotossintéticos é um processo vantajoso devido não só à produção de proteínas de alto valor biológico para nutrição humana e animal, mas também para obtenção de outros pigmentos, lipídios e vitaminas (AARANSON *et al.*, 1980).

As microalgas podem fixar o carbono a partir de fontes diferentes, que podem ser categorizadas como:

- CO₂ da atmosfera;
- CO₂ dos gases industriais (por exemplo, gases de combustão e queima de gás);
- emissões de CO₂ fixadas sob a forma de carbonatos solúveis (por exemplo, Na₂CO₃ e NaHCO₃).

Ácidos graxos são constituintes de toda célula vegetal, na qual tem função de constituinte da membrana celular, produto armazenado, metabolitos e fonte de energia. Mas segundo BECKER (1995), as microalgas têm seu melhor aproveitamento na produção de carboidratos e proteínas, considerando-se que a percentagem de proteína nesses organismos pode variar de 6 a 71% de matéria seca, os quais são valores muito superiores, quando comparados ao arroz (8% de matéria seca), ao leite (26% de matéria seca) e a soja (37% de matéria seca).

A Tabela 1 apresenta o teor de lipídios e produtividades de microalga de diferentes espécies marinhas e de água doce, mostrando diferenças significativas entre as diferentes espécies (MATA, T. M; MARTINS, A. A; CAETANO, N. S.; 2009).

Como mostrado na Tabela 1, o teor de óleo em microalgas pode chegar a 75% em peso de biomassa seca. A maioria das algas comuns (*Chlorella*, *Cryptocodinium*, *Cylindrotheca*, *Dunaliella*, *Isochrysis*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Neochloris*, *Nitzschia*, *Phaeodactylum*, *Porphyridium*, *Schizochytrium*, *Tetraselmis*) tem níveis de óleo entre 20 e 50%, mas maior produtividade pode ser alcançada.

Tabela 1. Teor de lipídios e produtividades de diferentes espécies de microalgas

Espécie	Teor de lipídios (%do peso seco)	Produtividade de óleo (mg /L dia)
<i>Botryococcus braunii</i>	25–75	
<i>Chaetoceros muelleri</i>	33,6	21,8
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	14,6–16,4	17,6
<i>Chlorella protothecoides</i>	14,6–57,8	12 - 14
<i>Chlorella vulgaris</i>	5–58	11,2-40
<i>Chlorella</i>	18-57	18,7
<i>Chlorococcum sp.</i>	19,3	53,7
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	16,7-71	-
<i>Dunaliella sp.</i>	17,5-67	33,5
<i>Euglena gracilis</i>	14-20	-
<i>Isochrysis galbana</i>	7-40	-
<i>Isochrysis sp.</i>	7,1-33	37,8
<i>Monodus subterraneus</i>	16	30,4
<i>Monallanthus salina</i>	20-22	-
<i>Nannochloris sp.</i>	20-56	60,9-76,5
<i>Nannochloropsis oculata.</i>	22,7-29,7	84 -142
<i>Oocystis pusilla</i>	10,5	-
<i>Scenedesmus sp.</i>	19,6-21,1	40,5-53,9
<i>Skeletonema sp.</i>	13,3-31,8	27,3
<i>Tetraselmis suecica</i>	8,5 - 23	27-36,4
<i>Tetraselmis sp.</i>	12,6-14,7	43,4

Fonte: MATA, T. M; MARTINS, A. A; CAETANO, N. S. (2009).

Na Tabela 2, são apresentados alguns compostos importantes obtidos das microalgas e suas aplicações.

Tabela 2: Alguns produtos obtidos por microalgas

	Produto	Aplicações
Biomassa	Biomassa	alimentos naturais alimentos funcionais aditivos alimentares aqüicultura condicionador de solo
Corantes e Antioxidantes	xantofilas (astaxantina e cantaxantina) Luteína vitamina C e E beta-caroteno	aditivos alimentares cosméticos
Ácidos Graxos	Ácido araquidônico – ARA Ácido eicosapentaenóico – EPA Ácido docosahexoenóico – DHA Ácido gama linolênico – ECA Acido linoléico – LA	aditivos alimentares
Enzimas	superóxido dismutase – SOD fosfoglicerato quinase – PGK luciferase e luciferína enzimas de restrição	alimentos naturais pesquisa medicina
Polímeros	Polissacarídeos Amido Ácido poli-beta-hidroxibutírico	aditivos alimentares medicina cosméticos
Produtos especiais	Peptídeos Toxinas Esteróis aminoácidos (prolina, arginina, ácido aspártico)	pesquisa medicina

*FONTE: BARBOSA (2003)

Há atualmente interesse nos produtos com valor comercial que podem ser extraídos da biomassa microalgal, como os pigmentos (carotenóides, astaxantina e ficobilina) utilizados em aditivos alimentares, indústria cosmética e farmacêutica; os polímeros (polissacarídeos e amido) utilizados em aditivos alimentares e na indústria cosmética; e os ácidos graxos poliinsaturados (ácido eicosapentaenóico – EPA, ácido araquidônico – ARA, e ácido docosahexaenóico - DHA) que são utilizados como suplemento alimentar e nutracêuticos (METTING, 1996; DERNER *et al.*, 2006; SPOLAORE *et al.*, 2006).

Os sistemas de cultivo de microalgas podem ser construídos em solo não arável, não competindo com o solo para a agricultura. O cultivo de microalgas consome menos água do que o cultivo de oleaginosas, pois a água utilizada para o cultivo pode ser reaproveitada após a recuperação da biomassa. Além disso, as microalgas podem crescer em água do mar, que é imprópria para consumo humano. O ciclo de vida das microalgas se completa mais rapidamente do que das plantas terrestres, e dependendo da região e da espécie cultivada, as algas podem se reproduzir o ano inteiro (ROSENBERG *et al.*, 2008; RODOLFI *et al.*, 2009)

1.2. *Isochrysis galbana*

As espécies *Isochrysis galbana* e *Isochrysis* sp. são algas unicelulares marinhas pertencentes à classe Prymnesiophyceae, ordem Isochrysidales e família Isocrysidaceae (HOEK *et al.*, 1995; TOMASELLI, 2004). Apresentam boas características nutritivas, sendo de substancial interesse na aquicultura, principalmente na alimentação de moluscos, peixes e crustáceos em estágios iniciais de crescimento (BOUGARAN *et al.*, 2003). A espécie possui diâmetro de 5 a 6 μm com dois flagelos de aproximadamente 7 μm de comprimento e é adaptada a altas intensidades luminosas (TOMAS, 1996).

A microalga marinha *Isochrysis galbana* tem recebido um crescente interesse devido a sua capacidade de produzir ácidos graxos poliinsaturados como DHA (ácido docosahexaenóico), um dos ácidos graxos (n-3) que se acredita fornecer benefícios para saúde associados ao consumo de certos peixes e seus óleos (JEFFREY *et al.*, 1994). Entretanto, a classe de lipídios e a composição de ácidos

graxos das células de microalgas podem, em diferentes fases de crescimento, diferir significativamente e podem mudar com variações nas condições de cultura como estado nutricional, temperatura, salinidade, pH, intensidade luminosa e qualidade de luz. Na Tabela 3 são apresentados a composição de ácidos graxos da microalga *Isochrysis galbana*, cujo teor de ácidos em termos de peso seco é 9,5 %.

Tabela 3: Composição de ácidos graxos da *Isochrysis galbana*

Ácidos graxos	Percentual (%)
14:0	10,1
16:0	20,3
16:1n-7	21,4
16:2n-4	--
16:3n-4	--
16:4n-1	--
18:0	0,7
18:1n-9	1,4
18:1n-7	3,6
18:2n-6	0,9
18:3n-6	0,2
18:3n-3	1,2
18:4n-1	--
18:4n-3(AS)	6,4
20:0	--
20:1n-9	0,2
20:2n-6	--
20:4n-6(AA)	0,7
20:4n-3	--
20:5n-3(EPA)	22,6
22:1n-11	0,1
22:3n-3	---
22:4n-6	1,3
22:5n-3	0,2
22:6n-3(DHA)	8,4

Fonte: Medina et al.(1998).

1.3. Características do cultivo de microalgas

No ambiente natural, assim como nos cultivos, o crescimento de uma população microalgal é resultado da interação entre fatores biológicos, físicos e químicos (RAVEN, 1988). Os fatores biológicos estão relacionados às próprias taxas metabólicas da espécie cultivada, bem como com a possível influência de outros organismos sobre o desenvolvimento algal. Quanto aos fatores físico-químicos, são principalmente reportados estudos sobre iluminação, temperatura, salinidade e disponibilidade de nutrientes (HELLENBUST, 1970; GUILLARD, 1975; EPPLEY, 1977; YONGMANITCHAI, WARD, 1991).

Para o crescimento médio de microalgas devem-se fornecer nutrientes suficientes para este crescimento. Carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre são os mais importantes elementos que constituem as células de algas. Outros elementos essenciais incluem ferro, magnésio e em alguns casos, o silício (REBOLLOSO-FUENTES *et al.*, 2001).

Segundo Borowitzka (1999), estes organismos podem ser cultivados em diversos sistemas de produção, com volume variando desde poucos litros até bilhões de litros. Os sistemas comumente empregados são pouco sofisticados, uma vez que muitas empresas desenvolvem cultivos a céu aberto, sob condições naturais de iluminação e temperatura, e com baixo ou nenhum controle destes parâmetros ambientais. Os tanques são geralmente rasos, construídos em concreto, fibra de vidro, policarbonato, com fundo de terra ou revestido com material plástico, sendo que as culturas são constantemente agitadas.

Idealmente, os cultivos de microalgas feitos em laboratórios podem ser realizados em salas climatizadas ou câmaras incubadoras, mas não são itens obrigatórios para realizar tais cultivos. Assim, é possível cultivar as microalgas num espaço reservado do laboratório, desde que haja um sistema de refrigeração eficiente, além da iluminação adequada. No espaço reservado para o cultivo os frascos podem ser dispostos sobre as prateleiras em estantes abertas e podem receber iluminação lateral, do teto ou de baixo para cima. Diversos procedimentos

são necessários para impedir que os microrganismos indesejados interfiram no crescimento de microalgas em cultivo. A adoção de procedimentos de limpeza e assepsia é essencial para reduzir o impacto de microrganismo em sistemas de cultivo (LOURENÇO, 2006).

Tradicionalmente, as microalgas são cultivadas em sistemas fechados ou em tanques abertos, que são gaseificados ou expostos ao ar para permitir a capturação do dióxido de carbono da atmosfera para o seu crescimento celular. Recentemente, alguns cultivos têm sido desenvolvidos em equipamento específico, denominado fotobioreatores, visando a alcançar elevada produtividade. Os cultivos são realizados em sistema fechado, em placas planas ou em serpentinas, espirais ou cilindros, construídos com tubos de plástico, vidro ou policarbonato. O diâmetro dos tubos é dimensionado de forma a obter um melhor aproveitamento da luz, e o arranjo entre eles pode se apresentar na forma helicoidal, vertical e horizontal (GRIMA *et al.*, 1999; CHISTI, 2007).

Nos fotobioreatores, é possível controlar as condições de cultivo (quantidade dos nutrientes, temperatura, iluminação, pH etc.). Isto implica uma elevada produtividade, viabilizando a produção comercial de uma série de compostos de elevado valor (TREDICI, 2004).

Os bioreatores ou fotobioreatores mais usados para o cultivo podem trabalhar em batelada (descontínuo) ou em batelada alimentada (semicontínuo), que é a adição intermitente de um substrato limitante ao longo da fermentação (CHEN e ZHANG, 1997; MULITERNO *et al.*, 2005; CHEN *et al.* 2006). Os cultivos com esses bioreatores podem ser ao ar livre em larga escala ou escala laboratorial. No meio ambiente, ou seja, em lagos ou vias fluviais, o crescimento da microalga pode ser afetado com a contaminação de outras algas de pouco interesse, mas sistemas de lagoas especialmente projetados e condições controladas, não permitem o crescimento de contaminantes. A Figura 2 mostra a produção em larga escala que é feita em vias fluviais, lagoas ou tanques e a Figura 3 mostra o cultivo de microalgas em fotobioreatores fechados.

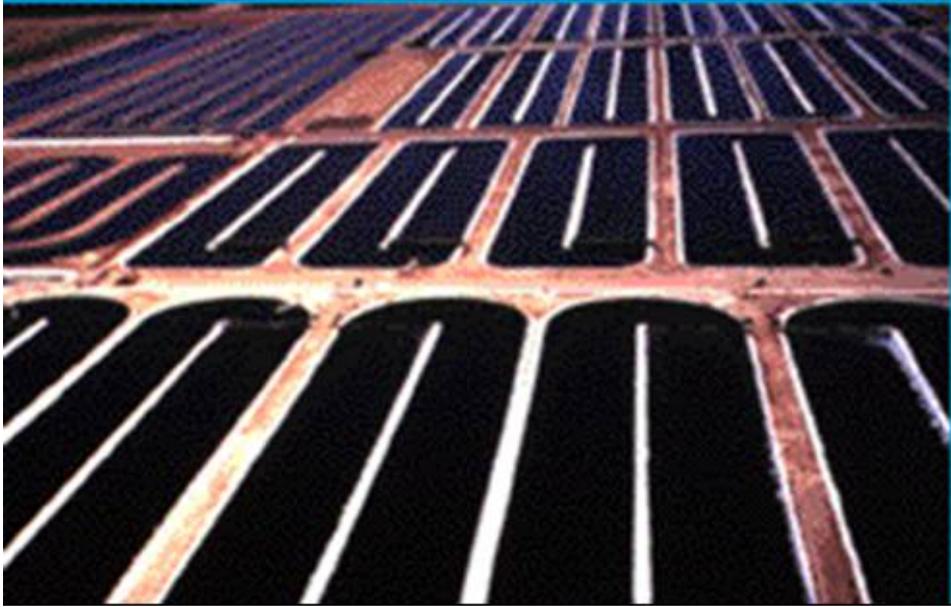


Figura 2. Cultivo de microrganismo em larga escala em vias fluviais.
FONTE: HENRIKSON (1994)



Figura 3. Cultivo de microalga em fotobioreatores fechados
Fonte: <http://www.flickr.com/photos/jurvetson/58591531/>

1.3.1. Temperatura

A temperatura é um dos fatores que mais afetam a taxa metabólica dos organismos. A temperatura ambiente deve ser escolhida em função das necessidades das espécies presentes e da finalidade dos cultivos.

Para o cultivo de microalgas se faz desejável trabalhar com temperaturas constantes, pois estas proporcionam aos experimentos uma maior estabilidade e mesmo em operações de rotina de cultivo. Em conseqüência, há tendência de maior reprodutividade e previsibilidade das respostas das espécies. O controle da temperatura é um importante parâmetro para o cultivo de microalgas (LOURENÇO, 2006).

O aumento da temperatura da cultura microalgal causa um aumento no teor de proteínas e uma diminuição nos teores de carboidratos e lipídios das células. Além disso, com um aumento de temperatura muitas espécies de microalgas diminuem os percentuais de ácidos graxos insaturados e aumentam os percentuais dos ácidos graxos saturados da fração lipídica (MORTENSEN,K; RAINUZZO,J; KNUTSEN,G, 1988).

Segundo Kaplan *et al.*, (1986) a temperatura ideal para alcançar a maior produtividade de microalga foi de 27 °C de acordo com a Figura 4, enquanto que temperatura superior a 32 °C ou inferior a 19 °C, reduziram a produção da microalga.

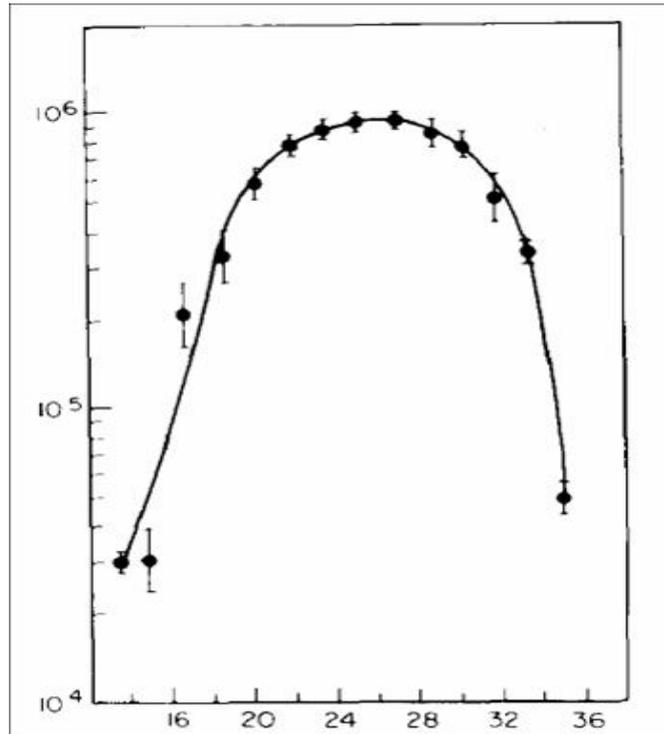


Figura 4. Gráfico da densidade celular (cel/mL) versus temperatura (°C) mostrando o efeito da temperatura no crescimento da microalga *Isochrysis galbana*. Fonte: Kaplan (1986)

Renaud *et al.*, (2004) estudaram espécies de microalgas tropicais do litoral da Austrália e constataram aumentos significativos na produção de ácidos graxos saturados 14:0, 16:0 e 18:0 com o aumento da temperatura em todas as espécies. Neste estudo foram constatados também a diminuição dos percentuais dos ácidos graxos poliinsaturados, ômega-3 (n-3) e ômega-6 (n-6).

1.3.2. Iluminação

Como com todos os vegetais, microalgas são fotossintetizantes, isto é, elas assimilam carbono inorgânico para conversão em matéria orgânico. Luz é a fonte de energia que dirige esta reação e sua intensidade, a qualidade espectral e o fotoperíodo precisam ser considerados.

A iluminação é um dos pilares dos cultivos de microalgas e assim, requer atenção especial para o êxito das atividades. Os melhores resultados com cultivo de microalgas são alcançados com iluminação artificial fluorescente (JEFFREY *et al.*,1997).

As lâmpadas do tipo luz do dia são as que melhor simulam a amplitude de comprimento de onda (350 -700 nm) necessária para fotossíntese, entretanto podem causar aquecimentos no cultivo, especialmente se as lâmpadas estiverem muito próximas dos frascos experimentais.

Geralmente são utilizadas lâmpadas de 20 W ou de 40 W que correspondem as potências mais encontradas no mercado. Convém manter alguns centímetros de separação entre as lâmpadas (5-15 cm) e uma distância em torno de 25-30 cm das prateleiras caso a fonte de luz seja posicionada sobre os frascos. É preciso ter cuidado para não expor os frascos a uma intensidade muito alta de luz, sob pena de causar fotoinibição.

Para cultivos de rotina de microalgas geralmente utiliza-se densidade de fluxo fotônico de 60 a 70 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, enquanto para manutenção de cepas em tubos de ensaio 20 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ são suficientes para proporcionar bom crescimento.

A intensidade de luz desempenha um papel importante, mas as exigências variam com a profundidade da cultura e a densidade da cultura de algas: a profundidades e concentrações de células maiores, a intensidade de luz deve ser aumentada para penetrar a cultura (por exemplo: 1000 lux são satisfatórios para frascos de erlenmeyer; para volumes maiores são requeridos 5000-10000 lux). A luz pode ser natural ou fornecida através de tubos fluorescentes. Intensidade muito alta (por exemplo. sol direto, pequeno recipiente perto de luz artificial) pode resultar em fotoinibição. Uso de aquecimento excessivo devido a iluminação natural e artificial também deve ser evitado. Tubos fluorescentes que emitem azul ou o espectro vermelho deveriam ser preferidos, pois representam as porções mais ativas do espectro para a fotossíntese (LOURENÇO, 2006).

1.3.3. Controle de pH

O pH ótimo de crescimento varia para a maioria das espécies de alga cultivadas entre 7 e 9, com a faixa ótima sendo 8,2 a 8,7. A não manutenção de um pH aceitável pode causar um colapso completo da cultura devido ao rompimento de

muitos processos celulares. A estabilização é realizada arejando a cultura. No caso de cultivo de algas de alta densidade, a adição de gás carbônico permite corrigir para aumentar o pH, que pode alcançar valores limites de até pH 9 durante crescimento da alga (LOURENÇO, 2006).

1.3.4. Aeração

O processo de mistura de uma suspensão microalgal é importante, pois permite que as células fiquem suspensas no meio, melhora a eficiência da utilização da luz, favorece a troca de gases, impede a estratificação térmica e ainda auxilia na distribuição homogênea dos nutrientes. Todos estes fatores influenciam na produtividade de biomassa microalgal (SUH; LEE, 2003).

Em cultivos densos ou/e em grandes volumes, a difusão de CO₂ para os reatores de cultivo tende a ser insuficiente para gerar crescimento satisfatório, sendo que as culturas podem ter seu crescimento limitado pela disponibilidade reduzida de carbono. Nesse caso, o emprego da aeração (borbulhamento de ar dentro dos frascos de cultivo) pode proporcionar adição adequada de fontes de carbono.

Em sistema de bancada a aeração é obtida através da utilização de bombas de ar. A aeração deve ser feita no fundo do frasco através de mangueiras constituídas de material inerte. Se as bolhas de ar são lançadas no fundo dos frascos, sua subida à superfície acarreta a dissolução de parte do conteúdo de gás no meios de cultura.

Mesmo no caso de espécies móveis, dotadas de flagelos, pode haver decantação e acumulação de células junto ao fundo, portanto, a agitação do meio provocada pela aeração previne a acumulação de células no fundo (LOURENÇO, 2006).

1.4. Métodos de coleta e concentração

A recuperação da biomassa da cultura requer uma ou mais etapas de separação sólido-líquido. A biomassa pode ser recuperada por centrifugação, filtração e sedimentação. Estes processos podem ser precedidos por uma etapa de floculação. A recuperação da biomassa é dificultada devido ao pequeno tamanho (tipicamente na faixa de 2 a 30 μm) das células de microalgas e devido à baixa densidade celular (0,3 a 5 $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$) da cultura. Então, para recuperar uma quantidade razoável de biomassa é necessário processar grandes volumes de cultura (GRIMA *et al.*, 2003). A recuperação da biomassa contribui com cerca de 20-30% do custo total da produção (GUDIN; THERPENIER, 1986).

As microalgas normalmente têm um elevado teor de água, sendo assim se faz necessária sua remoção de água. Não existe um único método de concentração microalgal, e sim o que mais se adéqua para cada caso. Portanto a seleção das tecnologias mais adequadas e a otimização dos processos de concentração e recuperação desta biomassa são importantes (GRIMA *et al.*, 2003). Uma abordagem razoável é a recuperação de biomassa em duas etapas (GINZBURG, 1993).

Na literatura são reportados alguns métodos de separação da biomassa microalgal, e esta etapa pode representar um processo longo ou até mesmo caro, dependendo da eficiência exigida e dos materiais utilizados. O mais importante para a escolha da coleta é identificar a melhor relação custo/benefício e a eficiência energética para todo o processo. A este respeito uma seleta seleção será importante, uma vez que certas espécies são muito mais fáceis de separação de que outras. Os métodos e aparelhos que são mais adequados para separação de microalga dependem do tipo de alga, isto é, a espécie em que se está trabalhando, o sistema de produção e os objetivos do produto final (DODD, 1980).

1.4.1. Centrifugação

Na separação por centrifugação, a força centrífuga oriunda do escoamento no interior do equipamento é utilizada para promover a separação. O depósito de sólido formado sobre a parede interna desliza, sendo removido continuamente para o fundo (saída cônica) do equipamento (SVAROVSKY, 1981). O método de separação que emprega força centrífuga faz com que as partículas sejam direcionadas contra as superfícies internas do equipamento.

A centrifugação é um método eficiente, mas com elevado gasto energético (GRIMA *et al.*, 2003). Sua eficiência depende das características de sedimentação das células, o tempo de permanência da suspensão de células, e a profundidade de sedimentação. A recuperação da biomassa por centrifugação é viável para produtos de alto valor, porque este processo pode processar grandes volumes de forma relativamente rápida e, a biomassa permanece totalmente contida durante a recuperação (HEASMAN *et al.*, 2000).

Entretanto, biocombustíveis não são produtos com alto valor agregado, e, portanto a utilização de centrifugação em sua rota produtiva por levar a custos incompatíveis com o valor do produto final.

1.4.2. Floculação

A floculação é uma técnica que vem sendo bastante utilizada para aumentar a concentração de microalgas. O mecanismo de floculação consiste em neutralizar ou reduzir a carga negativa na superfície celular de células de microalgas em suspensão, o que pode ser alcançado pela adição de floculantes, tais como sais com cátions polivalentes e polímeros catiônicos (GRIMA *et al.*, 2003).

Floculação é a coalescência de sólidos suspensos finamente divididos em maiores conglomerados. Em geral, a primeira etapa de floculação é a agregação de sólidos em suspensão, em partículas maiores resultantes da interação do floculante com a carga superficial de sólidos suspensos. A segunda etapa envolve a

coalescência de agregados em grandes flocos que podem decantar. O efeito que se quer conseguir depende da concentração da alga.

Esta alternativa é viável para recolher a biomassa em qualquer sistema de cultivo, sendo, entretanto, geralmente dispensada quando os volumes são pequenos, visto que há outras técnicas mais práticas, como a filtração e a centrifugação. A floculação é bastante adequada em sistemas de grande porte e pode ser espontânea ou induzida (LOURENÇO, 2006).

Polímeros orgânicos, geralmente os de alto peso molecular, são considerados como bons floculantes. A floculação polimérica é explicada pelo modelo de pontes que diz que o polímero pode juntar-se à superfície das partículas coloidais por diversos segmentos. Estes segmentos são então capazes de unir os sítios vazios em outras partículas formando assim uma estrutura tridimensional (GREGORY, 1979).

Os agentes floculantes podem promover alteração marcante de pH, causando agregação de partículas que estão em suspensão na água. Os agentes químicos floculantes são empregados, geralmente, em pequenas quantidades, pois estes podem danificar as células se forem utilizados em grandes quantidades. Este processo foi aplicado com sucesso para coleta de células com muitas espécies com eficiência maior do que 80% (KNUCKEY *et al.*, 2006).

1.4.3. Filtração

O processo de filtração, que opera sob pressão ou a vácuo, é um método preferido para a coleta relativamente grande de microrganismos filamentosos como microalgas *Spirulina platensis*. Para as pequenas células de microalgas como *Chlorella* e *Dunaliella*, a filtração convencional não se mostrou prática, enquanto membranas de microfiltração e ultrafiltração são as alternativas possíveis. Sendo que a microfiltração demonstrou ser adequada para a recuperação de microalgas (HOOPER *et al.*, 1998; HUNG; LIU, 2006).

1.4.4. Separação por membrana

A aplicação industrial de processos de separação por membrana é considerada ainda uma novidade em muitas empresas, apesar dos fenômenos envolvidos nesses processos já serem estudados há muito tempo. Devido a sua grande aplicabilidade esta tecnologia de membrana vem sendo crescentemente adotada, assumindo assim um importante papel nos dias atuais.

A utilização prática dos processos de separação com membranas iniciou-se na década de 60 com a dessalinização da água do mar. Desde então, esta tecnologia de separação vem sendo utilizada no processamento de alimentos, em razão de seus baixos custos de operacionais para concentração, fracionamento e purificação (LIN, L; RHEE, K; KOSEOGLU, S; 1997).

Segundo Rodrigues *et al.* (2003), uma membrana pode ser definida como uma barreira seletiva, sólida ou líquida, que separa duas fases e restringe o transporte de uma ou várias espécies químicas de maneira específica. Esse transporte ocorre por difusão ou convecção e é induzido pelo gradiente de potencial químico (expresso em termos de pressão, concentração e temperatura), elétrico ou de pressão.

Em função do mecanismo de transporte e da força-motriz, têm-se diferentes processos de separação por membranas, dentre eles destacam-se microfiltração, ultrafiltração, osmose inversa, eletrodialise, pervaporação e separação de gases, como pode ser observado na Tabela 4 alguns exemplos desses processos e suas respectivas características. Desde as últimas décadas, os processos de separação por membranas (PSM) vêm sendo utilizados em diferentes áreas industriais oferecendo vantagens como baixo consumo energético, não requerem aditivos químicos e serem sistemas compactos, de apresentarem a possibilidade de emprego em sistemas contínuos e combinação com outros processos de separação (RODRIGUES *et al.*, 2003).

Erro! Vínculo não válido.

A maior limitação em relação ao processo de separação por membrana é devido ao fato que a maioria dos sistemas que envolvem microrganismos ou suspensões estão sujeitas as restrições de transferência de massa e diminuição na taxa de permeação causadas pelo fouling (adsorção e/ou bloqueio de poros de componentes da alimentação), pela formação da camada polarizada de concentração (acúmulo de substâncias próximo à superfície da membrana) (VLADISAVLJEVIC *et al.*, 2003; CARNEIRO *et al.*, 2002; JIRARATANANON *et al.*, 1998; VAILLANT *et al.*, 1999).

De forma bem simples, membranas são barreiras finas que permitem a passagem de certos componentes e retém outros componentes da mistura. Esta barreira, que controla o transporte de massa através de sua superfície, fornece duas correntes distintas: uma denominada permeado, diluída, e a outra chamada concentrado, enriquecida em componentes retidos (SCOTT, 1995). As membranas são feitas principalmente de materiais poliméricos com características químicas e físicas variadas.

As membranas apresentam diferentes morfologias e podem ser classificadas em duas grandes categorias: densas e porosas. As membranas são consideradas densas, quando o transporte dos componentes envolve uma etapa de dissolução e difusão através da membrana do material que constitui, enquanto que para membranas microporosas, o transporte dos permeantes ocorre preferencialmente em uma fase contínua, que preenche os poros da membrana (HABERT *et al.*, 1997),(Figura 5).

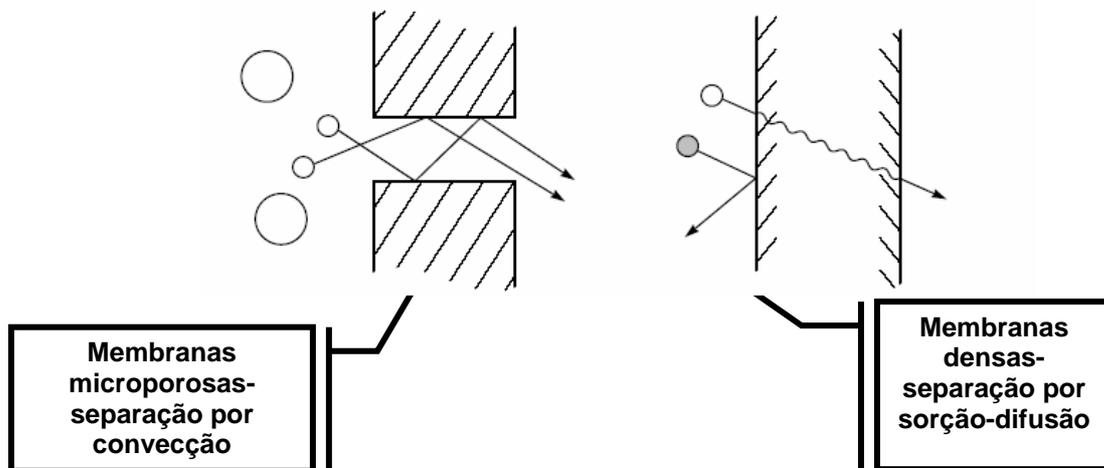


Figura 5. Transporte por molecular por membrana (BAKER, 2004)

Em processos que utilizam membranas porosas a capacidade seletiva está diretamente associada à relação entre o tamanho das espécies presentes e o tamanho dos poros da membrana.

A filtração é definida como a separação de dois ou mais componentes de um fluxo de fluido. Em termos convencionais, refere-se à separação sólido-fluido, na qual se força o fluido líquido ou gasoso a atravessar um material poroso que retém o sólido. A separação por membranas estende esta aplicação ainda mais, para incluir a separação de solutos dissolvidos em correntes fluidas (CHERYAN, 1998).

De modo geral, para os processos que utilizam o gradiente de pressão como força-motriz, o fluxo permeado é diretamente proporcional ao próprio gradiente de pressão.

A permeabilidade da membrana pode ser entendida como uma medida de maior ou menor facilidade que a membrana oferece a passagem de um dado solvente. No caso de solvente puro, admitindo-se que a membrana seja inerte em relação ao solvente e que ela não se deforme pela ação da pressão (compactação), o fluxo permeado apresentará uma dependência linear com a pressão, independente do processo em questão.

A independência do fluxo permeado com o tempo é uma clara indicação da estabilidade mecânica da membrana, da pureza do solvente e da sua baixa interação com o material da membrana. Quando uma ou mais dessas condições não são observadas o fluxo permeado diminui com o tempo, uma indicação de que alguma alteração está ocorrendo com a membrana. As principais alterações são ocasionadas por deformação mecânica, por inchamento da matriz polimérica devido a interações físico-químicas com solvente, ou pela presença de impureza no solvente, que pode provocar um entupimento dos poros (HABERT *et al.*, 1997).

Uma das principais características dos processos de separação por membranas é que eles podem ser operados em escoamento tangencial, além da operação clássica do tipo filtração frontal (ou filtração *dead end*).

Os métodos de filtração utilizados nos processo de separação por membranas são: convencional (*dead end*), quando um fluido esco perpendicular à superfície da membrana; e tangencial (*crossflow filtration*), quando o escoamento do fluido é paralelo à superfície da membrana e a altas velocidades, possibilitando o arraste dos solutos que tendem a se acumular na sua superfície (RENNER; ABD EL-SALAN, 1991). Na Tabela 5 são apresentados alguns exemplos de aplicabilidade dos processos por membrana.

Tabela 5: Exemplos de aplicabilidade para processo de separação por membrana

ÁREA	APLICAÇÕES
QUÍMICA	Quebra de azeótropo benzeno/hexano; Recuperação de H ₂ – Síntese de amônia; Fracionamento de CO ₂ / CH ₄ ; Fracionamento do ar: gás inerte e de corrente rica em O ₂ . Separação de substâncias termolábeis;

BIOTECNOLOGIA E FARMACÊUTICA	Desidratação de etanol; Purificação de enzimas; Fracionamento de proteínas; Esterilização de meios de fermentação; Bioreatores a membrana.
ALIMENTÍCIA E BEBIDAS	Concentração de leite; Concentração de soro de queijo; Concentração de sucos de fruta;

FONTE: HABERT (1997)

No modo filtração frontal, o permeado passa através da membrana e o soluto, ou os materiais em suspensão são retidos, acumulando-se na superfície da membrana. No caso da microfiltração, de maneira análoga ao que ocorre na filtração clássica, este acúmulo pode se traduzir na formação de depósito ou de uma torta da filtração, como pode ser observado na Figura 6.

Na filtração de escoamento tangencial a solução ou suspensão escoam paralelamente à superfície da membrana enquanto o permeado é transportado transversalmente à mesma. Neste caso, o escoamento paralelo à membrana limita o acúmulo do material retido sobre a mesma, tornando possível uma operação do sistema em condições de regime estabelecido de transferência de massa (HABERT *et al.*, 1997).

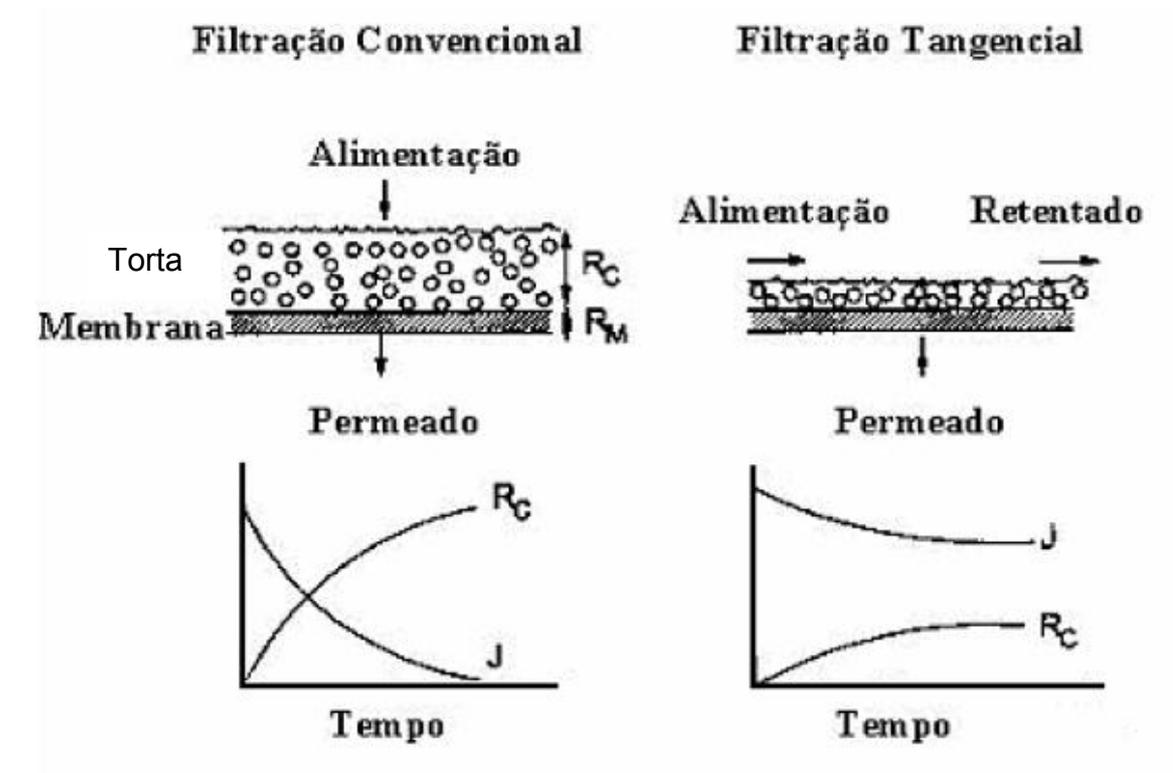


Figura 6. Diferença entre a filtração convencional e a filtração tangencial. R_C é a resistência da torta formada na membrana, R_M é a resistência da membrana e J é o fluxo de filtrado ou permeado. Fonte: CHERYAN (1998).

Existem nos processos de membranas dois fenômenos limitantes, a polarização da concentração e o *fouling* (deposição). Ambos os fenômenos são devido à presença de espécies no fluido de alimentação que não podem passar para o permeado. Estes dois fenômenos diferem, pois na polarização da concentração, as espécies acumuladas na parede da membrana encontram-se dispersas na solução, enquanto que no *fouling*, as espécies se depositam na superfície da membrana ou dentro da matriz da mesma. Então se pode distinguir entre o *fouling* externo e o *fouling* interno, sendo que ambos os tipos de *fouling* podem coexistir em certas aplicações (GEKAS *et al.*, 1998).

A formação do *fouling* produz uma alteração das propriedades de separação da membrana durante o seu funcionamento, devido à deposição de materiais tanto na superfície da membrana como dentro de seus poros. As razões para esta deposição são físico-químicas e químicas. As físico-químicas são devido à adsorção de moléculas sobre o material constituinte da membrana. E as químicas ocorrem pela solubilidade limitada na camada gel polarizada ou insolubilidade devido à

mudança das condições mecânicas (bloqueio dos poros, ou elementos rugosos na superfície) e hidrodinâmicas, resultando em um fluxo demasiadamente baixo (GEKAS *et al.*, 1998).

De acordo com Marshall e Daufin (1995), o declínio no fluxo de permeado durante o processo de ultrafiltração ocorre em três etapas, como indicado na Figura 7. Nos primeiros minutos ocorre uma rápida diminuição no fluxo devido à polarização da concentração (estágio I). Em seguida, ocorre uma etapa intermediária (estágio II) que é conhecida como *fouling* e posteriormente tem-se uma terceira etapa (estágio III), que apresenta um lento declínio do fluxo, determinado pela consolidação do *fouling*. Essas etapas ocorrem de forma análoga na microfiltração.

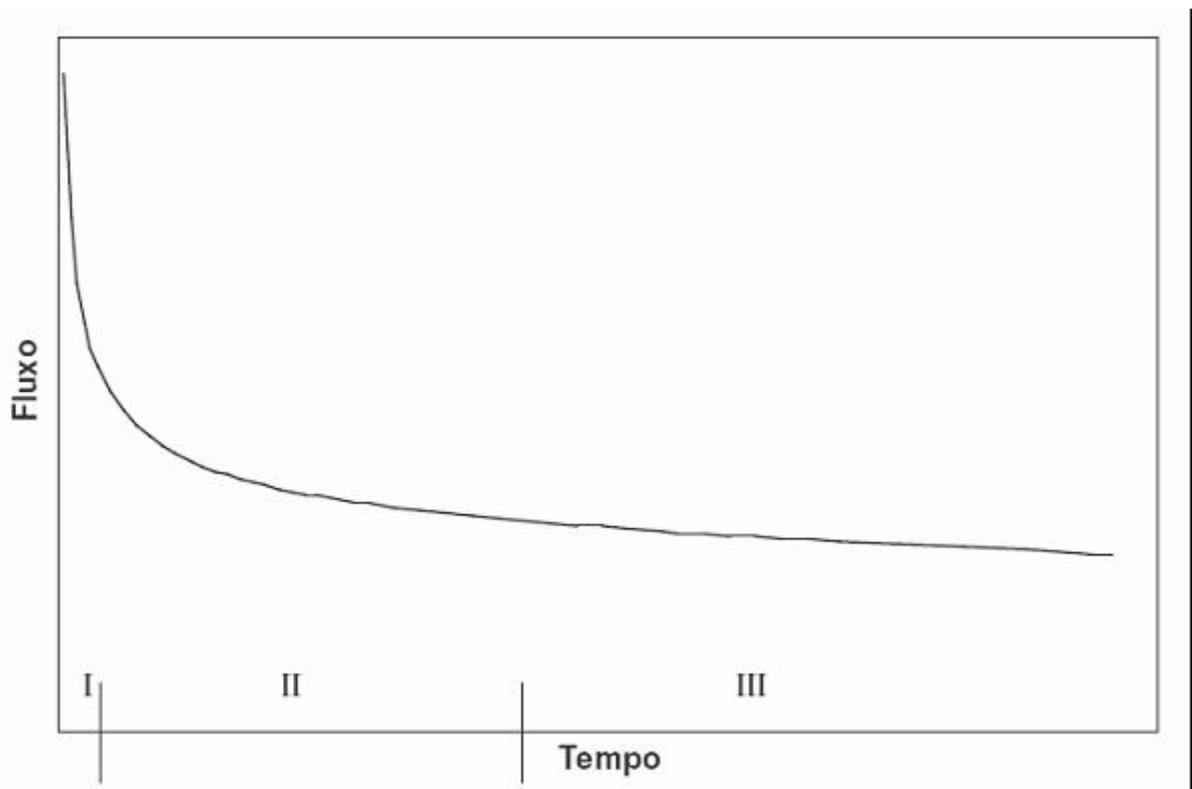


Figura 7. Estágios do declínio de fluxo do permeado (Fonte:Marshall & Daufin, 1995)

Conforme foi discutido por Habert (1997) os efeitos do *fouling* podem ser reduzidos pelo pré-tratamento da alimentação, comumente utilizado para remoção das partículas que podem causar obstrução dos poros da membrana. O pré-tratamento pode envolver tanto processos físicos quanto químicos.

Para remoção dos sólidos suspensos que podem obstruir os poros da membrana usualmente são utilizados processos físicos como uma pré-filtração ou centrifugação.

Os processos químicos incluem ajuste de pH da alimentação que permite reduzir a tendência de formarem uma camada de gel, podem envolver também precipitação, coagulação e floculação de microrganismos.

Os vários modos de bloqueios de poros são uma função do tamanho e forma sólido/soluto em relação à distribuição de tamanhos de poros, segundo Giorno *et al.* (1998). O bloqueio completo de poros ocorre quando as partículas são maiores do que o tamanho dos poros da membrana. As partículas que chegam à superfície da membrana a bloqueiam, obstruindo o poro completamente. O bloqueio parcial de poros ocorre quando as partículas sólidas ou macromoléculas que chegam ao poro o selam. As partículas também podem se agrupar na forma de uma ponte de entrada do poro obstruindo-o, mas não completamente.

Eagles e Wakeman (2002) afirmam que, no caso da microfiltração de sistemas particulados, as partículas menores do que os poros podem depositar-se nas paredes do poro ocasionando redução efetiva no diâmetro dos poros; partículas de tamanho similar aos poros da membrana tendem a bloqueá-los causando um declínio acentuado no fluxo permeado, e partículas maiores que os poros formam pontes e levam à redução drástica do fluxo.

1.4.4.1. Microfiltração

Método atrativo de separação devido a sua simplicidade mecânica e a grande disponibilidade de diâmetro nominal de poros. Os processos de separação com membranas, embora recentes, têm sido utilizados de maneira crescente como processos de separação, purificação, fracionamento e concentração numa ampla variedade de indústrias.

A microfiltração é um processo de separação com membranas mais próximo da filtração clássica. Utiliza membranas porosas com diâmetro de poros na faixa de 0,1 a 10 µm, sendo, portanto indicado para retenção de materiais em suspensão e emulsão. É um processo de retenção de células numa membrana porosa, filtro ou tela de malha regular ou controlada.

No entanto, atualmente instalações de produção de biomassa de microalgas em grande escala geralmente não utilizam a filtração por membranas, devido à preocupação com custos de substituição das membranas e de bombeamento. De um modo geral, no entanto, microfiltração pode ser mais rentável que a centrifugação (GRIMA *et al.*, 2003).

Como as membranas da microfiltração são relativamente abertas, as diferenças de pressão empregadas como força-motriz para o transporte são pequenas, dificilmente ultrapassando 3 bar. Na microfiltração o solvente e todo o material solúvel permeiam a membrana. Apenas o material em suspensão é retido.

1.5. Parâmetros de desempenho da microfiltração

Nessa seção são apresentados os parâmetros de desempenho do processo de microfiltração utilizados nesse trabalho.

1.5.1 Fluxo de permeado

Fluxo de permeado (F) é a quantidade obtida de permeado por área de membrana por tempo de filtração, sendo usualmente expresso em mL.cm⁻².s⁻¹.

$$J(t) = Mp / A.t \quad (1)$$

Onde,

$J(t)$ é o fluxo de permeado

Mp é a massa de permeado coletada durante o tempo (g)

A é a área superficial da membrana

t é o tempo na qual foi registrada a massa

1.5.2 Coeficiente de Rejeição

Coeficiente de rejeição indica a capacidade de retenção dos aglomerados de microalgas pela membrana, sob determinadas condições operacionais. O coeficiente de Rejeição (R), em porcentagem, é obtido segundo a equação 2.

$$R = (1 - C_p / C_i) * 100 \quad (2)$$

Onde C_i é a concentração inicial de um componente na alimentação e C_p é a concentração deste mesmo componente no permeado.

1.6. **Extração lipídica**

Extração de lipídios a partir da massa de microalgas representa uma etapa importante no processo global de fabricação de bicomustível. Existem vários métodos ou técnicas relatadas na literatura. Vários métodos têm sido desenvolvidos para extração de lipídios totais (BLIGH e DYER, 1959; GARDNER et al., 1985; DE BOER, 1988; BOOIJ e VAN DEN BER 1994; SMEDES, 1999). A maioria deles utiliza extração líquido-líquido (ELL), métodos que são demorados, e implicam em uma série de operações manuais.

Os lipídios são principalmente localizados no citoplasma da célula de algas em forma de gotas de tamanho de aproximadamente 30 nm (SILVERBERG *et al.*, 1976). Perante isto, podem-se postular dois mecanismos básicos pelos quais a extração de lipídios pode eventualmente ocorrer:

- 1) Difusão de lipídios através da membrana celular, quando a biomassa algal é suspensa no solvente com maior seletividade e solubilidade para lipídios e;
- 2) Rompimento da membrana celular, com liberação do conteúdo das células no solvente. A contribuição relativa de cada um destes mecanismos depende da técnica de extração.

O método de extração por Soxhlet envolve essencialmente uma percolação do solvente através da amostra de biomassa, que é seca e moída em partículas pequenas. O solvente é evaporado do balão e os vapores são resfriados em um condensador, localizado acima da amostra e do solvente condensado e escorre através da biomassa, onde se extrai o óleo de lipídios. Depois de vários ciclos de extração, o solvente contendo o óleo extraído é retirado e o solvente é evaporado para recuperar os lipídios. A extração Soxhlet, portanto, não envolve aplicação de uma tensão de cisalhamento para a biomassa. Com isso, o principal mecanismo de extração é do tipo difusão (SOXHLET, 1879).

O método de extração Bligh e Dyer envolve a extração simultânea e particionamento de uma suspensão de células de microalgas na água com uma mistura de clorofórmio e metanol. A mistura forma duas fases após a conclusão da extração. A fase inferior contendo clorofórmio e lipídio dissolvido é separado para extrair os lipídios (BLIGH e DYER, 1959).

2. Materiais e Métodos

2.1. Material

Os experimentos foram realizados com a espécie de microalga Pymnesiophyceae: *Isochrysis galbana* cedida pela Prof^a Ofélia de Queiroz Fernandes Araújo da Universidade Federal do Rio de Janeiro pelo Departamento de Engenharia Química. Todo o trabalho experimental ocorreu nas instalações dos laboratórios de pesquisa do Instituto de Química da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

A amostra foi recebida em um erlenmeyer com microalgas em suspensão. Os cultivos utilizados para germinação foram mantidos em uma câmara de germinação da marca Fanem modelo 347-CDG em condições controladas de temperatura e luz.

Para a manutenção do inóculo e cultivo foi utilizado meio f/2 Guillard diluído em mar sintético estéril. Os reagentes que serviram de nutrientes para a composição do meio mineral padrão f/2 Guillard cuja composição, por 100 mL de água destilada é apresentada nas Tabelas 6 e 7.

Reagentes:

1. Álcool Metílico PA Nuclear cod 311628
2. Clorofórmio PA Vetec cod 192
3. Éter de petróleo PA Reagen (faixa de destilação 30 °C – 60 °C)
4. Lugol (ver Tabela 8)
5. Sal marinho Prodac Ocean fish
6. Sulfato de alumínio

Vidraria:

1. Balão Volumétrico 1000 mL
2. Câmara de Fuchs Rosenthal
3. Erlenmeyer 500 mL e 3 L
4. Garrafão de 10 L
5. Termômetro

Equipamentos:

1. Agitador magnético Phoenix
2. Autoclave vertical Phoenix
3. Sistema de filtração
4. Balança
5. Bomba de ar
6. Câmara de germinação da marca Fanem modelo 347-CDG
7. Câmara de fluxo laminar
8. Câmara de iluminação composto de 6 lâmpadas Phillips de 20 W
9. Célula de microfiltração
10. Cronômetro
11. Estufa Fabbe
12. Espectrofotômetro Hach modelo DR 5000
13. Jar Teste
14. Luxímetro digital Icel Manaus modelo LD-510
15. Medidor de pH Phtek modelo Phs – 313

Materiais

1. Membrana Millipore de nitrato de celulose com diâmetro de 142 mm com diâmetro nominal de poro de 0,45 μm e 0,22 μm
2. Membrana MFS de acetato de celulose com diâmetro de 47 mm e diâmetro nominal de poro de 0,22 μm
3. Microscópio Bioval modelo L200A
4. Papel de filtro Qualy com diâmetro de 18,5 cm com diâmetro nominal de poro de 14 μm

2.2. Métodos

2.2.1. Cultivo do microrganismo

- Preparo da água do mar sintético

Primeiramente foi realizada a limpeza do aparato de filtração que consistiu em passar três vezes 300 mL de água destilada através do aparelho de filtração com membrana de 0,22 μm . Solubilizaram-se 33 g de sal marinho Ocean Fish (Prodac) em 1000 mL de água destilada e depois filtrou-se essa solução. Esta então foi transferida para um erlenmeyer vedado com rolha de algodão e lacrado com papel Kraft onde foi então autoclavado a 1 atm por 30 min. Preparado a água do mar sintético esta solução só foi aberta em lugares assépticos como câmara de fluxo laminar para evitar a contaminação.

- Preparo dos nutrientes

Foram preparadas soluções-estoque A, B, C cuja composição segue na Tabela 6. O meio de cultura f/2 (GUILLARD, 1975) foi esterilizado em autoclave durante 30 min a 121 °C A solução-estoque de vitaminas pode ser observada na Tabela 7. Todos os componentes da solução de vitaminas foram dissolvidos no mesmo volume de água destilada, que totaliza 1000 mL. Esta solução foi esterilizada por filtração (filtros de 0,22 μm) distribuída em um frasco esterilizado. Todos os nutrientes foram conservados em geladeira.

Tabela 6. Meio Guillard – f/2 (Guillard, 1975)

	Massa (g)	Observações
Sol estoque A (Sais)		
NaNO ₃	7,5	Completar o volume para 100 mL
NAH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,5	
Sol estoque B (Metais)		
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,98	Completar o volume para 100 mL
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,2	
CoCl ₂ .6H ₂ O	1,0	
MnCl ₂ .4H ₂ O	18,0	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,63	
Solução estoque C		
Na ₂ .EDTA	1,86	*Completar o volume para 900 mL + 1 mL de cada solução estoque B
FeCl ₃ .6H ₂ O	4,36	

Para Cada litro de meio f/2:

Estoque A = 1,0 mL; Estoque B = 1,0 mL; Estoque C = 1,0 mL;

***Ajustar o volume final para 1000 mL.**

Tabela 7. Suplementação do meio nutricional f/2

Vitaminas	Concentração	Observação
Tiamina HCl	100 mg/L	Fazer solução estoque (1L) 10x mais concentrada e usar 0,1 mL/L de meio
Biotina	0,5mg/L	
B ₁₂	0,5mg/L	

FONTE: LOURENÇO, 2006

- Preparo do lugol acético

Foi dissolvido iodeto de potássio em 100 mL de água destilada, depois solubilizou o iodo cristalino em 100 mL de ácido acético glacial. Misturaram-se as duas soluções e guardou a em um frasco fechado. As quantidades requeridas dos reagentes para preparação do lugol acético seguem na Tabela 8.

Tabela 8. Composição química do Lugol acético

Componentes	Quantidade
KI	100 g
I ₂	10 g
Água destilada	200 mL
Ácido acético	20 g

FONTE: LOURENÇO, 2006

- Preparação de utensílios para inoculação

Todo o material utilizado para o cultivo da *Isochrysis galbana* foi lavado primeiramente com água e sabão, em seguida rinsado com água destilada, seco em estufa e autoclavado a 121 °C por 20 min. Os frascos utilizados foram vedados com algodão, recobertos com papel Kraft para assim serem seguidos para esterilização e novamente levados à estufa para a secagem. Foram utilizados os seguintes materiais: mangueiras de silicone, algodão, barbante, gaze, pipeta automática, papel Kraft.

- Preparo do inóculo

Para o preparo e manutenção do inóculo, utilizou-se a microalga *Isochrysis galbana* em meio f/2 Guillard. Após a esterilização dos frascos já preparados com meio de água do mar sintético iniciou-se o inóculo com a microalga *Isochrysis*

galbana. Para a manutenção e propagação do inóculo foram utilizados cultivos em meio f/2 Guillard na fase exponencial de crescimento, com uma concentração inicial de microalga de $70.000 \text{ células.mL}^{-1}$.

- Manutenção dos cultivos

A manutenção do inóculo foi realizada em frascos de 500 mL, 3 L, 10 L e providos de aeração através de bombas de ar mantidos em estantes (bancadas) de fotoperíodo de 12h claro/12h escuro a uma temperatura entre 28 a 30 °C conforme pode ser visto na Figura 8.

Diariamente foram retiradas amostras, a fim de monitorar o pH dos meios de cultivos nos experimentos iniciais e foram realizadas leituras de absorvância. Os experimentos foram conduzidos em estantes de fotoperíodo, conforme apresentado na Figura 8, com iluminância de aproximadamente 3000 Lux fornecidos por lâmpadas fluorescentes de 20 W.

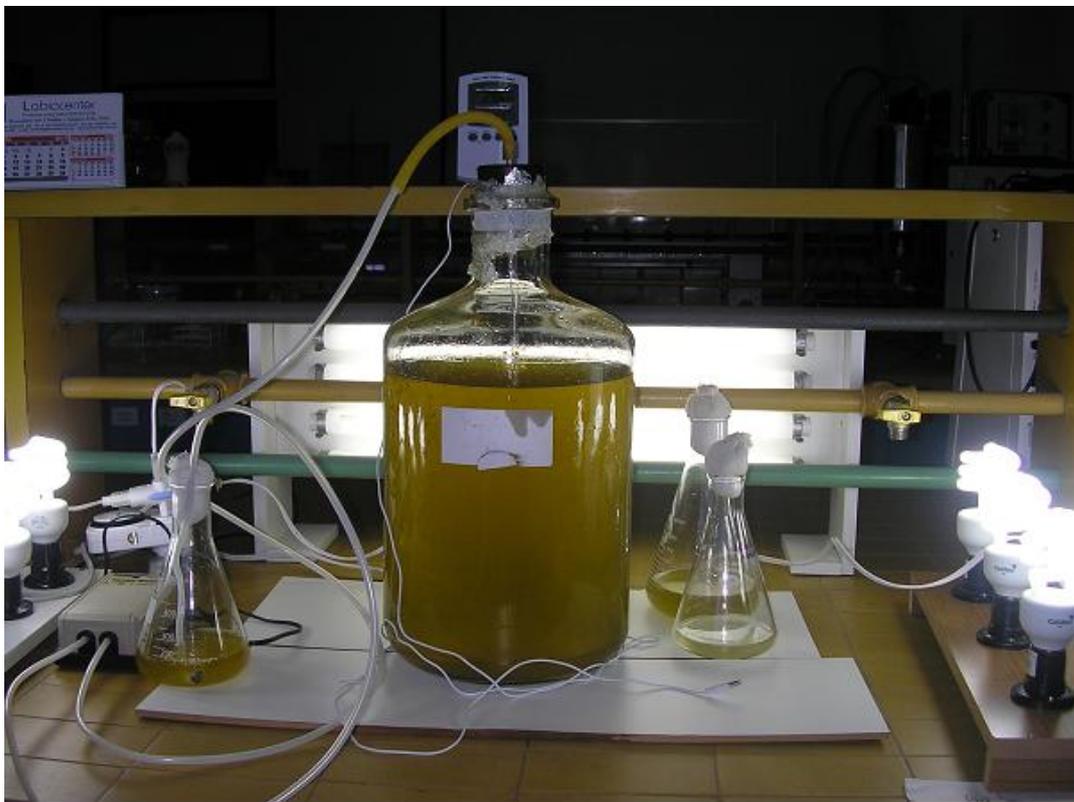


Figura 8. Manutenção e propagação do inóculo em meio f/2 Guillard

- Crescimento de microalga

Para determinação da fase exponencial do crescimento da espécie foi realizada contagem celular em cultivo. Para cada lote de cultivo foi iniciado um cultivo com aproximadamente 100 a 200 mL de meio f/2 (Guillard 1975) com 70.000 células de inóculo/mL. Para contagem celular foi retirada, diariamente uma alíquota de 3 mL durante aproximadamente 15 dias, a qual foi fixada com lugol.

2.2.2. Quantificação celular

Para determinação da biomassa presente num determinado volume foram utilizados dois métodos distintos: contagem por microscopia direta e espectrofotometria. O método por contagem direta foi utilizado para determinar a densidade celular de microrganismos em indivíduos por volume (n° de indivíduos/mL).

2.2.2.1. Contagem direta

O crescimento populacional da microalga *Isochrysis galbana* pode ser medido por meio de contagem de número de células numa alíquota de cultura empregando uma câmara de contagem *Fuchs Rosenthal*, como pode ser visto na Figura 9, em conjunto com um microscópio ótico. As leituras das amostras são feitas através de uma rede de contagem (quadrantes) localizados na base central das câmaras onde os quadrados têm área conhecida e dimensões exatas: profundidade de 0,2 mm, área superficial do menor quadrado de $0,0625 \text{ mm}^2$. As células que devem ser contadas são aquelas que estão dentro dos quadrados menores e aquelas que estão sobre as linhas triplas do lado superior e lado esquerdo que podem ser melhor visualizadas na Figura 10.

Cada quadrante (corresponde ao total da Figura 10) comporta um volume muito pequeno. Cada lado da câmara possui 16 quadras grandes (por exemplo assinalado por B, C ou P), medindo 1×1 mm, de um volume total de $0,2 \mu\text{L}$. Essas quadras grandes estão delimitadas por linhas triplas e cada área é subdividida em 16 quadrados. Colocou-se uma gota de amostra sobre o reticulado da câmara utilizando pipeta estéril, e os microrganismos que se encontram dentro ou sobre as 16 quadrículas desta câmara foram contados (LOURENÇO, 2006).

A ampliação usada foi a de 400 vezes. O número mínimo de células contadas deve ser igual ou maior que 400. A determinação da densidade celular de células foi feito conforme especificado na Tabela 9. Lembrando que o resultado deve ser multiplicado obrigatoriamente pelo fator de diluição para determinação da densidade conforme a Tabela 9.

Um gota de meio foi colocado em uma câmara de Fuchs Rosenthal e esta amostra foi quantificada utilizando um microscópio óptico (Zeiss) com magnificação final de 400 vezes. No mínimo deve ser contados 400 células, contando os quadrados menores da 1ª fila e assim seguir sucessivamente. A quantidade de quadrados contados no 1º quadrante deve ser igual ao 2º quadrante.

Tabela 9. Fatores de multiplicação para cálculo densidade de células (em células mL^{-1})

Número de unidades contadas	Número de elementos .mL^{-1}
1/16 ****	Núm X 80.000
1/8 ***	Núm X 40.000
1/4 **	Núm X 20.000
1/2 *	Núm X 10.000
16	Núm X 5.000
32	Núm X 2.500
64	Núm X 1.250
128	Núm X 625
256	Núm X 312,5

Fonte: Lourenço (2006)

* Fração da unidade básica (quadra grande), corresponde a oito quadrados (subdivisões dos quadrados grandes). ** Corresponde a quatro quadrados. *** Corresponde a dois quadrados. **** Corresponde a um quadrado.

2.2.2.2. Espectrofotometria

A concentração celular foi determinada diariamente por espectrofotometria, a 750 nm, usando água destilada como branco. As leituras dos valores de absorvância foram efetuadas em todas as amostras, imediatamente após a retirada de uma alíquota de cada amostra e a transferência desta para uma cubeta do espectrofotômetro. Os valores de absorvância obtidos foram convertidos em concentração celular através de uma curva de calibração.

- Construção da curva de calibração para determinação da concentração celular

A curva de calibração foi obtida a partir de um volume de 50mL de uma suspensão concentrada, onde foi centrifugada para concentração da biomassa microalgal, que foi levado para cadinho previamente seco a 105 °C, e previamente pesada. A amostra foi levada a estufa a 105°C por período de 10 h, suficientes para

manter a massa constante. A massa das células foi calculada por diferenças de valores de massas, e dividido pelo volume de filtrado para obter-se a concentração celular na suspensão. A partir dessa mesma suspensão foram preparadas diferentes diluições, e alíquotas dessas diluições foram levadas para o espectrofotômetro para leitura de absorvância a 750 nm de comprimento de onda, com água destilada como branco. Obteve-se dessa forma uma curva que relaciona a concentração celular (cel mL^{-1}) com a absorvância

2.2.3. Concentração celular

Para a concentração da biomassa foi utilizado um método de separação em três estágios de separação: floculação, filtração e microfiltração.

2.2.3.1. Floculação

Os testes de separação foram feitos inicialmente com volumes pequenos de meio de cultivo. Foi adicionado ao meio de cultura uma solução aquosa do floculante $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ a 1% (m/v). Para se conhecer a quantidade ótima de adição deste floculante foram feitos ensaios em Jar Test. Foi testada a adição de 10, 20, 30, 40 e 50 mL de floculante, realizados os ensaios em Jar Test verificando-se que o melhor volume a ser utilizado seria o de 40 mL de floculante para 1,5 L de meio de cultivo, porque nesta faixa de volume foi obtido a formação de flocos mais uniformes. Adicionado o floculante a solução foi mantida em agitação de 140 rpm por aproximadamente 10 min, desligando-se o agitador e esperando-se o meio decantar. Na floculação, as células agrupam-se formando conglomerados de peso muitas vezes superior ao da célula individualizada. Cessada a fase de agitação mecânica, esses flocos sedimentam. Os flocos formados sedimentam-se rapidamente, resultando em duas fases, uma concentrada, rica em flocos maiores e outra mais dispersa, contendo poucos flocos menores.

2.2.3.2. Filtração

Depois de decantado, o meio floculado passa por um processo de filtração por papel de filtro com diâmetro de 18,5 cm com porosidade de 14 μm . O papel de filtro utilizado foi pesado antes da filtração e colocado em estufa até atingir peso constante. Realizada a filtração, cada papel de filtro utilizado foi colocado em estufa por 10 h e depois levado para dessecador até atingir peso constante. O permeado da filtração foi em seguida transferido para um sistema de microfiltração onde foram testadas membranas com diâmetro nominal de poro de 0,2 μm e 0,45 μm . As Figuras 11 a 14 apresentam de forma ilustrativa todo o processo.

A biomassa microalgal retida no papel de filtro no processo de filtração pode ser observada na Figura 15. Este é levado para a estufa até atingir peso constante de onde seguirá para o processo de extração em soxhlet onde será extraída a fração lipídica.



Figura 11. Agitação mecânica realizados em jar test

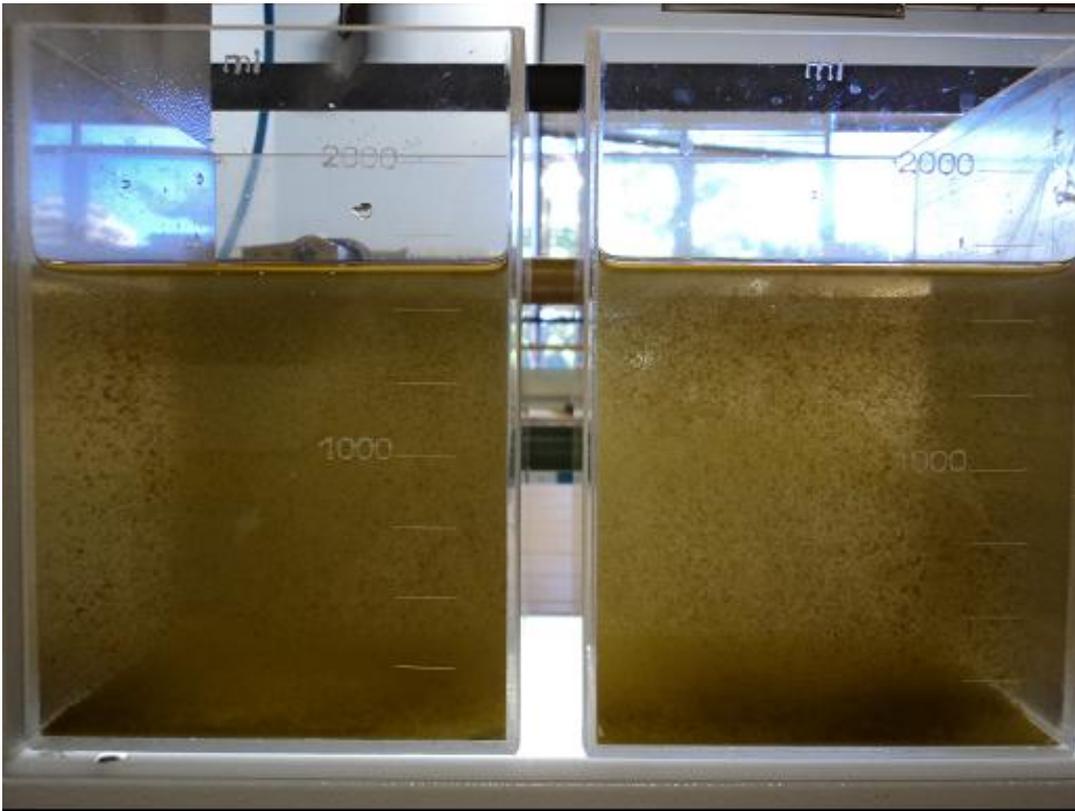


Figura 12. Formação de flocos do meio de cultura

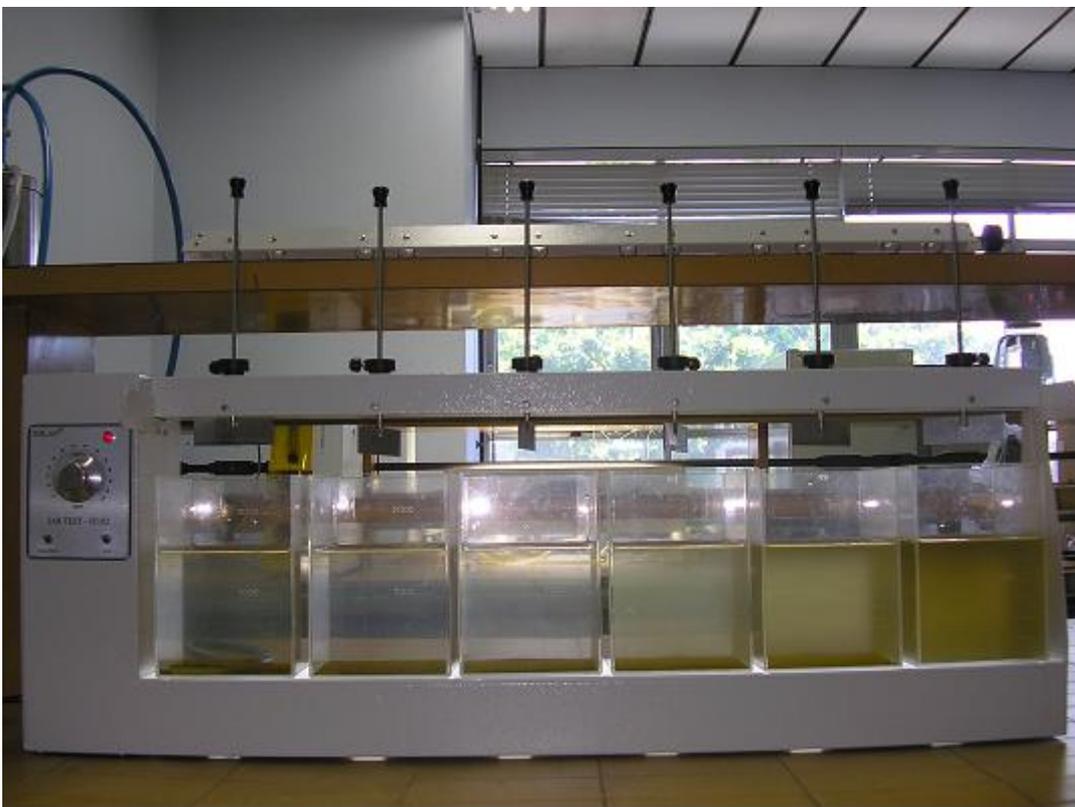


Figura 13. : Processo de decantação



Figura 14. : Formação de sedimentos



Figura 15. Biomassa retida no papel de filtro

2.2.3.3. Microfiltração

A célula de microfiltração consistiu de um cilindro de aço com volume interno de 1,3 L. A membrana foi colocada na base do cilindro sobre um espaçador de aço. O agitador magnético foi colocado por cima da membrana, conforme esquematizado na Figura 16.

Para o processo de microfiltração tipo “dead-end” foram realizados experimentos com 1,2 L de meio já filtrado na etapa preliminar. As membranas que foram utilizadas foram colocadas em estufa por 24 h a aproximadamente 60 °C. Foi adicionado à célula de microfiltração o volume de 9 L de meio e esta então foi fechada. Foi aplicada uma pressão manométrica inicial de 0,2 bar. Foram realizados quatro ensaios diferentes, onde variou-se a pressão de 0,2 a 0,8 bar. O fluxo foi medido com uma proveta ao longo do experimento, de tempos em tempos.

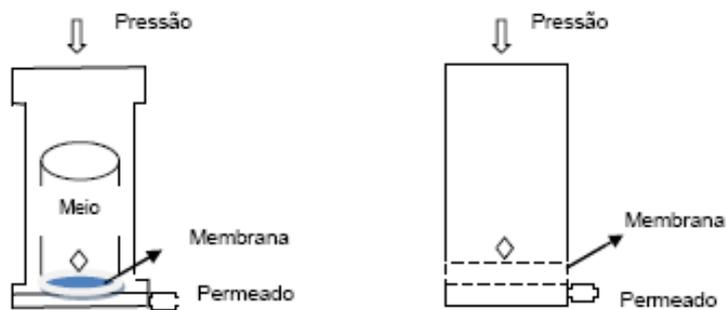


Figura 16. Esquema do sistema de filtração

Foi realizado experimento de bancada com a célula de microfiltração em fluxo perpendicular, conforme Figura 17. A célula possui uma capacidade de 1,3 L. A pressão exercida no sistema foi realizada com a introdução de nitrogênio, regulada através de uma válvula para controle de pressão em manômetro analógico.

Os fluxos permeados, tanto para a água quanto para solução filtrada de microalgas, foram expressos em $\text{mL} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ e após o processo de microfiltração realizou-se o recolhimento do permeado. O recolhimento foi feito em recipiente fechado e colocado em geladeira.

No final do experimento, foram retiradas alíquotas de permeado para uma posterior leitura de absorvância e contagem celular. Finalizando o experimento, a membrana foi retirada e colocada em estufa até atingir peso constante para fazer a determinação da biomassa microalgal por peso seco conforme a Figura 18. Encerrado o experimento foi retirada a membrana, a célula de microfiltração foi lavada com água destilada e colocou-se uma nova membrana para a realização de um novo ensaio. Cada ensaio realizado foi feito com uma membrana nova e com uma variação de pressão de 0,2 bar a 0,8 bar.



Figura 17. Célula de microfiltração



Figura 18. Biomassa retida na membrana de microfiltração

2.2.4. Extração da Fração Lipídica

A fração lipídica total foi obtida por extração com solvente orgânico. A amostra que estava no papel de filtro foi colocada em um cartucho de Soxhlet e então transferida para um extrator Soxhlet com refluxo de éter de petróleo por 4 horas, sendo o extrato recolhido em um balão de fundo chato. Após esse tempo, o solvente foi retirado do balão com o auxílio de evaporador rotativo. A amostra foi submetida à uma nova extração com clorofórmio-metanol (2:1 v/v) e esse processo continuou até que o solvente que estava no copo não apresentasse mais nenhuma coloração. O segundo solvente também foi evaporado num evaporador rotativo e assim a fração lipídica pode ser então identificada. Esse meio contém a fração lipídica total que reúne ácidos graxos, triglicerídeos, fosfolipídios (carotenóides, pigmentos fotossintetizantes, esteróides e hidrocarbonetos) (FERRAZ *et al.*, 1986).

De forma ilustrativa o processo de extração lipídica pode ser visto na Figura 19, onde nesse primeiro momento foi realizado com éter de petróleo. A coloração é meio amarelada como pode ser observado na Figura 19, isto ocorre porque apenas uma parte dos lipídios são extraídos. Na segunda extração, o processo foi realizado com uma mistura de clorofórmio/metanol e assim como pode ser observado na Figura 20 uma coloração mais esverdeada, diferente da primeira.

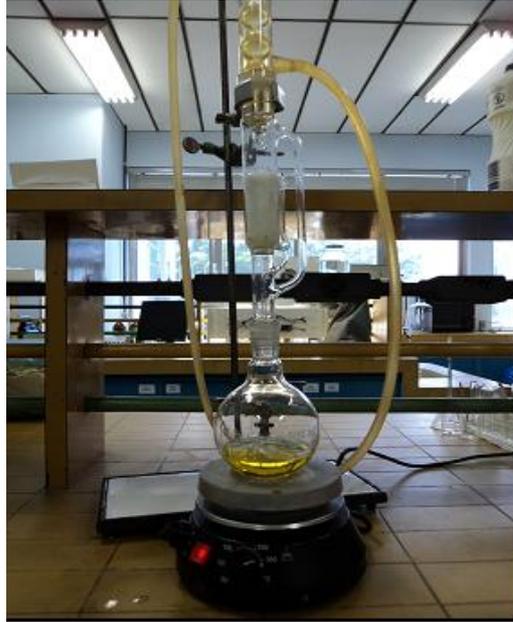


Figura 19. Processo de extração com éter de petróleo realizado durante 4h



Figura 20. Extração da fração lipídica com uma mistura de clorofórmio/metanol realizado durante 4h

2.2.5. Determinação da concentração de alumínio

Foram enviadas alíquotas de meio floculado, filtrado e microfiltrado para determinação da concentração de alumínio. Esta determinação foi realizada no Laboratório de Caracterização Instrumental II do Instituto de Química da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, utilizando o espectrômetro de absorção atômica, modelo AAS-240 da Varian. Foram fornecidos por esta análise as concentrações em g.L^{-1} de alumínio de cada amostra e estes valores seguem no capítulo de resultados.

3. Resultados e Discussão

Nesse tópico são apresentados os resultados do trabalho, sendo os mesmos subdivididos em resultados preliminares, que direcionaram a segunda etapa de resultados, e os resultados propriamente ditos.

Os experimentos foram divididos em quatro etapas, sendo a primeira o estudo do crescimento da *Isochrysis galbana*, com objetivo de avaliar a adaptação e a variação de crescimento da microalga. No segundo experimento, visou-se o aumento da produção de biomassa adaptando a microalga em volumes maiores de meio de cultura. No terceiro experimento, foram estudadas as condições do processo de separação (concentração de biomassa). Na quarta e última etapa, foi avaliado o processo geral que consiste em fermentação, crescimento celular, floculação, filtração e microfiltração.

3.1. Crescimento Celular

Para os experimentos preliminares foram realizados cultivos menores em fotobioreatores que consistem em frascos de 500 mL com volume útil de 250 mL, onde se avaliou a adaptação da microalga ao meio e o crescimento da *Isochrysis galbana*, chegando ao final dos experimentos com uma utilização de volume maiores com de 9 L de meio de cultivo

3.1.1. Contagem celular e espectrofotometria

A determinação da concentração celular dos cultivos foi obtida através da contagem direta por microscopia. Foi realizada também a correlação entre a leitura de absorvância e a correspondente concentração celular, como apresentado na Figura 21. Para este estudo as amostras foram medidas por absorvância por espectrofotometria com comprimento de onda de 750 nm. As leituras foram feitas em todas as amostras com o meio de cultura em solução, tendo água destilada como branco.

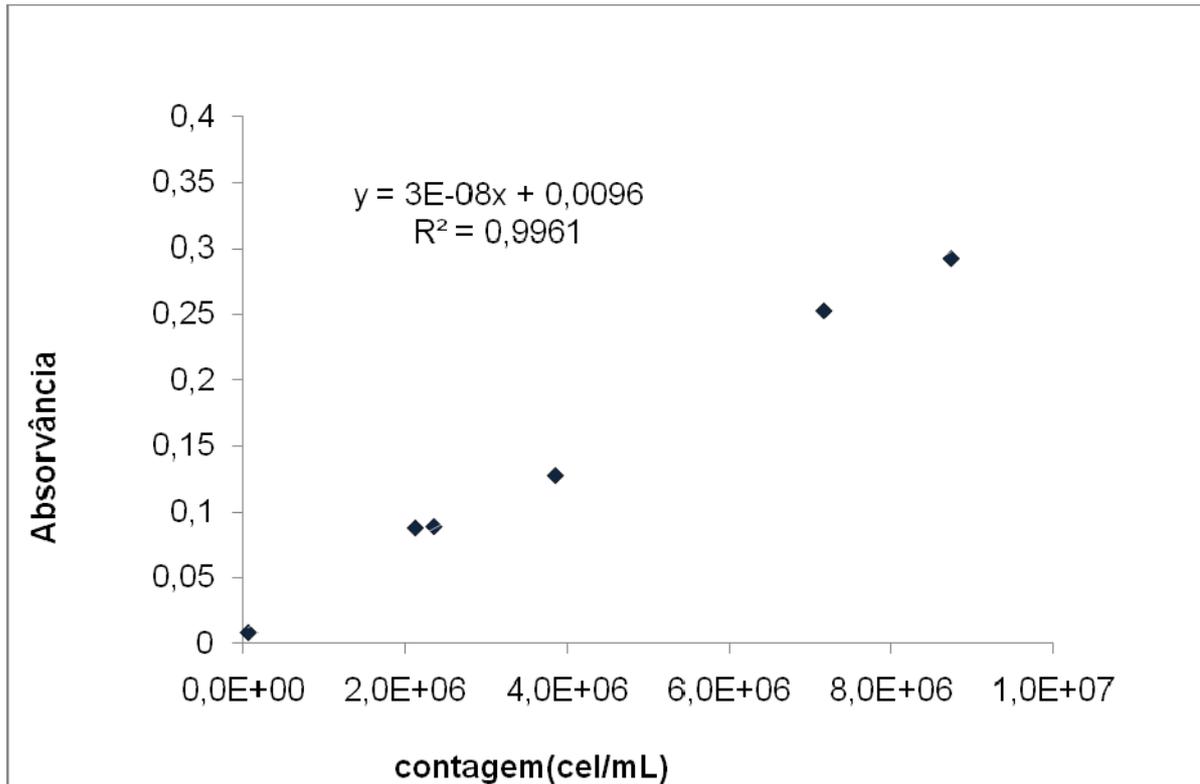


Figura 21. Densidade ótica da *Isochrysis galbana*

Os resultados encontrados na Figura 21 apontam uma relação linear entre a contagem e a absorvância, com coeficiente de determinação de 0,9961. Porém esta correlação não se mostrou eficaz para leituras de concentrações muito baixas. Foi verificado que para absorvâncias muito pequenas a incerteza da leitura é da mesma ordem do valor lido. Portanto, não se torna confiável a utilização desse procedimento para valores baixos de absorvância, e ocorre assim a necessidade da utilização da contagem direta por microscopia celular para obtenção de valores mais confiáveis.

3.1.2. Curva de Crescimento

O crescimento da microalga foi realizado primeiramente em erlenmeyers de 250 mL com e sem agitação. A agitação promoveu de forma eficiente uma maior produção de microalgas, que pode ser explicado por uma melhor transferência de massa no meio e uma maior acessibilidade à luz. Apesar dos resultados apresentados na figura 22 apontarem para resultados semelhantes, a literatura científica indica um melhor resultado em sistemas agitados. Os microrganismos fotossintéticos são afetados pelas condições de agitação no fotobiorreator, e como

as taxas de crescimento da grande maioria de células fotossintéticas são relativamente pequenas, baixos níveis de agitação são, geralmente, suficientes para evitar gradientes de nutrientes (TANAKA *et al.*, 1995).

Um dos principais objetivos da agitação é evitar que as células da microalga sedimentem no fotobiorreator. Esta sedimentação ocorre quando a velocidade de escoamento do meio de cultura é baixa e, particularmente, em zonas onde existem muitas perdas por atrito. (DUARTE *et al.*, 2003)

A concentração de biomassa obtida nos ensaios com agitação que foram realizados em aproximadamente 20 dias nos mostra que a fase exponencial pôde ser atingida mais rápido que nos ensaios sem agitação. Isso demonstra que a de agitação é um parâmetro muito importante para obtenção de uma produção mais elevada de biomassa microalgal.

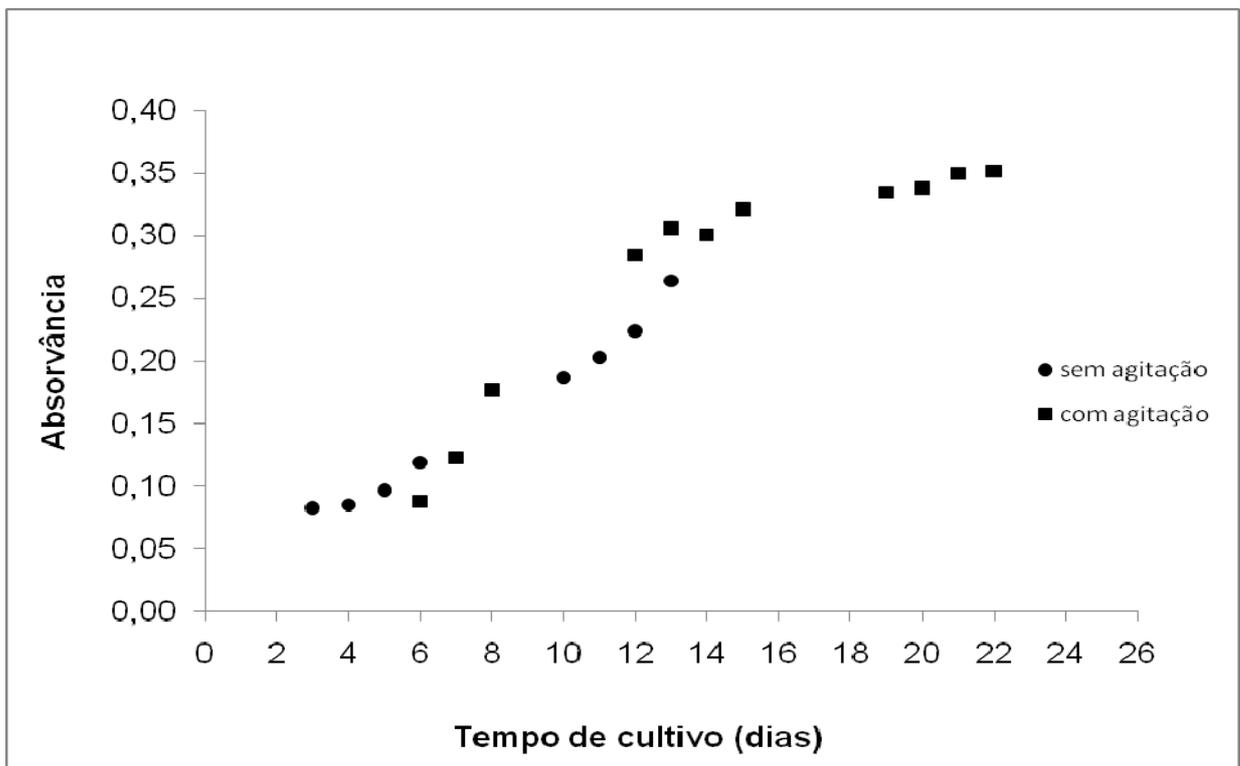


Figura 22. Curva de crescimento biomassa *I.galbana* com e sem agitação

No presente estudo os valores de densidade celular média para *Isochrysis galbana* com agitação e sem agitação foram de 9 e 6 x 10⁶ cel.mL⁻¹

aproximadamente no décimo primeiro dia após a inoculação, respectivamente, sendo valores diferentes aos encontrados pelos referidos autores abaixo.

Para se iniciar um cultivo contínuo de microalgas geralmente inclui-se um cultivo preliminar estacionário (*batch*) para a obtenção de uma densidade celular inicial adequada. Bougaran *et al.*, 2003 comparando o regime contínuo de cultivo e o estacionário, utilizando a microalga *Isochrysis galbana* *affinis Tahiti* (T-Iso) e concentração celular inicial de 5×10^5 cel.mL⁻¹. Em ambos os sistemas de cultivo a concentração celular média alcançada variou de $7,7$ a $9,0 \times 10^6$ cel.mL⁻¹.

Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2002, comparando o crescimento de *I. galbana* (T-Iso) em meio de cultura f/2 (Guillard, 1975) e com adição de fertilizantes agrícolas, obtiveram após sete dias de cultivo valores médios de concentração celular de $5,16$ e $5,19 \times 10^6$ cel.mL⁻¹ para o cultivo com fertilizantes e meio f/2, respectivamente. Os dados de concentração celular obtidos por Poisson e Ergan (2001) testando dois meios de cultura (Jones e Provasoli 1/3) e três períodos de coleta (4, 8 ou 14 de cultivo), variaram de $2,41$ a $5,78 \times 10^6$ cel.mL⁻¹.

Em cultivo estacionário sob condições controladas de temperatura de $18 \pm 1^\circ\text{C}$, radiação de $115 \mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 12:12 horas luz/escuro e concentração inicial de $2,5 \times 10^6$ cel mL⁻¹, Fidalgo *et al.*, (1998) encontraram para a *Isochrysis galbana* concentrações celulares variando de $2,3$ a $2,9 \times 10^7$ cel.mL⁻¹ em função da fonte de nitrogênio.

Testando diferentes regimes de luz, Tzovenis *et al.*, 2003 encontraram o valor máximo de $3,96 \times 10^7$ cel.mL⁻¹ para *Isochrysis galbana*, quando de iluminação contínua, radiação de $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, temperatura de 26°C e adição de 2% de CO₂. Nessa dissertação, para a mesma espécie, foram empregados teor de CO₂ e radiação inferiores aos de Tzovenis *et al.*, 2003. Logo foi obtida uma concentração um pouco inferior de microalga.

Estudando o crescimento de *Isochrysis* sp., Pernet *et al.*, 2003, cultivaram 18 a 170 litros de meio de cultura até o oitavo dia de cultivo e obtiveram valores de densidade variando de 4 a 10×10^6 cel.mL⁻¹, com maior rendimento no verão do que

no inverno. Os valores máximos encontrados pelos autores acima citados são inferiores aos atingidos para volumes menores e quando comparados aos cultivos de 9 L estes valores se aproximam aos citados por Pernet *et al.*

3.2. Concentração celular

De acordo com o objetivo do trabalho foram aplicados diferentes estágios de separação com a microalga *Isochrysis galbana* que está sendo cultivada no próprio laboratório como: floculação, filtração e microfiltração.

3.2.1. Floculação e filtração

Nesse experimento acrescentou-se volumes diferente 1% (m/v) de $Al_2(SO_4)_3$ ao meio e verificou-se nesta etapa que a melhor concentração de floculante foi de $40\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Com esta concentração observou-se a maior formação de precipitado, os flocos formados ficaram bem visíveis e ordenados. Todo o processo de floculação e filtração foram apresentados no capítulo 2 no item 2.2.1.

3.2.2. Microfiltração

- Microfiltração sem floculação e filtração prévia

Para concentrar a biomassa microalgal foram realizados primeiramente ensaios de microfiltração em membrana com diâmetro nominal de poro de $0,45\ \mu\text{m}$ em sistema de filtração convencional (*dead-end*) diretamente do meio de crescimento sem passar pelo processo de floculação e filtração. O processo de separação por microfiltração direta não foi a melhor alternativa, pois ocorreu uma rápida e intensa formação de uma camada de *biofouling* dificultando o processo de separação, conforme pode ser observado na Figura 23.

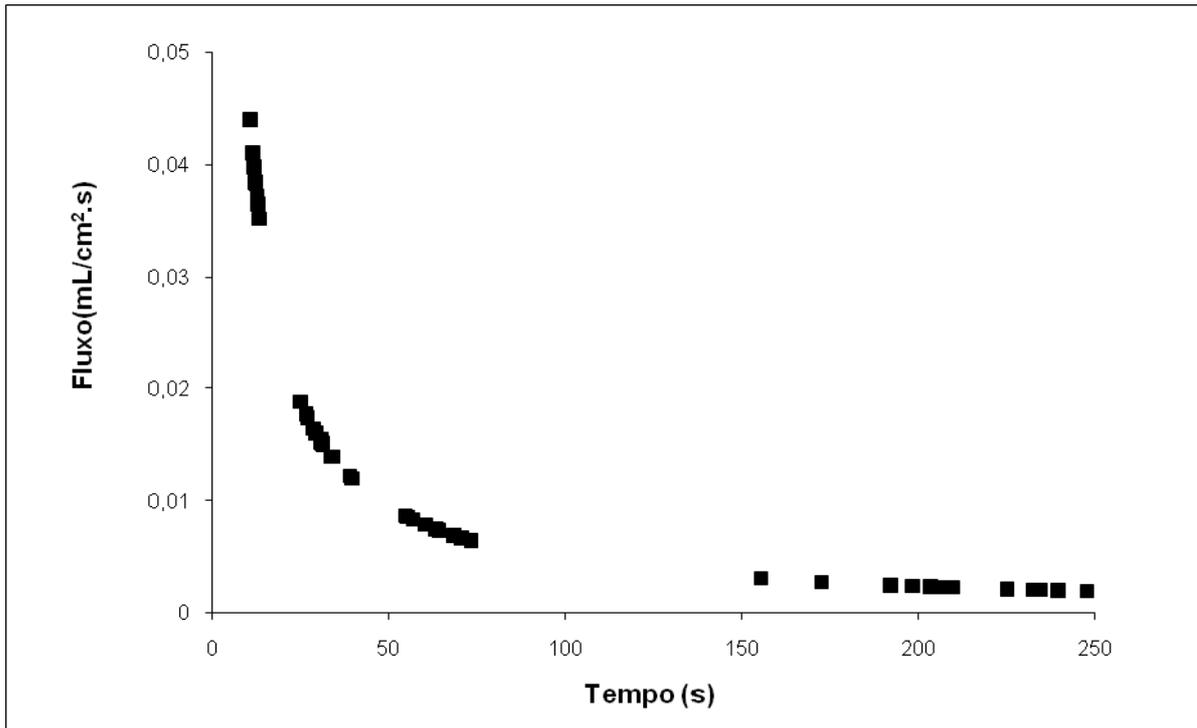


Figura 23. Vazão de permeado na microfiltração direta

Nos primeiros instantes de processamento, observou-se um declínio acentuado no fluxo permeado. A formação de uma alta concentração de soluto na superfície da membrana acarreta o aumento da espessura da camada de *biofouling*. O declínio do fluxo com relação ao tempo continua lentamente e sobre a membrana vai se formando uma camada de materiais acumulados, que dificultam a eficiência do processo fazendo-se assim a necessidade de um pré-tratamento dessa amostra. Optou-se então por adicionar ao processo uma etapa prévia de floculação onde foram realizados ensaios com *Jar Test* para se determinar os parâmetros de floculação e decantação ótimos.

- **Microfiltração com floculação e filtração prévia**

Nesse item são apresentados os resultados de microfiltração do sobrenadante do processo de floculação, obtidos após filtração do meio floculado. Visando caracterizar o sistema de permeação, incluindo a membrana, inicialmente são apresentados os resultados de permeabilidade de água.

3.2.2.1. Fluxo permeado do meio após floculação e filtração

Foi realizado teste de microfiltração com o permeado do meio após floculação e filtração e, verificou-se uma diminuição gradativa da vazão, conforme apresentado nas Figuras 24 e 25. Esses resultados indicam que, mesmo com os processos de separação aplicados previamente ainda tem células nesse meio suficiente para formar biofouling. Entretanto, o uso da etapa preliminar de floculação gera uma queda de fluxo aproximadamente 20 vezes menos intenso do que na microfiltração direta do meio de crescimento.

Foram realizados ensaios em batelada, utilizando-se 1,2 L de meio em cada um deles, sendo o sistema pressurizado nas mesmas condições apresentadas no item anterior. Nas Tabelas 10 e 11, pode-se observar os valores de fluxo obtidos para as diversas diferenças de pressão estudadas para as membranas de 0,2 e 0,45 μm de diâmetro de poro nominal, respectivamente.

Os dados para a construção das curvas de permeação foram obtidos através do monitoramento do volume de permeado coletado em intervalos de tempo conhecidos como pode ser observado na tabelas e gráficos a seguir.

Não ocorreu a formação da camada de biofouling na microfiltração desse meio muito mais diluído em células do que o meio originalmente microfiltrado, assim não havendo tempo hábil para formação de torta de tamanho significativo, com conseqüente diminuição do fluxo.

Pode-se observar que os fluxos obtidos nessa seção são um pouco inferiores aos obtidos na seção anterior. Apesar do meio estar diluído em células, estas estão presentes em quantidade suficiente para alterar o fluxo de permeado.

Tabela 10. Valores de fluxos encontrados em diferentes pressões para membrana de 0,2 μm

Pressão (bar)	Volume (mL)	Tempo (s)	Fluxo (mL/cm². s)
0,2	200	61,53	0,0048
	400	127,13	0,0050
	600	197,22	0,0052
	800	272,41	0,0054
	1000	357,79	0,0056
	1100	396,85	0,0057
0,4	200	38,41	0,0819
	400	69,88	0,0900
	600	104,81	0,0900
	800	143,28	0,0878
	1000	181,75	0,0865
	1100	204,09	0,0848
0,6	200	25,37	0,1240
	400	49,77	0,1264
	600	76,37	0,1236
	800	102,19	0,1231
	1000	131,25	0,1198
	1200	163,47	0,1154
0,8	200	21,88	0,1438
	400	43,20	0,1456
	600	65,17	0,1448
	800	85,57	0,1470
	1000	109,22	0,1447
	1200	122,15	0,1416

Tabela 11. Valores de fluxos encontrados em diferentes pressões para membrana de 0,45 μ m

Pressão (bar)	Volume (mL)	Tempo (s)	Fluxo (mL/cm². s)
0,2	200	32,16	0,0978
	400	68,32	0,0921
	600	104,57	0,0902
	800	104,01	0,0899
	1000	179,29	0,0877
	1100	201,32	0,0859
0,4	200	19,72	0,1595
	400	38,75	0,1623
	600	58,96	0,1600
	800	80,55	0,1592
	1000	103,87	0,1514
	1100	115,93	0,1492
0,6	200	15,47	0,2033
	400	30,22	0,2082
	600	45,38	0,2079
	800	59,94	0,2099
	1000	77,59	0,2027
	1100	86,07	0,2010
0,8	200	14,38	0,2187
	400	27,16	0,2316
	600	40,47	0,2332
	800	54,07	0,2327
	1000	70,04	0,2245
	1200	83,31	0,2265

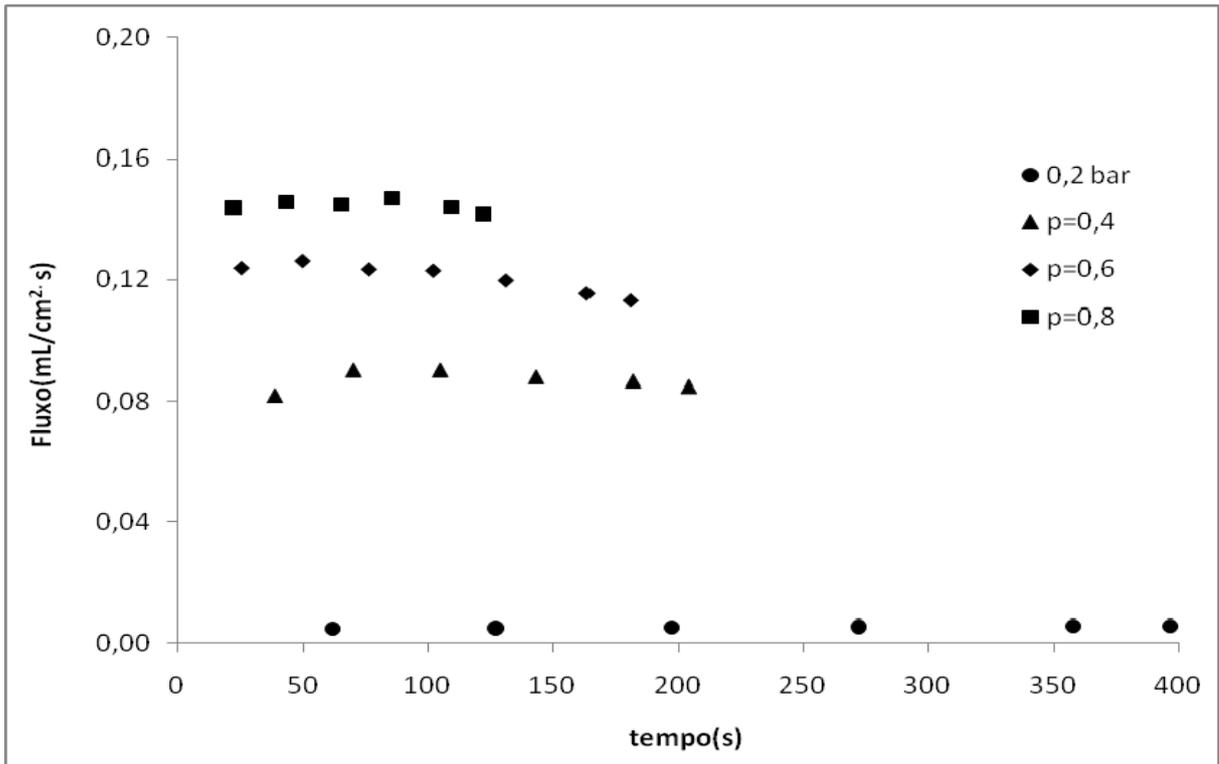


Figura 24. Variação do fluxo permeado com membrana de 0,2 μm com o tempo em diferentes pressões

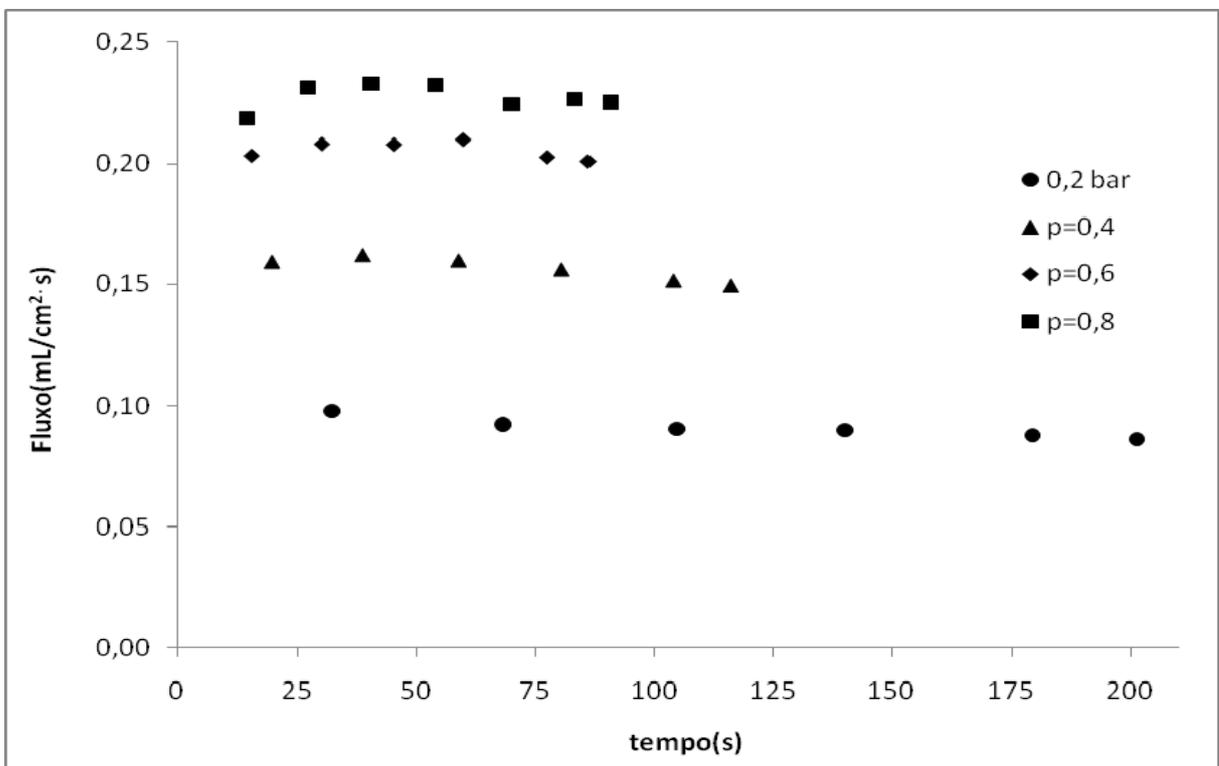


Figura 25. Variação do fluxo permeado com membrana de 0,45 μm com o tempo em diferentes pressões

Observa-se que na Figura 24 para as condições apresentadas, que o fluxo permeado tende a um valor constante à medida que se aumenta a pressão de operação. O mesmo fato pode ser observado na Figura 25, em que ocorre o relativo aumento no fluxo para a membrana de maior diâmetro nominal de poro.

Para as membranas de $0,22\ \mu\text{m}$ e de $0,45\ \mu\text{m}$, a utilização de uma diferença de pressão maior que $0,8\ \text{bar}$ acarreta gradativamente menor aumento do fluxo permeado para uma dada variação de pressão, como pode ser visto na Figura 26. A consequência é que o fluxo permeado tende a um valor constante para maiores diferenças de pressão. O valor de fluxo limite para as membranas de $0,22\ \mu\text{m}$ e $0,45\ \mu\text{m}$ são de aproximadamente $0,14\ \text{mL}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e $0,23\ \text{mL}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, respectivamente. Logo a membrana de menor diâmetro de poro nominal terá um menor fluxo permeado.

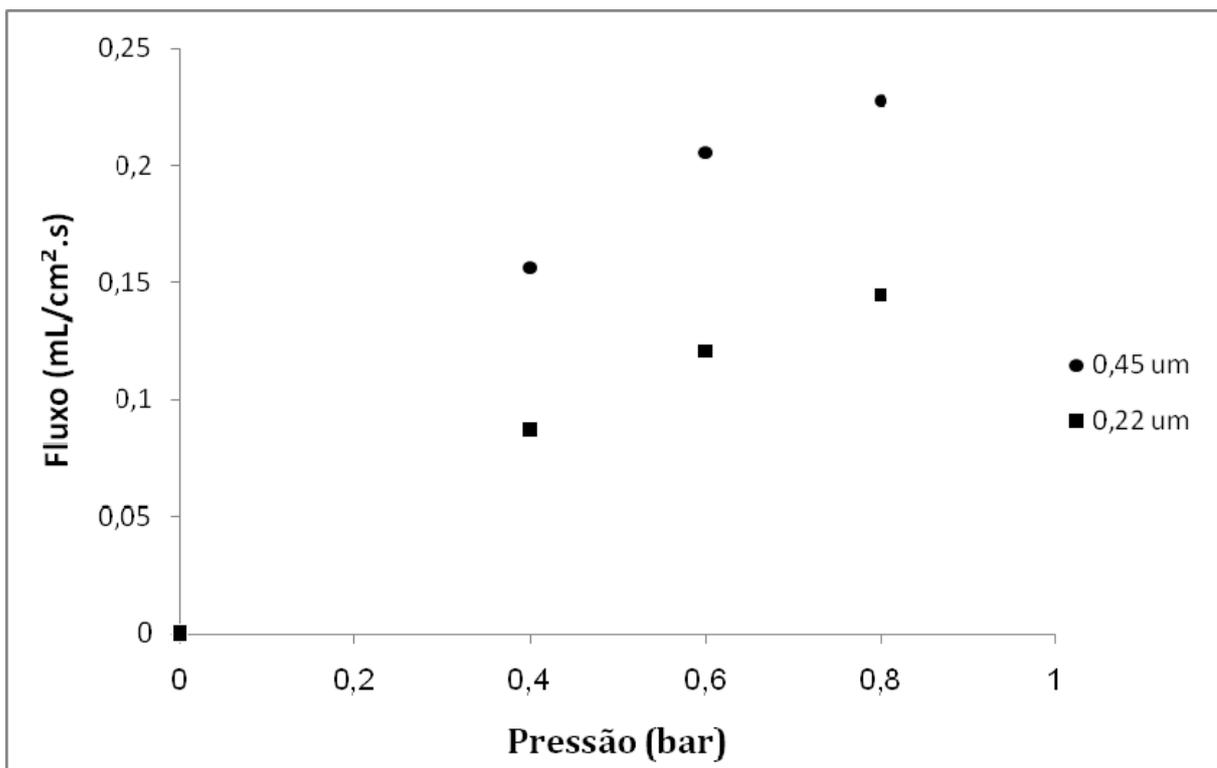


Figura 26. Fluxo médio permeado para membrana de $0,2\ \mu\text{m}$ e $0,45\ \mu\text{m}$

3.3. Balanço de massa e fluxograma do processo

3.3.1. Fluxograma

Neste capítulo é explicado o processo desenvolvido. A primeira etapa foi realizada em um fermentador para o crescimento de microalgas em aproximadamente 15 dias. Este meio então seguiu para o processo de floculação onde foi adicionado $Al_2(SO_4)_3$ como floculante. Após a floculação segue para uma filtração em papel de filtro para separação da biomassa, esta foi seca em estufa até peso constante. O permeado da filtração seguiu para o processo de microfiltração para retenção de microalgas ainda existentes na solução. Depois de realizado os processos de separação por floculação seguido de filtração e microfiltração foi realizado uma contagem por microscopia direta. Ao final de cada processo de filtração e microfiltração, a biomassa retida no papel de filtro e na membrana, respectivamente, foi levada à estufa para obtenção da massa seca. As quantidades retidas podem ser vistas na Tabela 13. O fluxograma do processo pode ser visualizado no Figura 27.

Um estudo futuro seria seguir este permeado da microfiltração para um processo de osmose inversa para retirada de sais e assim reutilizar a água utilizada em todo processo.

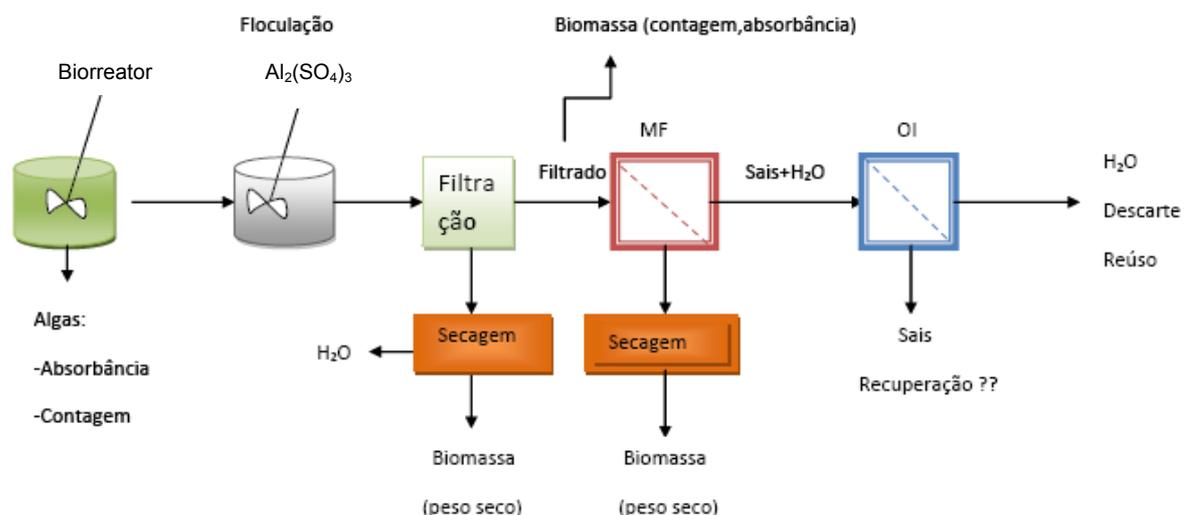


Figura 27. Fluxograma do processo de concentração de microalga

Após cada processo de separação foram retiradas alíquotas da fase aquosa para realização da análise de alumínio, como pode ser observado na Tabela 12. Ocorreu uma diminuição desses valores a cada etapa de separação realizada. Como já era de se esperar a maior quantidade de alumínio se encontra na etapa de floculação onde ocorreu a adição deste floculante. Nas etapas de microfiltração os valores obtidos foram aproximadamente iguais.

Tabela 12. Teor de alumínio de meio cultura após os processos de separação

Meio	Concentração de alumínio (g/L)
Floculado	0,0150
Filtrado	0,0088
Microfiltrado ¹	0,0084
Microfiltrado ²	0,0085

¹ cálculo para peso de célula com membrana de diâmetro nominal de poro de 0,2 μm

² cálculo para peso de célula com membrana de diâmetro nominal de poro de 0,45 μm

Foi realizado um balanço de massa para fornecer as quantidades de massa retidas de biomassa e de floculante no processo de floculação/filtração conforme observado na Tabela 13.

Tabela 13. Resultados de massa retida no processo de filtração/floculação

Composição do meio	Massa retida	Volume total de meio	Massa retida / volume
Total	2,6025 g	9,6 L	0,2711 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
Floculante	1,4200 g	9,6 L	0,1479 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
Biomassa microalgal	1,1825 g	9,6 L	0,1231 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

A composição total do meio é constituída de biomassa microalgal mais floculante. Os valores de biomassa retidos no papel de filtro foram bem superiores aos retidos pela membrana de microfiltração. Conforme pode-se esperar, a maior parte da separação da biomassa microalgal foi realizada no processo de floculação seguida de filtração.

Depois do processo de filtração a biomassa segue para o processo de microfiltração com membranas de diâmetros nominais de poro 0,2 μm e 0,45 μm . Após a realização desse processo foi retirado alíquotas para determinação do teor de alumínio, onde foi possível calcular a quantidade de floculante e de biomassa microalgal propriamente dita. Estes resultados podem ser vistos nas Tabelas 14 e 15 respectivamente.

Tabela 14. Resultados de massa retida no processo de separação usando membrana de diâmetro nominal de poro de 0,2 μm

Composição do meio	Massa retida	Volume total de meio	Massa retida / volume
Total	0,2008 g	4,6 L	0,0436 g·L ⁻¹
Floculante	0,0192 g	4,6 L	0,0042 g·L ⁻¹
Biomassa microalgal	0,1816 g	4,6 L	0,0394 g·L ⁻¹

Tabela 15. Resultados de massa retida no processo de separação usando membrana de diâmetro nominal de poro de 0,45 μm

Composição do meio	Massa retida	Volume total de meio	Massa retida / volume
Total	0,1562 g	4,6 L	0,0339 g·L ⁻¹
Floculante	0,0125 g	4,6 L	0,0027 g·L ⁻¹
Biomassa microalgal	0,1437 g	4,6 L	0,0312 g·L ⁻¹

O estudo de mais de um tipo de diâmetro nominal de poro demonstrou ser um fator importante, pois assim pode-se concluir qual membrana é a mais eficiente para o processo. Como pode ser visto nas tabelas acima a membrana de 0,2 μm possui uma quantidade de massa retida superior à encontrada pela membrana de 0,45 μm , isto pode ser explicado devido à distribuição de poros mais fechados na membrana de 0,2 μm , que consegue assim reter com mais eficácia as microalgas do que a de 0,45 μm .

O resultado dos balanços de massa empregando separadamente as duas membranas de microfiltração aponta para uma discrepância entre os valores de massa total de célula em solução de cerca de 3%. Vale ressaltar que o estudo

realizado nessa dissertação empregou radiação e teor de CO₂ inferiores aos de outros trabalhos da literatura.

A quantidade de floculante presente na massa retida foi calculada por diferença, através da análise do teor de alumínio em solução. Com as massas retidas nos processos de separação e com o cálculo da quantidade de floculante presente na massa retida foi possível encontrar a massa de biomassa retida em cada etapa e assim a seletividade das membranas de microfiltração, que podem ser avaliadas através da rejeição ao soluto (%) conforme mostrado nas Tabelas 16 e 17. É importante ressaltar que cerca de 120% da massa de microalgas retida na floculação/filtração é devida ao floculante, assim como cerca de 10% da massa de microalgas retida na microfiltração é devida ao floculante.

Na microfiltração a quantidade de biomassa retida foi pequena como pode ser observado nas Tabelas 16 e 17, mas serviu para confirmar que ainda existem microalgas no meio. Visando à reutilização da água, as tabelas apresentadas quantificam a presença de microalgas a serem retiradas em outras etapas do processo de separação.

Tabela 16. Resultados de biomassa microalgal e rejeição no processo de separação com a membrana de diâmetro nominal de poro de 0,2 µm

Meio	Biomassa retida	Volume total de meio	Rejeição^b
Retido na filtração	0,5666 g	4,6 L	75%
Retido na microfiltração	0,1816 g	4,6 L	95%
Permeado da microfiltração ^a	0,0105 g	4,6 L	-
Total	0,7587 g	4,6 L	99%

^a Estimado a partir da massa de uma célula obtida no processo de microfiltração e da contagem de células no permeado da microfiltração.

^b As rejeições apresentadas são relativas especificamente à etapa de separação em questão.

Não houve uma diferença significativa na porcentagem de rejeição de biomassa microalgal. Os dois tipos de poros apresentados mostraram-se eficientes como já era de se esperar, pois a microalga possui um tamanho de 0,6 μm , logo os dois tamanhos de poro utilizados deveriam reter a biomassa de forma satisfatória.

Tabela 17. Resultados de biomassa microalgal e rejeição no processo de separação com a membrana de diâmetro nominal de poro de 0,45 μm

Meio	Biomassa retida	Volume total de meio	Rejeição^b
Retido na filtração	0,5666 g	4,6 L	75%
Retido na microfiltração	0,1437 g	4,6 L	96%
Permeado da microfiltração ^a	0,0055 g	4,6 L	-
Total	0,7158 g	4,6 L	99%

^a Estimado a partir da massa de uma célula obtida no processo de microfiltração e da contagem de células no permeado da microfiltração

^b As rejeições apresentadas são relativas especificamente à etapa de separação em questão.

Os valores encontrados no permeado da microfiltração foram realizados através de uma contagem direta gerando valores com uma acurácia inferior daquele gerado por medição em balança, já que esta contagem foi realizada em uma concentração muito inferior àquela proposta pelo método. Como pode ser observado, a quantidade de células no permeado para membrana de 0,45 μm estimada foi menor do que a encontrada pela membrana de 0,2 μm , e isto afetou diretamente os resultados de rejeição obtidos, mostrando que a membrana de 0,45 μm proporcionou uma rejeição maior quando comparada com a membrana de 0,2 μm .

Os índices de rejeição obtidos foram aproximadamente iguais mostrando que a porosidade da membrana não acarretou diferenças significativas. Assim a utilização dessas membranas foi eficaz para concentração/separação da biomassa microalgal.

O uso da microfiltração levando em conta a rejeição total do sistema mostrou ser satisfatória, pois ocorreu uma recuperação celular de quase 100 %, mostrando

que a quantidade de microalga nesse meio seria muito pequena, mas que ainda restaria microrganismo a ser removido e alguns nutrientes e sais inseridos no início do processo. Assim, visando à reutilização da água, esses compostos deveriam ser ainda retirados em outras etapas do processo de separação.

Após a realização dos ensaios de separação/concentração da biomassa de microalga os papéis de filtros utilizados foram seguidos para processo de extração em Soxhlet. O percentual de lipídio foi encontrado através da relação entre a quantidade de lipídio extraído e a quantidade de biomassa microalgal retida no processo de separação por floculação seguida de filtração. Na Tabela 18 seguem os dados de rendimento de extração da fração lipídica.

Tabela 18. Rendimentos da fração lipídica

Massa de filtrado	Fração lipídica	Volume total de meio	Lipídio	Produtividade de óleo
1,1825 g	0,2654 g	9,6 L	22,4 %	27,6 mg/L

O valor encontrado para fração lipídica da microalga *Isochrysis galbana* mostrou ser satisfatório para um estudo inicial, porém ainda se encontra numa faixa um pouco inferior do que se era esperado. Contudo a porcentagem em peso seco encontrada se enquadra aquela relatado por Mata *et al.*,2009 na tabela 1. Assim para se obter valores superiores a 22% de teor de óleo devem se melhorar alguns parâmetros como eficiência na utilização da luz, habilidade do controle da temperatura, aeração, iluminação, temperatura entre outros, conseqüentemente melhorar a produção da microalga em questão (BOROWITZKA, 1999).

Entretanto, os sistemas de cultivo em grande escala também necessitam ser comparados quanto às suas propriedades básicas, como eficiência na utilização da luz, habilidade do controle da temperatura, estresse hidrodinâmico imposto à microalga.

4. CONCLUSÕES

A agitação mostrou ser um parâmetro muito importante para o aumento da produção da microalga, esta favorece a transferência de massa e a acessibilidade à luz.

O primeiro teste de separação por microfiltração que utilizou o mosto diretamente não mostrou resultados muito satisfatórios. O fluxo diminuiu rapidamente devido a formação rápida da camada de biofouling. Para se conseguir um melhor desempenho na microfiltração houve a necessidade de se fazer um pré-tratamento na amostra.

O processo de floculação como um agente de pré-tratamento demonstrou ser eficaz no processo de separação de microalgas, porem mostrou um inconveniente, agregou uma quantidade substancial de floculante ao processo, que responde por cerca de 120% da massa retida de microalgas.

A técnica de microfiltração mostrou ser uma técnica adequada para separação e/ou concentração de biomassa microalgas, possibilitando 99% de remoção de biomassa. Esse é um processo que pode ser ampliado gradativamente em função das necessidades, demonstrando ser um processo bastante promissor.

O estudo de diferentes poros de membrana mostrou ser um parâmetro importante para o desenvolvimento do trabalho. Considerando a quantidade de massa retida por pesagem a membrana de menor porosidade mostrou uma melhora de aproximadamente 25% comparada com aquela de maior poro.

Com relação ao coeficiente de rejeição (R), as membranas utilizadas neste trabalho apresentaram uma boa eficiência de remoção (aproximadamente 99%). Ocorreu uma discrepância de massa retida entre as membranas de 0,45 e 0,22 μm , pois era de se esperar que membranas com poros menores obtivesse uma remoção maior. Isto pode ser explicado pelo fato que a contagem realizada nessa etapa foi

feita em concentrações bem inferiores às aquelas citadas no método gerando um possível erro.

O teor de óleo obtido de 22,4% ainda se encontra num patamar inferior do esperado, mas ainda se encontra na faixa indicada pela literatura científica. Assim ocorre uma necessidade de se estudar melhor os parâmetros como iluminação, agitação e temperatura, para garantir uma melhor produção microalgal e conseqüentemente uma melhora na separação.

Não foi necessária a realização da separação por microfiltração com diferenças de pressão maiores que 0,8 bar porque foi possível aproximar-se do fluxo limite operando com diferença de pressão em torno de 0,8 bar.

Visando à reutilização da água, a presença de microalgas e de sais não mostra ser útil ao processo, logo se faz necessário a remoção destes em outras etapas posteriores de separação.

5. Sugestões para trabalhos futuros

O processo de filtração por *dead end* não é o método mais indicado para a separação de microalgas devido uma maior acumulação de materiais, fazendo com que os solutos se depositem sobre a sua superfície permitindo assim o entupimento mais rápido da membrana, ocorrendo a formação de torta da membrana. Assim seria conveniente testar o processo de filtração por membrana com filtração *cross flow*.

Ainda como trabalhos futuros sugere-se:

- Estudar o potencial para produção de biocombustível a partir de óleos extraídos da *Isochysis galbana*;
- Testar os parâmetros como iluminação, temperatura e aeração para melhorar a eficiência de crescimento microalgal;
- Estudar a reutilização da água como um novo meio para crescimento microalgal
- Desenvolver módulos de filtração adequada que diminua ao máximo a formação de fouling.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS IP, DACK S, DICKINSON FM. The distinctiveness of ATP: citrate lyase from *Aspergillus nidulans*. **Biochim Biophys Acta**;1597,p.36–41, 2002.

BARBOSA, M.J.G.V. Microalgal photobioreactors: scale-up and optimisation. Tese (Doutorado em Ciências) - Wageningen University, 2003, 166f.

BECKER, E. Microalgae biotechnology and microbiology. Cambridge University Press, Cambridge, p. 158–160, 1995.

BLIGH, E. G.; DYER, W. M. A Rapid Method of Lipid Extraction and Purification. **Can. J. Biochem. Physiol.** , v. 37, p. 911, 1959.

BOOIJ, K., VAN DEN BERG, C. Comparison of techniques for the extraction of lipids and PCBs from benthic invertebrates. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** V. 53, p.71–76, 1994.

BOROWITZKA, M. A. Microalgae for aquaculture: oportunities and constrains. **J. apply. Phycol**, v. 9, p. 393-401, 1997.

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

BOUGARAN, G.; LE DÉAN, L.; LUKOMSKA, E.; KAAS, R.; BARON, R. Transient initial phase in continuous culture of *Isochrysis galbana* affi nis *Tahiti*. **Aquatic Living Resources**,v.16, p. 389-394, 2003.

BRUNO, J.J. Edible microalgae: a review of the health research. Pacifica: **Center for Nutritional Psychology**, V.3, p.56, 2001.

CARNEIRO, L., AS, I. S., GOMES, F. S., MATTA, V. M., CABRAL, L. M. C., Cold sterilization and clarification of pineapple juice by tangencial microfiltration. **Desalination**, v. 148, p. 93-98, 2002.

CERTIK, M.; SHIMIZU, S. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.87, n.1, p.1-14, 1999.

CHEN, F.; ZHANG, Y. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, p. 221-224, 1997.

CHEN T.; ZHENG, W.; YANG, F.; BAI, Y.; WONG, Y. S. Mixotrophic culture of high selenium-enriched *Spirulina platensis* on acetate and the enhanced production of photosynthetic pigments. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 103-107 2006.

CHERYAN, M. Ultrafiltration and Microfiltration Handbook. Lancaster: **Technomic Publ. Co.**, Illinois, p.526, 1998.

CHISTI, Y. Biodiesel from Microalgae. **Biotechnol. Adv.** v. 25, p.294, 2007.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **School of Engineering, Massey University**, Private Bag 11 222, Palmerston North, New Zealand, 2008.

DE BOER, J. Chlorobiphenyls in bound and non-bound lipids of fishes: comparison of different extraction methods. **Chemosphere** v.17, p.1803–1810, 1988.

DERNER, R. B. Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados. **Tese de doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina**, 2006.

DODD, J.C. Harvesting algae grown on p1g wastes in Singapore, Paper presented at a Workshop on High Rate Algae Ponds held in Singapore, 1980.

DUARTE, P.F.; RADMANN, E.; COSTA, J.A.V. Comportamento Fluidodinâmico de Fotobioreatores do tipo Tanques Abertos Utilizados no Cultivo da Microalga *Spirulina platensis*. **Sinaferm – XIV Simpósio Nacional de Fermentações**, 2003.

EAGLES, W. P.; WAKEMAN, R. J. Interactions between dissolved material and the fouling layer during microfiltration of a model beer solution. **J. Memb. Sci.**, Amsterdam, v. 206, n. 1-2, p. 253-264, 2002.

EPE (Empresa de Pesquisa Energética). Balanço Energético Nacional 2009 – Ano base 2008: Resultados Preliminares. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <<http://www.epe.gov.br>>. Acesso em 02/09/2010.

EPPLEY, R.W. The growth and Culture of diatoms. In: WERNER, D. (Ed). **The biology of diatoms**. V. 13, p.24-64, 1977.

FERRAZ, C.A.M.; AQUARONE, E.; KRAUTER, M.; BALLONI, W.; FLORENZANO, G. Utilização de subprodutos da industria alcooleira na obtenção da biomassa de *Spirulina maxima*. Parte II. Emprego do residuo da destilação do mosto fermentado (vinhaça). **Revista de Microbiologia**, v.17, p.15-21, 1986.

FIDALGO, J. P. C. A.; TORRES, E.; SUKENIKM A.; HERRERO, C. Effect of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. **Aquaculture**, **166**, p. 105-116, 1998.

GARDNER, W. S., FREZ, W. A., CICHOCKI, E. A. & Parrish, C. C. Micromethod for lipids in aquatic invertebrates. **Limnol Oceanogr.** 30, p. 1099-1105, 1985.

GEKAS, V.; BARALLA, G.; FLORES, V. Aplicaciones de la tecnología de membrana em la industria alimentaria. **Food Science and Technology International**, v. 4, n. 5, 1998.

GERPEN, J. V. Biodiesel Processing and Production. **Fuel Process. Technol.** v. 86, p.1097, 2005.

GINZBURG, BZ. Liquid fuel (oil) from halophilic algae: a renewable source of non-polluting energy. **Renew Energy**, v. 3, p.249–252, 2003.

GIORNO, L. et al. Study of fouling phenomena in Apple juice clarification by enzyme membrane reactor. **Separation Sci. Technol.**, v. 33, n. 5, p. 739-756, 1998.

GREGORY J. Effect of polymers on colloid stability. Proc. of NATO Adv. Study Inst. on the Scientific Basis of Flocculation, 1979.

GRIMA, E. M.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; CAMACHO, F. G.; CHISTI, Y. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 231-248, 1999.

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

GROBBELAAR, J.U. Algal biotechnology: real opportunities for Africa. **South African Journal of Botany**, v.70, n.1, p.140-144, 2004.

GUDIN C, THERPENIER C. Bioconversion of solar energy into organic chemicals by microalgae. **Adv Biotechnol Processes**, v. 6, p.73– 110, 1986.

GUILLARD, R.R.L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W.L.; CHANLEY, M.H. (Eds). **Culture of marine invertebrate animals**. New York: Plenum, p.29-60, 1975.

HABERT, A.C. Escola piloto em engenharia química: processos de separação com membranas. Rio de Janeiro: **Coppe/UFRJ**, 1997.

HAWKEN, P.; LOVINS, A.; LOVINS, L. H.; “CAPITALISMO NATURAL” Cultrix, 1999.

HEASMAN M, DIEMARI J, O’CONNOR W, SUSHAMES T, FOULKES L. Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve mollusks—a summary. **Aquacult Res** v. 31,p. 637–659, 2000.

HELLENBUST, J.A. Light: plants. In: KINNE, O. (Ed). **Marine ecology. A comprehensive integrated treatise on life in oceans and coastal waters**. London: **Wiley Interscience**. p.124-158, 1970.

HENRIKSON, R. Microalga *Spirulina*. Superalimento del futuro. Ediciones Urano S. A., Barcelona, Spain,p. 545, 1994.

HILL J, NELSON E, TILMAN D, POLASKY S, TIFFANY D. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. **PNAS**; v. 103, p. 11206, 2006.

HOEK, C.; MAN, D. G.; JAHNS, H. M. **Algae**: an introduction to phycology. Cambridge: Cambridge University, p. 623, 1995.

HOOPER LA, HOOLLEIN HC, SLATER CS. Microfiltration of *Streptomyces rimosus*: cell harvesting process studies. **Sep Sci Technol** 33:1747–1765, 1998.

HUANG, G. M.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X. W.; Chen, G. Biodiesel Production from Micro-Algal Biotechnology. **Appl. Energy** , v. 87, p.38– 46, 2010.

HUNG M. T, LIU J. C. Microfiltration for separation of green algae from water. **Colloids Surf B Biointerfaces** v. 51, p.157–164, 2006.

JEFFREY, S.W., M.R. BROWN, and J.K. VOLKMAN. Haptophyte as feedstocks in mariculture. In J.C. Green and B.S.C. Leadbeater (eds.), *The Haptophyte Algae*, Clarendon Press, Oxford, pp. 287-302, 1994.

JEFFREY, S. W.; MANTOURA, R. F. C. & WRIGHT, S. W. *Phytoplankton Pigments in Oceanography: guidelines to Modern Methods*. UNESCO, Paris, p. 661, 1997.

KAPLAN, D, Z COHEN & A ABELIOVICH. Optimal growth conditions for *Isochrysis galbana*. **Biomass** (9), p. 37-48, 1986.

JIRARATANANON, R., UTTAPAP, D., SAMPRANPIBOON, P., Crossflow microfiltration of colloidal suspension with the presence of macromolecules. **Journal of Membrane Science**, 1998, vol. 140, p. 57-66.

LIN, L.; RHEE, K.C.; KOSEOGLU, S.S. Bench-scale membrane degumming of crude vegetable oil: process optimization. **Journal of Membrane Science**, n. 134, p. 101-108, 1997.

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

MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. *Bioresour. Technol.* 70, p.1–15, 1999.

MARSHALL, A.D.; DAUFIN, G. In: *Fouling and Cleaning in Pressure Driven Membrane Processes*. **International Dairy Federation**, Brussels. p. 8-35, 1995.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: **A review: Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 217- 232, 2009.

MIAO, X.; WU, Q. Biodiesel Production from Heterotrophic Microalgal Oil. **Bioresour. Technol**, v. 97, p. 841, 2006.

MEDINA, R. A.; GRIMA, M. E.; GIMÉNEZ, G. A.; GONZÁLES, I. M. J. Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology Advances**, v.16, n.13, p.517-580, 1998.

MEHER, L. C.; DHARMAGADDA, V. S. S.; NAIK, S. N. Optimization of Alkali Catalyzed Transesterification of Pongamia Pinnata Oil for Production of Biodiesel. **Bioresour. Technol**, v. 97, p. 1392, 2006.

METTING, F. B., Biodiversity and application of microalgae. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.17, p.477-489, 1996.

MORTENSEN, K. Y. B.; RAINUZZO, J. K.; KNUTSEN, G. fatty acid and elemental composition of the marine diatom *Chaetoceros gracilis* Schutt. Effects f silicate deprivation, temperature and light intensity. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 122, p. 173-185, 1988.

MULITERNO, A., MOSELE, P., C., COSTA, J., A., V., HEMKEMEIER, M., BERTOLIN, T., E., COLLA, L., M. Mixotrophic growth of *Spirulina platensis* in fed-batch mode. **Ciênc. agrotec., Lavras**, v. 29, n. 6, p. 1132-1138, 2005.

NEENAN, B.; FEINBERG, D.; HILL, A.; MCLNTOSH, R.; TERRY K. Fuels from Microalgae: **Technology Status, Potential and Research Requirements**; Rep. No. SERI/SP-231-2550. Solar Energy Research Institute: Golden, August 1986.

NORTON, T.A et al. Algal biodiversity. **Phycologia**, n.35, p.308–326, 1996.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p.359-466, 2003.

PERNET, F.; TREMBLAYB, R.; DEMERSC, E.; ROUSSYD, M. Variation of lipid class and fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri* and *Isochrysis* sp. Grown in a semicontinuous system. **Aquaculture**,v. 221, pag. 393–406, 2003.

POISSON, L.; ERGAN, F. Docosahexaenoic acid ethyl esters from *Isochrysis galbana*. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p.75-81, 2001.

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

RAVEN, J.A. Limits to growth. In: BOROWITZKA, M.A.: BOROWITZKA, L.J. (Eds). **Micro-algal biotecnology**. Cambridge: Cambridge University. p.331-356, 1988.

RAVEN, P. H; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**, 6a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.906, 2001.

REBOLLOSO-FUENTES MM, NAVARRO-PEREZ A, GARCIA-CAMACHO F, RAMOS-MIRAS JJ, GUIL-GUERRERO JL. Biomass nutrientprofiles of the microalga *Nannochloropsis*. **J Agr Food Chem** v. 49: p. 2966–2972, 2001.

RENNER, E. e SALAM, M.H.A. Application of ultrafiltration in the dairy industry. London/New York: Elsevier science Publishers LTD, p. 371, 1991.

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

RENAUD, S. M.; ZHOU, H. C.; PARRY, D. L.; THINH, L. V.; WOO, K. C. Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis* sp., *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea* and commercial species *Isochrysis* sp. (clone T.ISO). **Jornal of Applied Phycology**, v. 7, p. 595-602, 2004.

RODRIGUES, S.L.C., MOREIRA, R.L.S., CARDOSO, M.H.,MERÇON, F., Avaliação de parâmetros de ultrafiltração de suco de banana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol. 23(supl), p. 98-101, 2003.

RODOLFI, L.; ZITTELLI, G. C.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G.; TREDICI, M. R. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, p. 100-112, 2009.

ROSENBERG, J. N.; OYLER, G. A.; WILKINSON, L.; BETENBAUGH, M. J. A Green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, p. 430-436, 2008.

SCOTT, K. Handbook of industrial Membranes. **Introduction to Membranes Separations**. Elsevier. Cap. 1, p. 3-175, 1995.

SILVERBERG, B. A.; STOKES, P. M.; FERSTENBERG, L. B. Intranuclear Complexes in a Cooper-Tolerant Green Alga. **J. Cell Biol.** 1976, 69, 210.

SHAY, E.G. Diesel fuel from vegetable oils: Status and Opportunities. **Biomass Bioenergy**, 4:p. 227-242, 1993

SHEEHAN, J.; DUNAHAY, T.; BENEMANN, J.; ROESSLER, P. A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program – Biodiesel from Microalgae; Rep. No. NREL/TP-580-24910. **National Renewable Energy Laboratory**: Golden, 1998.

SMEDES, F. Determination of total lipid using nonchlorinated solvents. **Analyst** v.124, p.1711–1718, 1999.

SONG, D.; FU, J.; SHI, D. Exploitation of oil-bearing microalgae for biodiesel, **Chinese journal of biotechnology**, v. 24, p. 341-348, 2008.

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

SOXHLET, F. The Weight Analytic Determination of Milk Fat (*in German*). *Polytechnisches J. (Dingler's)*, 232, 461, 1879.

SUH, I.; LEE, C. G. Photobioreactor Engineering: Design and Performance. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 8, p. 313-321, 2003.

TEIXEIRA, V.L. Produtos naturais marinhos. In: PEREIRA, R.G.; SOARES-GOMES, A. (Orgs). **Biologia marinha**. Rio de Janeiro: Interciência. p.249-279, 2002.

SVAROVSKY, L. "Solid-liquid separation", Butterworths, 2nd ed., London, 1981.

TANAKA, H., OGBONNA J., YADA, H. Light supply coefficient: A new engineering parameter for photobioreactor design. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, V. 80, p. 369-376, 2005.

TOMAS, C. R. (Ed.). Identifying marine diatoms and dinoflagellates. **San Diego: Academic**, p. 596, 1996.

TOMASELLI, L. The microalgal cell. In: RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, p.3-19, 2004.

*TREDICI, M.R. Mass production of microalgae: photobioreactors. In: RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, p.178-214, 2004.*

TZOVENIS, I.; DE PAUW, N.; SORGELOOS, P. Optimisation of T-ISO biomass production rich in essential fatty acids I. Effect of different light regimes on growth and biomass production. **Aquaculture**, **216**: 203-222, 2003.

VAILLANT, F., MILLAN, P., BRIEN, G. O., DORMIER, M., DECLoux, M., REYNES, M., Crossflow microfiltration of passion fruit juice after partial enzymatic liquefaction. *Journal of Food Engineering*, vol. 42, p. 215-224, 1999.

VALENZUELA-ESPINOZA, E.; MILLAN-NUNEZ, R.; NUNEZ-CEBRERO, F. Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll a content in *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. **Aquaculture Engineering**, **25**: 207-216, 2002.

VLADISAVLJEVIC, G. T., VUKOSAVLJEVIC, P., BUKVIC, B., Permeate flux and fouling in ultrafiltration of depectinized Apple juice using ceramic membranes. *Journal of Food Engineering*, vol. 60, p. 241-247, 2003.

VONSHAK, A. Recent advances in microalgal biotechnology. **Biotechnology Advances**, **6**: 709-727, 1990.

VONSHAK, A. ***Spirulina platensis (Arthrospira)***. Physiology, Cell-Biology and Biotechnology, Taylor e Francis, London, UK,p. 233, 1997.

XU, H.; MIAO, X.; WU, Q. High Quality Biodiesel Production from a Microalga *Chlorella protothecoides* by Heterotrophic Growth in Fermenters. **J. Biotechnol.**v.126, p.499, 2006.

YONGMANITCHAI, W.; WARD, O.P. Screening of algae for potential alternative sources of eicosapentaenoic acid. **Phytochemistry**, v.9, n.30, p.2963-2967, 1991.