UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

GABRIEL LIMA DE FIGUEIREDO TEIXEIRA

SEPARAÇÃO DE MICROALGA *Isochrysis galbana* DO MEIO DE CULTIVO: AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DE FATORES DE SEPARAÇÃO E ANÁLISE DE INFLUÊNCIA CRUZADA VIA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA.

RIO DE JANEIRO – RJ – BRASIL

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

T266s Teixeira, Gabriel Lima de Figueiredo.

Separação de Microalga *Isochrysis galbana* do Meio de Cultivo: avaliação Experimental de Fatores de Separação e Análise de Influência Cruzada via Superfície de Resposta. Gabriel Lima de Figueiredo Teixeira. – Rio de Janeiro, 2013.

xv, 89f.: il.; 29,7 cm.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2012.

Orientadores: Jose Luiz de Medeiros, DSc. , Ofélia de Queiroz Fernandes Araujo, DSc.

1. Biocombustível. 2. Isochrysis galbana. 3. Separação. 4. Influência via Superfície de Resposta I. Medeiros, Jose Luiz de (orient.). II. Araujo, Ofélia de Queiroz Fernandes (orient.). III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química. IV. Título.

CDD: 662.66

GABRIEL LIMA DE FIGUEIREDO TEIXEIRA

SEPARAÇÃO DE MICROALGA *Isochrysis galbana* DO MEIO DE CULTIVO: AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DE FATORES DE SEPARAÇÃO E ANÁLISE DE INFLUÊNCIA CRUZADA VIA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada por:

_____

José Luiz de Medeiros, DSc – Orientador (Escola de Química, UFRJ)

_____

Ofélia de Queiroz Fernandes Araújo, Dsc. – Co-orientadora (Escola de Química, UFRJ)

_____

Érika Cristina A. N. Chrisman, DSc. (Escola de Química, UFRJ)

_____

Claudia Maria Luz Lapa Teixeira, DSc. (Instituto Nacional de Tecnologia)

_____

Márcia Monteiro Machado Gonçalves, DSc. (Instituto de Química, UERJ)

_____

Ricardo Moreira Chaloub, DSc.(Instituto de Química, UFRJ)

_____

Magali Christe Cammarota, DSc. (Escola de Química, UFRJ)

Rio de Janeiro – RJ – Brasil
2013

“O que Deus quer de nós diante de tanto sufoco? Fez ele o mundo desse jeito? Fez não. Está lá na primeira página da Bíblia, no Gênesis, Deus nos criou para viver num jardim. Tem coisa melhor que jardim? Quem não sonha em ter uma casa com pomar, flores e frutos, pássaros e uma queda d´água? A terra sem males. Então, por que tanta injustiça?”

Frei Betto

AGRADECIMENTOS

À minha mãe pelo seu amor, carinho e pelo constante incentivo em minha vida.

Ao meu irmão Alexandre e minha irmã Raquel pelo carinho enorme que sempre tiveram comigo sempre me apoiando.

À minha noiva que sempre me apoia nos momentos mais difíceis e complicados, sendo meu porto seguro.

Aos meus tios, tias, primos, primas, cunhados, cunhada, sogro, sogra e afilhada que sempre me apoiam e me dão forças para lutar.

Ao meu grande amigo e irmão de tantos anos “Magacho”.

Aos demais amigos que sempre fazem que meus dias sejam melhores (Edu Dória, Marcelo, Luciana, Patrícia, Grazielle, Renato, Lucas).

Ao meu orientador José Luiz Medeiros por ter-me “emprestado” um pouco da sua vasta inteligência e sabedoria.

À minha orientadora Ofélia de Queiroz por ter me mostrado a ciência junto as mais diversas tecnologias (que nunca tinha visto na vida), e por ter-me aceitado como aluno de mestrado.

À “chefa” Marta por ter tido toda a paciência do mundo em me explicar tudo o que me ensinou e que foi muito útil em todo o mestrado.

Ao meu grande amigo Gripp que foi o meu “lado calmo” dentro do laboratório e que sem ele os meus experimentos não teriam saído tão bem.

Ao “Vaguinho” por todo o suporte nos experimentos e análises, além das piadas, brincadeiras, almoço e incentivo; sem ele o laboratório pararia.

Ao meu ex-aluno de iniciação científica Guilherme Landim que foi peça fundamental para o meu amadurecimento como aluno de mestrado e professor.

Ao meu ex-aluno de iniciação científica “Pedrinho” que também foi peça fundamental para que meus experimentos tivessem ocorrido.

Aos demais amigos do laboratório H2CIN, em especial Bruna, Mari, Claudia e Alejandra.

À minha amiga “Syl” que me acompanhou desde a escola, graduação e agora na pós-graduação, sendo uma grande amiga e incentivadora.

À minha amiga Carin Caputo pelas caronas, tira-dúvidas, risadas e ensinamentos.

Aos demais amigos e lutadores do mestrado acadêmico do TPQB.

RESUMO

TEIXEIRA, Gabriel Lima de Figueiredo. Separação de Microalga *Isochrysis galbana* do Meio de Cultivo: Avaliação Experimental de Fatores de Separação e Análise de Influência Cruzada via Superfície de Resposta. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Escola de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

O atual direcionamento das pesquisas na área de produção energética tem se baseado na sustentabilidade. Dentre os biocombustíveis existentes, a biomassa de microalga é uma solução viável que pode transformar o cenário energético atual, sendo considerada uma técnica inovadora. Não competir com os alimentos, não haver necessidade de solos férteis, não utilização de defensivos agrícolas, utilização de CO_2 como fonte de carbono e alta produtividade de cultivos em fotobiorreatores para geração de biomassa/produtos, são alguns pontos positivos que o cultivo destes microorganismos pode apresentar. Dentre das diversas etapas do processo de geração de biomassa algal, *downstream process* (última fase) pode apresentar gargalos, que se não for bem desenvolvida e projetada apresentará diversos problemas ambientais e operacionais que significarão custos. Com este propósito, o presente trabalho busca fazer uma avaliação quantitativa de alternativas tecnológicas de separação de biomassa da microalga *Isochrysis galbana* do meio de cultivo, implementação experimental de culturas de microalga a quatro fatores capazes de gerar separação das células do meio de cultivo dependendo do tempo de exposição, a saber Concentração de NaOH, Temperatura, RPM de Centrifugação e Intensidade de Irradiância; e análise estatística via modelos de Superfícies de Resposta para o desempenho cruzado da concentração NaOH com RPM de Centrifugação sob tempo de exposição fixo. Irradiância e Temperatura não demonstraram ser boas técnicas para se buscar a separação célula-meio de cultivo, apresentando valores aproximados de 60% e sem separação de fase (concentrado celular x (vesus) sem concentrado celular), entretanto, NaOH e RPM apresentaram valores individuais médios bastante satisfatórios (80% e 90, respectivamente) com separação da fases. Sendo assim, foi realizado mais um experimento utilizando-se conjuntamente NaOH e RPM, o que apontou uma melhor eficiência na separação celular em comparação a estas variáveis testadas separadamente. O Software SURFACE_RESPO (desenvolvido em MATLAB R2007a pela Equipe do Lab. H2CIN) foi a ferramenta utilizada para ajudar a apurar os resultados obtidos no experimento em conjunto (NaOH e RPM) e criar um modelo para uma possível utilização em escala industrial. O modelo gerado é de natureza cúbica ($\hat{Y}_i = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1.F_{1i} + \hat{\beta}_2.F_{2i} + \hat{\beta}_3.F_{1i}.F_{2i} + \hat{\beta}_4.F_{1i}^2 + \hat{\beta}_5.F_{2i}^2 + \hat{\beta}_6.F_{1i}^2.F_{2i} + \hat{\beta}_7 F_{2i}^2.F_{1i}$), com os valores de S_R^2 (4.407e-007), S_Y^2 (8.2888e-005) e S_L^2 (menor do que 0,001) demonstrando que os dados experimentais, modelo escolhido e desempenho do modelo escolhido foram bastante satisfatórios para a situação em questão.

Palavras-chave: Biocombustível, *Isochrysis galbana*, Separação, Superfície de Resposta.

ABSTRACT

Teixeira, Gabriel Lima de Figueiredo Teixeira. Harvesting microalgae *Isochrysis galbana* from medium culture: Experimental Evaluation of Factors Separation and Analysis of Influence Crusade via Response Surface. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Escola de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

The current direction of research in the area of energy production has been based on sustainability. Among existing biofuels, biomass from microalgae is a viable solution that can transform the current energy scenario being considered an innovative technique. Not compete with food, no need for fertile soil, no use of pesticides, use of CO2 as a carbon source and high crop productivity in photobioreactors to generate biomass / products are some positives that the cultivation of these microorganisms can present. Among the various stages of algal biomass generation, downstream process (last phase) can present some problem, which if not well developed and designed many present environmental problems and high operating costs. For this purpose, the present work aims to make a quantitative evaluation of alternative technologies for separating biomass from microalgae *Isochrysis galbana* culture, experimental implementation of microalgae cultures of the four factors can generate separating the cells from the culture medium depending on the weather exposure, namely NaOH concentration, temperature, RPM centrifuging and intensity of irradiance; via models and statistical analysis of response surfaces for performance crossed with NaOH concentration RPM under Centrifugation, fixed exposure time. Irradiance and temperature haven´t proved be good techniques for to seek the separation cell-culture, with approximate values of 60% and without phase separation (concentrated cell x (vesus) without cell concentrate), however, RPM and NaOH showed individual values average satisfactory (80% and 90 respectively) with separation of phases. Therefore, another experiment was conducted using NaOH together RPM, which showed a better efficiency in cell separation in comparison to these variables tested separately. The SURFACE_RESPO Software (developed in MATLAB R2007a by staff lab H2CIN) was the tool used to help determine the results obtained in the experiment together (NaOH and RPM) and create a model for possible use on an industrial scale. The generated model is of a cubic ($\hat{Y}_i = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1.F_{1i} + \hat{\beta}_2.F_{2i} + \hat{\beta}_3.F_{1i}.F_{2i} + \hat{\beta}_4.F_{1i}^2 + \hat{\beta}_5.F_{2i}^2 + \hat{\beta}_6.F_{1i}^2.F_{2i} + \hat{\beta}_7 F_{2i}^2.F_{1i}$) with the values S_R^2 (4.407e-007), S_Y^2 (8.2888e-005) and S_L^2 (less than 0.001), demonstrating that the experimental data, selected model chosen and the model performance was quite satisfactory to the situation in question.

Keywords: Biofuel, *Isochrysis galbana*, harvesting, Influence via Response Surface.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS v

RESUMO vii

ABSTRACT viii

SUMÁRIO ix

CAÍTULO I - INTRODUÇÃO..... 1

I.I – ENERGIA E BIOCOMBUSTÍVEIS..... 1

I.II – BIOCOMBUSTÍVEIS..... 5

I.III – BIOCOMBUSTÍVEL DE MICROALGAS: BAIXO CUSTO DE PRODUÇÃO E BAIXO IMPACTO AMBIENTAL. 8

I.V – OBJETIVOS..... 12

I.V.I – GERAL..... 12

CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 13

II.I – CO_2 E A BIOFIXAÇÃO EM MICROALGAS COMO MECANISMO DE MITIGAÇÃO DE EMISSÕES..... 13

II.II – FOTOBIORREATORES E LAGOAS *RACEWAYS*..... 18

II.III – SEPARAÇÃO DA BIOMASSA: O GARGALO DA PRODUÇÃO INDUSTRIAL MICROALGAL..... 22

CAPÍTULO III – MATERIAL E MÉTODOS..... 26

III.I – FOTOBIORREATOR E CONDIÇÕES DE CULTIVO 26

III.I.I CRESCIMENTO CELULAR E MATERIAL BIOLÓGICO..... 26

III.I.II MEIO DE CULTIVO..... 26

III.I.III ANÁLISE DE NITRATO RESIDUAL..... 30

III.I.IV ANÁLISE DE FOSFATO RESIDUAL..... 31

III.II – EXPERIMENTOS DE SEPARAÇÃO DE CÉLULAS DO MEIO DE CULTIVO..... 34

III.II.I – INFLUÊNCIA DO FATOR CONCENTRAÇÃO DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO – NaOH..... 36

III.II.II – INFLUÊNCIA DO FATOR TEMPERATURA..... 38

III.II.III – INFLUÊNCIA DO FATOR RPM DE CENTRIFUGAÇÃO/ 40

FORÇA “G”.....

III.II.IV – INFLUÊNCIA DO FATOR IRRADIÂNCIA..... 41

III.II.V – INFLUÊNCIA CRUZADA DE CONCENTRAÇÃO DE NAOH E RPM DE CENTRÍFUGAÇÃO..... 43

CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 46

IV.I – EXPERIMENTOS DE SEPARAÇÃO CELULAR..... 46

IV.I.I – INFLUÊNCIA DE CONCENTRAÇÃO DE NAOH..... 46

IV.I.II – INFLUÊNCIA DE TEMPERATURA..... 54

IV.I.III – INFLUÊNCIA DE RPM DE CENTRIFUGAÇÃO..... 58

IV.I.IV – INFLUÊNCIA DE IRRADIÂNCIA..... 61

IV.I.V – INFLUÊNCIA CRUZADA DE CONCENTRAÇÃO DE NaOH E RPM DE CENTRIFUGAÇÃO..... 64

IV.II – ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA PERCENTAGEM DE SEPARAÇÃO CELULAR VERSUS FATORES CONCENTRAÇÃO NaOH E RPM DE CENTRIFUGAÇÃO..... 66

IV.II.I – DESEMPENHO DE SUPERFÍCIES DE RESPOSTA ALTERNATIVAS PARA PERCENTAGEM DE SEPARAÇÃO CELULAR VERSUS FATORES CONCENTRAÇÃO NaOH E RPM DE CENTRIFUGAÇÃO..... 79

CAPÍTULO V – CONCLUSÕES..... 82

V.I – CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES..... 82

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Níveis de utilização de fontes de energia primária entre os anos de 1985 e 2010. 1
Figura 2.1 – Emissão de gases do efeito estufa. 15
Figura 2.2 – Ciclo de Carbono Atmosférico em Contexto de Tecnologias de Microalgas. 16
Figura 2.3 – Esquema de *Raceway*. 19
Figura 2.4 – Lagoas *Raceways* de Microalgas. 19
Figura 2.5 – Fotobiorreator com Tubos Paralelos Horizontais. 20
Figura 2.6 – Fotobiorreator com Arranjo Vertical de Tubos em *Air-Lift*. 20
Figura 2.7 – Distribuição Mundial de Diferentes Técnicas para Cultivo Microalgal. 22
Figura 2.8 – Esquema com as principais fases em um sistema de produção de microalgas. 23
Figura 3.1 – Curva de Calibração de Concentração Celular em cel/mL (x) versus Absorbância a 750nm (y). 28
Figura 3.2 – Fotobiorreator para o crescimento de microalgas. 29
Figura 3.3 – Interior do fotobiorreator e demonstração da disposição das lâmpadas e câmara de vidro de células. 29
Figura 3.4 – Esquema de Desenvolvimento do Crescimento Microalgal em Fotobiorreator neste Trabalho. 30
Figura 3.5 – Curva de Calibração de Absorbância (y) versus Concentração de Nitrato (x). 31
Figura 3.6 – Curva de Calibração de Absorbância (y) versus Concentração de Fosfato (x). 32
Figura 3.7 – Materiais Separados para Testes Concentração de NaOH versus Tempo de Exposição. 36
Figura 3.8 – Exposição à Temperatura 5ºC. 38
Figura 3.9 – Seis Testes para Exposição à Temperatura 5ºC 38
Figura 3.10 – Bancada com as Provetas de Ensaios nas Irradiâncias pré-Definidas. 42
Figura 3.11 – Sistema de Testes de Irradiância em funcionamento. 42
Figura 3.12 – Identificação Espacial de Pontos da Tabela 3.9 do Planejamento Experimental para Influência Cruzada de Concentração de NaOH com RPM de Centrifugação. 42

Figura 4.1 – Condições no Início dos Testes de Influência de Concentração de NaOH na Separação Celular, com 30 Provetas de 50mL de Cultura para Adição de NaOH. 46

Figura 4.2 – Variação dos Valores Percentuais de Células Separadas do Meio por Ação de Concentração de NaOH. 47

Figura 4.3 – Teste após 30 ou 60 minutos. Seta preta aponta proveta com 5M. Chave branca demonstrando o líquido límpido suspenso. Cor mais esverdeada indicando células rompidas. 48

Figura 4.4 – Distribuição dos Valores de pH ao Final dos Experimentos de Influência de Concentração de NaOH. 49

Figura 4.5 – Percentual de Volume de Células Separadas contra o Tempo de Exposição. 49

Figura 4.6 – Tentativa de Reaproveitamento de Meio Separado de Algas sem injeção de CO_2. 50

Figura 4.7 – Concentração Celular no Fundo do Tubo com Sobrenadante a 1M, após 1 hora de Exposição. 50

Figura 4.8 – Concentração Celular no Fundo do Tubo com 5M de NaOH após 24 horas. 51

Figura 4.9 – Proveta a 15ºC, resultado quase um padrão para todas as temperaturas. 54

Figura 4.10 – Proveta a 5ºC após 3 horas de experimento. Uma “leve” separação é percebida na camada superior da proveta. 54

Figura 4.11 – Percentual de Células Separadas nos Testes de Exposição a Temperatura Baixa. 55

Figura 4.12 – Percentual de Células Separadas nos Testes de Exposição a Temperaturas Altas. 55

Figura 4.13 – Valores em Percentuais do Volume de Células Separadas por Centrifugação versus RPM e Tempos de Exposição. 58

Figura 4.14 – Centrifugado em 2 minutos a 2500 RPM. 59

Figura 4.15 – Centrifugado em 3 minutos a 2500 RPM. 59

Figura 4.16 – Centrifugado em 2 minutos a 1500 RPM. 59

Figura 4.17 – Percentual de Células que Desceram durante os Experimentos com Irradiância. 61

Figura 4.18 – Sistema em funcionamento após 1 hora a 200μE. 62

Figura 4.19 – Sistema em funcionamento após 1 hora a 30μE. 62

Figura 4.20 – Interior de Proveta de Ensaio Preparada para Teste de Irradiância demonstrando o "Não Acesso" de Luz ao seu Interior. 62

Figura 4.21 – Percentual de Células Separadas via Cruzamento de Fatores Concentração NaOH e RPM Centrífuga. 64

Figura 4.22 – Teste F do Modelo com S^2_R, S^2_L e Abscissa Fisher a 95% Probabilidade. 69

Figura 4.23 – Médias de Observações versus Respostas Preditas [Superfície de Resposta da Eq. (4.1)]. 69

Figura 4.24 – Respostas Observadas (%Cel. Floculadas) em Réplicas versus Respostas Preditas via Eq. (4.1) [Superfície de Resposta da Eq. (4.1)]. 70

Figura 4.25 – Superfície de Resposta de Percentagem de Células Separadas e Superfícies Limites de Confiança (95%) [Superfície de Resposta da Eq. (4.1)]. 71

Figura 4.26 – Análise de Respostas da Superfície de Resposta na Eq. (4.1). 72

Figura 4.27 – Análise de Respostas da Superfície de Resposta na Eq. (4.1). 73

Figura 4.28 – Matriz Variâncias-Covariâncias de Respostas Estimadas [Superfície de Resposta da Eq. (4.1)]. 74

Figura 4.29 – Valores Absolutos de Parâmetros 0 a 7 Estimados e seus Limites de Confiança a 95%. 75

Figura 4.30 – Matriz Variâncias-Covariâncias de Parâmetros Estimados [Superfície de Resposta da Eq. (4.1)]. 75

Figura 4.31 – Região de Confiança 3D a 95% de Probabilidade para Valores Corretos da Tríade de Parâmetros β_0 , β_1 , β_2 Centrada nos Valores Estimados destes Parâmetros . 76

Figura 4.32 – Região de Confiança 2D a 95% de Probabilidade para Valores Corretos da Dupla de Parâmetros β_0 , β_1. 77

Figura 4.33 – Histogramas de Resíduos (Y = ln(%Cel.Floculadas)) versus Função Densidade de Probabilidade Normal. 78

Figura 4.34 – Médias de Observações versus Respostas Preditas [Superfície de Resposta da Eq. (4.5)]. 80

Figura 4.35 – (a) Teste F do Modelo com S^2_R , S^2_L e Abscissa Fisher a 95% Probabilidade. 80

Figura 4.36 – Análise de Respostas da Superfície de Resposta na Eq. (4.5). 81

Figura 4.37 – Superfície de Resposta de Percentagem de Células Separadas e Superfícies Limites de Confiança (95%) [Superfície de Resposta da Eq. (4.5)]. 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Produção de petróleo entre os anos de 2002 e 2011. 2

Tabela 1.2 – Alguns Biocombustíveis e suas fontes. 5

Tabela 1.3 – Produção de Etanol nas diferentes regiões do Brasil. 11

Tabela 1.4 – Bioprodutos de alto valor agregado derivados de microalgas. 12

Tabela 2.1 – Principais diferenças e características das lagoas e fotobiorreatores. 21

Tabela 3.1 – Concentrações dos Compostos do Meio de Cultura (meio f/2, sem o uso de silicato). 27

Tabela 3.2 – Planejamento Geral dos Experimentos de Separação de Células do Meio de Cultivo. 34

Tabela 3.3 – Planejamento Experimental para Influência de Concentração NaOH Cruzada com Tempo de Exposição na Separação Celular de Microalgas. 37

Tabela 3.4 – Planejamento Experimental para Influência de Temperatura Cruzada com Tempo de Exposição na Separação Celular de Microalgas. 38

Tabela 3.5 – Planejamento Experimental para Influência de RPM de Centrifugação Cruzada com Tempo de Exposição na Separação Celular de Microalgas. 40

Tabela 3.6 – Velocidade Angular (RPM) da Centrífuga e Aceleração Centrífuga em “g’s” (g = 9.81m/s2). 40

Tabela 3.7 – Planejamento Experimental para Influência de Irradiância Cruzada com Tempo de Exposição na Separação Celular de Microalgas. 41

Tabela 3.8 – Relação entre Potência e Irradiância das Lâmpadas Utilizadas. 42

Tabela 3.9: Planejamento Experimental 32 para Análise de Ação Cruzada de Fatores Concentração de NaOH e RPM de Centrifugação. 43

Tabela 4.1 – Comparação do Percentual de Células Separadas com Fatores Concentração NaOH e RPM Centrífuga agindo Isoladamente e com os mesmos Fatores agindo Combinados. 65

Tabela 4.2 – Parâmetros Estimados e Testes de Significância no Modelo de Superfície de Resposta na Eq. (4.1). 68

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

I.I – ENERGIA E BIOCOMBUSTÍVEIS.

A recente corrida internacional por fontes de energia limpa e renovável vem se tornando um desafio que estimula o desenvolvimento energético sustentável de todo o mundo, já que a maior parte das principais fontes energéticas atuais é capaz de gerar danos ambientais, sendo alguns até mesmo irreversíveis. Recursos energéticos e de consumo estão intimamente relacionados com a qualidade ambiental de forma geral e com a qualidade de importantes recursos vitais como a água e comida. A exploração e utilização das principais fontes energéticas em todo o mundo são grandes causadores de impactos ambientais enquanto as menos degradantes ainda apresentam níveis de utilização ainda muito baixos (LIOR, N. 2012b). O gráfico abaixo (Fig. 1.1) mostra as principais fontes utilizadas entre as décadas 1985 até 2010.

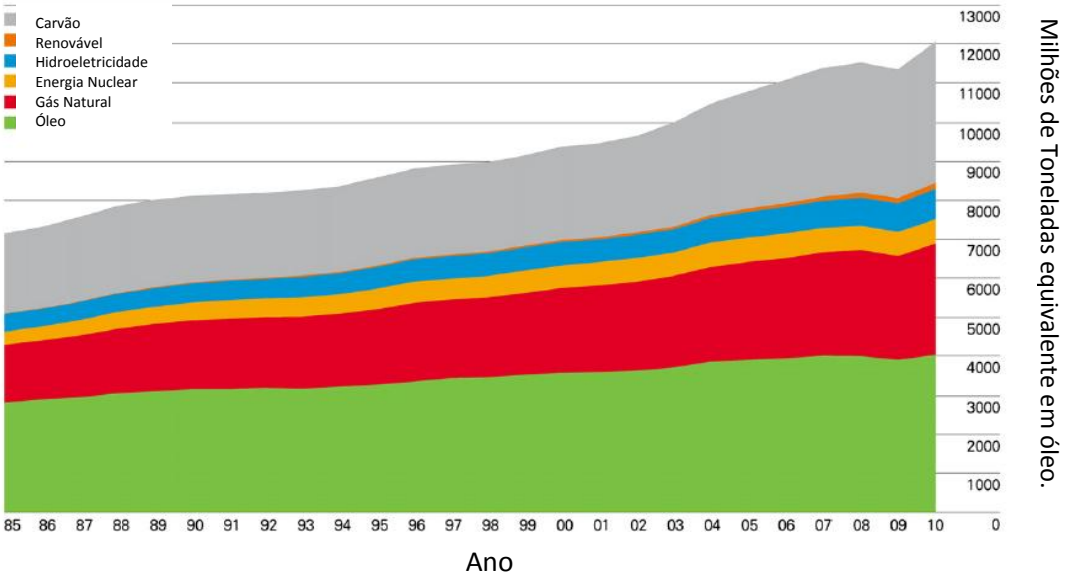

Figura 1.1 – Níveis de utilização de fontes de energia primária entre os anos de 1985 e 2010 (fonte: LIOR, N. 2012b).

No cenário brasileiro o caminhar não tem sido diferente, já que algumas matrizes energéticas utilizadas geram danos ambientais diversos. O petróleo e o gás são considerados matrizes energéticas de produção consolidada, com tecnologias desenvolvidas e de grande eficiência energética. Por outro lado, apresentam diversos impactos diretos e indiretos ao ambiente como já demonstraram alguns estudos e relatórios (HUANGA et al. 2005; SCOTT et al. 2010). Nestes relatórios também é mencionada a necessidade de se buscar outras

matrizes energéticas que apresentem mesmas características energéticas (ou melhores), sejam viáveis e consigam suprir as necessidades humanas causando menos impacto ao ambiente.

Mas se por um lado há o interesse da busca de fontes alternativas que sejam menos impactantes ao ambiente, por outro não há indícios que a produção energética derivada do petróleo está sendo reduzida de forma eficaz. Segundo o Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (2012) a produção de petróleo em todo o mundo tem tido um aumento nas últimas décadas, com algumas exceções em alguns anos (TABELA 1.1).

Tabela 1.1 – Produção de petróleo entre os anos de 2002 e 2011 (fonte: ANUÁRIO ESTATÍSTICO BRASILEIRO DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS, 2012).

Regiões Geográficas, Países e Blocos Econômicos	Produção de petróleo (mil barris/dia)									
	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
América do Norte	14.077	14.198	14.143	13.702	13.739	13.631	13.122	13.471	13.880	14.301
Américas Central e do Sul	6.619	6.314	6.590	6.963	6.997	6.982	7.104	7.229	7.293	7.381
Europa e ex-União Soviética	16.247	16.927	17.525	17.476	17.531	17.753	17.537	17.703	17.629	17.314
Oriente Médio	21.710	23.236	24.895	25.392	25.608	25.219	26.320	24.633	25.314	27.690
África	8.028	8.436	9.377	9.954	9.966	10.263	10.284	9.792	10.114	8.804
Ásia-Pacífico	7.811	7.748	7.829	7.904	7.848	7.881	7.969	7.903	8.251	8.086
Total Opep	29.113	30.839	33.641	34.973	35.211	35.067	36.203	33.897	34.753	35.830
Total não Opep	45.380	46.020	46.717	46.418	46.476	46.662	46.132	46.835	47.727	47.745

A indústria do petróleo é o principal sustentáculo do consumo energético do mundo como mostrado na Fig. 1.1, mas acarreta diversos potenciais problemas ambientais, tais como:

- Geração de poluentes atmosféricos especialmente em áreas urbanas (NO_X, SO_X, H_2S, CO, etc) oriundos da combustão de gasolina, diesel, querosene de Aviação e Óleo Combustível (RIBEIRO, 2012; LIOR, 2012a; 2012b);

- Geração de gases de efeito estufa na atmosfera (CO_2) oriundos da combustão de gasolina, diesel, querosene de aviação e óleo combustível (RIBEIRO, 2012; SCOTT et al., 2010)

- Diversas possibilidades de impacto ambiental desde a extração da matéria-prima (óleo bruto) até seu transporte (nos casos de extração offshore) (HUANGA et al., 2005);

- Gases e efluentes líquidos poluentes gerados nos processos de refino do óleo bruto (LIOR, 2012b; SCOTT et al., 2010);

- Problemas na estocagem de enormes volumes de derivados de petróleo altamente inflamáveis e agressivos ambientalmente, seja em refinarias, parques de tancagens de distribuidores, terminais marítimos, estações de bombeio de oleodutos e gasodutos etc, que chegaram a ocasionar inúmeros incêndios com destruição urbana e ambiental;

- Impactos negativos causados pelos mais diversos derramamentos de petróleo em todo o mundo – mais recentemente o grande vazamento da BP (2010); e o da Chevron (2011/2012); entre tantos outros eventos nas últimas décadas que têm levantado inúmeras questões ambientais pertinentes.

Portanto, há a necessidade de que tais pontos problemáticos da indústria do petróleo sejam controlados, estudados e aprimorados.

Uma alternativa para redução dos possíveis problemas ambientais causados pelas matrizes energéticas atuais consiste em buscar outras fontes de energia que apresentem metas concretas de redução de impactos ambientais. Essas metas devem considerar os benefícios ambientais (como a mitigação dos gases de efeito estufa), sociais (geração de empregos), de desenvolvimento tecnológico, e a redução dos custos de energia que podem ser propiciados por essas fontes (SOUSA & MACEDO, 2010).

Atualmente existem diversas fontes energéticas renováveis (eólica, maré-motriz, solar, biomassa) que podem fornecer energia causando menos impactos ao ambiente se comparadas às principais fontes utilizadas atualmente. É necessário, então, buscar um equilíbrio na relação de produção energética e os seus possíveis impactos gerados.

Em comparação com outras formas de energia renovável como eólica, maré e solar, os biocombustíveis líquidos são favorecidos em alguns pontos. Estes combustíveis permitem que a energia solar seja armazenada e utilizada diretamente em motores (SCOTT et al., 2010; HUANGA et al., 2005). O biocombustível, também, pode ser transportado para diversos terminais através de uma variedade de meios, incluindo transporte ferroviário, rodoviário, barcaças e navios, facilitando muito o seu escoamento (ENVIRONMENTAL

PROTECTION AGENCY, 2011). Além disto, na produção e geração dos biocombustíveis existem inúmeros processos de conversão da matéria-prima até o combustível final, e o tipo de biocombustível que será produzido. Com uma variedade de processos possíveis para obter um determinado biocombustível (derivados de uma mistura do biocombustível com a gasolina, diesel ou em sua forma pura) há um possível direcionamento pela busca de técnicas e produtos mais baratos favorecendo assim ao mercado energético (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2011).

Diversos biocombustíveis, já estudados, podem levar as reduções substanciais dos impactos ambientais, como no caso das reduções das emissões de Gases de Efeito Estufa (GEE) quando se comparado com todos os processos envolvendo os combustíveis fósseis. Mas vale apontar que ocorre uma inconstância no nível de economia ambiental de alguns biocombustíveis que variam largamente de acordo com as matérias-primas e processos de produção utilizados (HOUSE OF COMMONS ENVIRONMENTAL AUDIT COMMITTEE, 2008; PARMAR et al., 2011).

Se por um lado é notório saber que a utilização das mais diversas fontes não-renováveis são um grande problema ambiental, por outro lado o seus valores de produção energética, utilizando tais bases, não tem tido reduções significativas, em especial no Brasil, e nem mesmo os de fontes renováveis têm tido um grande e constante crescimento (EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA, 2011; ANUÁRIO ESTATÍSTICO BRASILEIRO DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS, 2012).

Segundo o relatório Balanço Energético Nacional (EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA, 2011) a cana-de-açúcar dentre os biocombustíveis renováveis que apresentou crescimento a nível nacional, ainda que relativamente baixo frente às necessidades populacionais e industriais. Sendo assim, ainda há que se buscarem planos de ações políticas para que as fontes alternativas de energia passem a apresentar valores mais significativos tanto em produção como utilização. De pouco adianta existir uma fonte energética mais limpa sem que ela seja capaz de satisfazer as necessidades humanas, econômicas e industriais.

Porém, há que se questionar sobre a sustentabilidade das principais fontes renováveis citadas nos diversos relatórios existentes, como no caso da energia elétrica de

hidroelétricas e dos biocombustíveis de cana-de-açúcar. É notório que a construção de uma usina hidroelétrica (75% da energia nacional - EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA, 2011) é altamente impactante ao ambiente, destruindo áreas florestais, reduzindo áreas agricultu ráveis, deslocando a fauna e gerando gases poluentes derivados da decomposição da matéria orgânica existente no momento em que o reservatório é cheio e durante toda a sua vida útil (LIOR, 2012b).

I.II – BIOCOMBUSTÍVEIS

Biocombustíveis são combustíveis líquidos ou gasosos provenientes de qualquer matéria orgânica renovável como resíduos alimentares, resíduos de vegetais, biomassa de culturas agrícolas, biomassa de cultivos de macroalgas e microalgas, entre outros. A TABELA 1.2 relaciona alguns biocombustíveis e suas origens.

Tabela 1.2 – Alguns Biocombustíveis e suas fontes.

Biodiesel	Óleo	Gordura animal e óleo de planta
Bioetanol	Fermentação do Açúcar ou Amido	Beterraba, Cana-de-açúcar, Milho
Biomassa	Queima da matéria	Madeira ou palha
Biomassa	Queima da matéria	Micro e Macroalgas
Biodiesel	Transesterificação do Óleo	Micro e Macroalgas

Dentre os biocombustíveis existentes no Brasil, os derivados da cana-de-açúcar são os de maior crescimento nas últimas décadas (SOUSA & MACEDO, 2010). O Anuário Estatístico Brasileiro Do Petróleo, Gás Natural E Biocombustíveis (2012) demonstra que a produção de biocombustíveis da cana-de-açúcar tem crescido em todo o País (TABELA 1.3).

Tabela 1.3 – Produção de Etanol nas diferentes regiões do Brasil (fonte: ANUÁRIO ESTATÍSTICO BRASILEIRO DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEI, 2012).

Grandes Regiões e Unidades da	Produção de etanol anidro e hidratado (mil m³)									
	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Região Norte	30,32	39,39	47,53	47,51	75,88	47,66	55,67	51,73	59,71	169,86
Região Nordeste	1518,28	1505,23	1675,49	1695,56	1572,56	1901,72	2.371,62	2.210,50	1822,89	1938,53
Região Sudeste	8.551,82	9.786,64	9.948,40	11.154,24	12.478,67	15.782,23	19.212,33	17.676,39	18.860,06	14.208,83
Região Sul	974,95	1209,45	1178,31	995,67	1308,24	1923,23	1906,00	1901,26	1746,03	1405,64
Região Centro-Oeste	1513,27	1929,26	1797,52	2.146,91	2.328,92	2.902,06	3.587,57	4.263,22	5.714,73	5.169,65

Entretanto se por um lado a cana-de-açúcar tem tido crescimento comercial favorável, por outro as culturas de cana-de-açúcar apresentam impactos ambientais reais significantes que necessitam serem discutidos. Primeiro, há a enorme quantidade de insumos (nitrato/fosfato) que são utilizados nos plantios para tornar o solo mais produtivo, onde é sabido que a utilização de tais compostos pode fazer com que haja um desequilíbrio afetando todos os seres que dependem daquele ambiente (YANG et al., 2011; INTERNATIONAL ENERGY AGENCY**,** 2010). Segundo, há a utilização do fogo como parte do processo de corte da cana para obtenção da matéria-prima vegetal. Sabe-se que quase 70% de todo o CO_2 produzido no Brasil provém de queimadas, sendo assim, esse processo pode agravar ainda mais o quadro de efeito estufa global.

Outro apontamento importante é que muitos defensores dos biocombustíveis da cana-de-açúcar mencionam um equilíbrio na relação de produção/consumo de gases (gases neutros / gases verdes). Porém, alguns estudos demonstram que esta relação não é tão simples e equilibrada (SCOTT et al., 2010). Para o cálculo dos "gases verdes" em geral devem constar diversos dados como os das emissões de gases provenientes da agricultura, através dos diversos usos das máquinas; a produção de óxido nitroso proveniente dos fertilizantes (gás que impacta o efeito estufa); as emissões atmosféricas a partir da energia utilizada para converter a biomassa produzida em biocombustível; e toda a cadeia de transporte da matéria-prima e do combustível (escoamento de produção) depois de sua produção (HOUSE OF COMMONS ENVIRONMENTAL AUDIT COMMITTEE, 2008). Sendo assim, não pode ser feito o cálculo da relação de produção/consumo de gases em apenas um estágio ou parte do processo.

Ainda sobre os impactos gerados, há que se abordar sobre o deslocamento de cultivos de produtos alimentares em áreas importantes de produção agora redirecionadas ao cultivo de cana-de-açúcar (YANG et al., 2011; HOUSE OF COMMONS ENVIRONMENTAL

AUDIT COMMITTEE, 2008; DEMIRBAS, 2011; SCOTT et al., 2010) o que pode agravar ainda mais problemas sociais, indo de encontro ao tripé da sustentabilidade (fatores econômicos, socais e ambientais), além destes cultivos causarem efeitos sobre o ambiente físico e as mudanças do clima (IEA, 2010). Sendo assim, há que se repensar e refletir sobre a sustentabilidade de certos biocombustíveis.

Para que se possa dizer que um combustível é ecologicamente correto faz-se necessário observar toda sua cadeia produtiva, desde a produção e extração da matéria-prima até o produto final e seu escoamento. Isto é o procedimento preconizado nos estudos de Avaliação de Ciclo de Vida (do inglês *Life Cycle Assessment* - LCA). O LCA é uma ferramenta da abordagem de avaliação dos sistemas industriais cujas análises vão do "berço ao túmulo", desde os estudos da coleta de matérias-primas da terra, passando pelos processos de produção até o momento em que todos os materiais são devolvidos a terra como produtos ou resíduos (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2006b).

O LCA permite que se busque uma estimativa dos impactos ambientais resultantes de todas as fases do ciclo de vida de um produto, muitas vezes incluindo impactos não considerados nas análises mais tradicionais (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2006b). Desta forma incluem-se todos os possíveis impactos que podem ser causados no longo ciclo de vida do produto, sendo importante observar os aspectos ambientais do produto ou do processo que podem gerar danos ambientais. Como já citado, alguns biocombustíveis apresentam em alguns dos seus processos ou produtos impactos ambientais que reduzem o seu direcionamento como sustentável.

Sendo assim, há a necessidade de ser buscar fontes energéticas que agridam minimamente ao ambiente. Entretanto esta análise deve ser feita em toda a cadeia produtiva, e as microalgas apontam como uma interessante alternativa de matéria-prima gerando produtos com boa avaliação nesta escala.

As microalgas têm sido objeto de estudo e atraído muita atenção nos últimos anos para a obtenção de produtos naturais, tratamento de efluentes e pelo seu potencial de produção de energia (GREENWELL, 2009; CHISTI**,** 2007).

As microalgas apresentam características fisiológicas semelhantes aos vegetais superiores, podendo crescer praticamente em todo lugar onde há luz solar, CO_2, água, nutrientes e temperaturas moderadas ou controladas. Assim como o milho, a soja, a cana-de-açúcar e os vegetais de produção de madeira, microalgas utilizam a fotossíntese para converter energia solar em energia química, armazenando essa energia sob a forma de óleos, carboidratos e proteínas (DEMIRBAS, 2011).

I.III - BIOCOMBUSTÍVEL DE MICROALGAS: BAIXO CUSTO DE PRODUÇÃO E BAIXO IMPACTO AMBIENTAL.

O termo algas é utilizado para definir organismos fotossintéticos, geralmente se referindo aos organismos eucarióticos – excluindo-se as bactérias fotossintéticas – podendo ser unicelular ou multicelular. São muito diferentes em termos evolutivos, aonde as chamadas algas vermelhas e as algas verdes pertencem a um grupo, enquanto os demais, como diatomáceas, algas marrons e dinoflagelados são evolutivamente distintos. (SCOTT et al., 2010). São normalmente encontradas em locais úmidos ou corpos de água e, portanto, são comuns em ambientes terrestres e aquáticos; como as plantas, as algas exigem basicamente quatro fatores para crescer: luz solar, dióxido de carbono, água e temperatura moderada (DEMIRBAS, 2011).

Microalgas são vegetais inferiores, unicelulares, fotossintéticos com presença de cloroplastos que são os absorvedores de energia luminosa, apresentam diferentes tamanhos e várias aplicações comerciais (ANDERSEN, 2005). São capazes de produzir diversos tipos de proteínas, lipídios e carboidratos em grandes quantidades em um curto período de tempo devido à sua enorme capacidade de fixar e converter CO_2 em biomassa (RIBEIRO, 2012).

A biomassa gerada pode ser processada em biocombustíveis e em produtos químicos de alto valor agregado, podendo ser convertida em biodiesel, bioetanol, bio-óleo, biohidrogênio, biometano via processos bioquímicos, químicos e termoquímicos, tais como, liquefação, pirólise, gaseificação, extração e transesterificação, fermentação e digestão anaeróbica. (RIBEIRO, 2012).

Como já mencionado sobre os possíveis diversos impactos gerados na produção de biocombustíveis, as microalgas apresentam um cenário de redução de alguns possíveis impactos (*SCOTT et al., 2010*). A produção de biocombustível a partir de microalgas é amplamente considerada como uma das formas mais eficientes de utilização de energia para síntese de biocombustíveis e também parece representar uma fonte renovável de óleo que poderia atender indefinidamente a demanda do setor de transportes em qualquer parte do mundo (DEMIRBAS, 2011).

Alguns estudos apontam que a capacidade produtiva de energia dos óleos das microalgas pode ser muito maior do que a correspondente ao melhor óleo oriundo de culturas agrícolas tradicionais (DEMIRBAS, 2011; SUALI & SARBATLY, 2012; RIBEIRO, 2012; SINGH & GU, 2010) o que faria com que os produtos finais de microalgas tivessem uma relação mais positiva no fator ambiental, social e econômico fortalecendo o tripé da sustentabilidade.

As microalgas vêm ganhando interesse no cenário atual devido ao seu potencial na geração de diversos produtos como os carboidratos, proteínas e lipídios, podendo também gerar produtos farmacêuticos, alimentícios e biocombustíveis (biodiesel, biometano, gás de síntese e bioetanol) (RIBEIRO, 2012; SAINI et al., 2011). Mas é fato que para se conseguir gerar o biocombustível microalgal de forma econômica e ambiental é necessário que algumas fases sejam bem conduzidas, como, por exemplo: (i) a seleção da espécie de algas para cultivo; (ii) tipo da separação da biomassa do meio de cultivo; (iii) tecnologia de extração de lipídio celular; e (iv) tecnologia de esterificação (YANG et al., 2011). Em outras palavras, para que se consiga obter um produto final de menor custo financeiro e ambiental é necessário que estudos sejam realizados em todas estas fases visando a determinar: (i) qual o melhor meio de cultivo com as concentrações ideais dos nutrientes, em água salina ou doce; (ii) quais métodos de separação de biomassa do meio de cultivo serão empregados; (iv) se a biomassa gerada será utilizada em gaseificação (produção de SynGas) ou extração de óleo para produção de energia, ou outro processo com outra finalidade; entre tantos outros questionamentos.

Qualquer que seja o tipo de produto (farmacêutico, alimentício ou energético) a ser produzido, as microalgas apresentam pontos positivos associados aos seus cultivos onde pode ser citado:

- Nenhuma geração de gases do efeito estufa por não haver compostos voláteis que possam atingir a camada atmosférica;
- Não há a necessidade de o cultivo ser realizado em solos agricultáveis evitando, assim, a competição com os solos de produção de alimentos;
- O cultivo pode ser realizado em áreas urbanas, industriais, desérticas ou degradadas, desde que tenham exposição solar e temperatura controlada;
- Inexistência de sazonalidade, significando que a produção independe de estações climáticas, regimes de chuvas, ventos, etc; isto é, a produção ocorre de forma estável nos 365 dias do ano;
- Não utilização de defensivos agrícolas;
- Possibilidade da utilização de água tratada proveniente das Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) para o possível cultivo;
- Possível utilização de meio de cultivo salino, reduzindo o uso de água doce;
- Com a utilização de águas salinas algumas contaminações por fungos e bactérias podem ser evitadas;
- Utilização de espécies com baixo valor comercial;
- Utilização de CO_2 - proveniente dos mais diversos processos industriais - com fonte inorgânica de carbono para o crescimento microalgal – gerando crédito de carbono;
- Possível utilização de consórcio microalgal para aumento da produtividade/ rendimento final;
- Reuso do meio de cultivo em reatores e lagoas – com sistemas de ciclo fechado;

Para o cultivo de microalgas podem ser citados inúmeros meios de cultivos, tipos e concentrações diferentes de nutrientes, diversidade de espécies utilizadas, tipos de reatores e tantos outros itens. Cabe ao interessado empreendedor saber o que deve ser escolhido para que suas necessidades de projeto sejam atendidas. De início, tem-se que as microalgas podem produzir mais óleo por kg de massa seca, consumindo menos espaço além de poderem ser cultivadas em terras impróprias para a agricultura e sem depender de sazonalidade (PICARDO, 2012; CHISTI, 2007).

Utilizando-se a biomassa das microalgas em determinados processos/rotas físico-químicos, podem ser gerados diversos produtos que servirão a diversas finalidades, apresentando, é claro, desempenhos diferentes em valores agregados específicos de acordo com a microalga e condições de cultivo. Picardo (2012) apresentou os dados mostrados na Tabela 1.4 que aponta diversos produtos comerciais de microalgas específicas e seus valores possíveis unitários.

Tabela 1.4 – Bioprodutos de alto valor agregado derivados de microalgas. (fonte: PICARDO, 2012)

Produto	Microalga	Preço (USD)	Produtor
β-caroteno	Dunaliella	300-3.000/kg	AquaCarotene (EUA)
			Cognis Nutrition e Health (AUT)
			Nikken Sohonsha Corporation (JAP)
			Tianjin Lantai Biotechnology (CHI)
			Parry Pharmaceuticals (IND)
Astaxantina	Haematococcus	10.000/kg	AlgaTechnologies (ISR)
			Bioreal (EUA)
			Cyanotech (EUA)
			Mera Pharmaceuticals (EUA)
			Parry Pharmaceuticals (IND)
Suplementos alimentares	Spirulina, Chlorella, Chlamydomonas	50/kg	BlueBiotech International GmbH (ALE)
			Cyanotech (EUA)
			Earthrise Nutritionals (EUA)
			Psycotransgenics (EUA)
Ração para peixes	Tetraselmis, Nannochloropsis, Isocrysis, Nitzschia	70/L	Aquatic Eco-Systems (EUA)
			Nannochloropsis, BlueBiotech International GmbH (ALE)
			Isocrysis, Coastal BioMarine (EUA)
			Nitzschia Reed Mariculture (EUA)
Ácidos graxos poliinsaturados	Crypthecodinium, Schizochytrium	60/g	BlueBiotech International GmbH (ALE)
			Spectra Stable Isotopes (EUA)
			Market Biosciences (EUA)
Metabólitos com isótopo pesado para marcação	Informação não disponível	1.000-20.000/g	Spectra Stable Isotopes (EUA)
Ficoeritrina	rodofíceas, cianobactérias	15/mg	BlueBiotech International GmbH (ALE)
			ciano bactérias Cyanotech (EUA)
Drogas anti-câncer	Informação não disponível	Informação não disponível	PharmaMar (ESP)
Proteínas farmacêuticas	Chlamydomonas	Informação não disponível	Rincon Pharmaceuticals (EUA)
Biocombustíveis	Botryococcus, Chlamydomonas, Chlorella, Dunaliella, Neochloris	Informação não disponível	Cellana (EUA)
			GreenFuel Technologies (EUA)
			LiveFuels, Inc. (EUA)
			PetroAlgae (EUA)
			Sapphire Energy (EUA)
			Solazyme, Inc. (EUA)
			Solix Biofuels (EUA)

Mas é claro que há a necessidade que se avancem ainda mais os estudos sobre a viabilidade energético-econômica do bioproduto em questão, buscando-se o projeto ótimo e construção de fotobiorreator em escala industrial, com criteriosa seleção dos aspectos de processo citados (cepas, meios e condições de cultivo, controle de contaminações, tecnologia de separação de biomassa, extração de óleo e/ou bioprodutos nobres, etc). Isto obriga que os estudos saiam da escala de bancada e passem a escalas piloto/semi-industriais.

I.V OBJETIVOS

I.V.I – GERAL

O objetivo geral é a avaliação quantitativa de algumas alternativas tecnológicas de separação de biomassa da microalga *Isochrysis galbana* do meio de cultivo, buscando-se a minimização de geração de resíduos, maximização de reciclagem de meio aquoso e minimização de utilização de reagentes químicos (ácidos, bases e íons metálicos pesados).

I.V.II – ESPECÍFICOS

- Implementação experimental da submissão de culturas de *Isochrysis galbana* a quatro fatores capazes de gerar separação das células do meio de cultivo dependendo do tempo de exposição, a saber Concentração de NaOH, Temperatura, RPM de Centrifugação e Intensidade de Irradiância;
- Avaliação quantitativa dos desempenhos dos fatores acima atuando de forma cruzada com o tempo de exposição ou cruzada em pares (por exemplo, Concentração NaOH com RPM de Centrifugação) sob tempo de exposição fixo (por exemplo, 1 min);
- Análise estatística via modelos de Superfícies de Resposta para o desempenho cruzado de pares de fatores acima (por exemplo, Concentração NaOH com RPM de Centrifugação) sob tempo de exposição fixo;

CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.I – CO_2 E A BIOFIXAÇÃO EM MICROALGAS COMO MECANISMO DE MITIGAÇÃO DE EMISSÕES.

O carbono é o alicerce de todas as formas de vida na terra abrangendo uma grande diversidade de compostos orgânicos e inorgânicos, apresentando um ciclo biogeoquímico complexo e de importante circulação das várias formas de carbono entre a atmosfera, hidrosfera, litosfera e biosfera (SAINI et al., 2011). O carbono pode ser encontrado de forma natural nos alimentos, nas reservas energéticas (petróleo), nos processos fotossintéticos e quimiossintéticos, e de forma industrializada nos produtos plásticos, elastômeros, farmacêuticos e de beleza e tantos outros processos e produtos apresentando diferentes valores ambientais e comerciais.

O CO_2 é a principal espécie inorgânica de carbono, sendo largamente produzido na biosfera pelos seres vivos e pelos processos industriais e tecnológicos da sociedade humana. Em contrapartida, este gás é absorvido pelos diversos ambientes naturais fotossintéticos como as florestas, os campos, as plantações e os oceanos. Mas são os oceanos os grandes responsáveis pela principal absorção de CO_2 atmosférico via ciclo natural do carbono (PICARDO, 2012). A forma inorgânica CO_2 é a principal fonte de carbono para os seres autótrofos, em especial, que são capazes de transformá-lo em biomassa orgânica. O carbono utilizado pelos seres autotróficos pode ser biofixado e convertido em reserva energética (óleos e açúcares), estar presente nas mais diferentes estruturas celulares (celulose estrutural, celulose foliar, paredes celulares e cloroplastos), ajudar no funcionamento fisiológico celular (fotossíntese e respiração celular), entre outros. Logo, pode ser percebido que há um importante valor ambiental dos compostos carbônicos nos ambientes naturais.

Contudo, há outro lado que deve ser abordado e analisado pela mesma relação que é distribuição natural do carbono no ambiente. Sabe-se que as concentrações de alguns compostos carbônicos, de origens naturais ou antrópicas, podem trazer diversos malefícios ao ambiente se estiverem em falta ou em excesso, causando graves e contínuos problemas em seus ciclos. Gases como o dióxido de carbono (CO_2), o metano (CH_4), o monóxido de carbono (CO) e os compostos orgânicos voláteis podem trazer preocupações ambientais se estiverem em excesso, causando ou interferindo no aumento do aquecimento global. Já

outros compostos produzidos pelo homem podem trazer problemas ambientais de natureza diversa como a destruição da camada de ozônio caso sejam liberados na atmosfera, como é o caso dos compostos CFC (Cloro-Flúor-Carbono) (INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE, 2007; HOUSE OF COMMONS ENVIRONMENTAL AUDIT COMMITTEE, 2008).

O aquecimento global é um dos principais problemas ambientais da atualidade e os crescentes níveis de dióxido de carbono (CO_2) na atmosfera – ainda que questionáveis os valores de sua concentração real por diversos estudos – estão incrementando este problema. Neste contexto, direcionar o uso de alguns gases – em especial o CO_2 – para a o aumento de biomassa parece ser uma solução importante, bastante viável e ecologicamente correta (SINGH & GU, 2010; ZHAOA, et al., 2011; YANG et al., 2011).

O aquecimento global é expresso como o aumento médio na temperatura da atmosfera na superfície da Terra e na troposfera, o que pode contribuir para mudanças nos padrões climáticos globais naturais, sendo proveniente de uma variedade de causas, tanto naturais como induzidas pelo homem. O termo também pode ser usado em referência ao aquecimento planetário que pode ocorrer como resultado de aumento das emissões de gases de efeito estufa pelas atividades humanas.

Segundo o Relatório de Mudanças Climáticas do Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas – do ano de 2007 (INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE, 2007) – o dióxido de carbono (CO_2) é apontado como o mais influente gás do efeito estufa (do inglês *GreenHouse Gases* – GHG), cujas emissões anuais têm crescido muito entre 1970 e 2004 (aproximadamente 80%), perfazendo 77% do total das emissões humanas de GHG como mostrado na Fig. 2.1. Constata-se ainda outro ponto de extrema importância no relatório como os dados que indicam a alta produção de CO_2 proveniente da queima dos combustíveis fósseis (representando mais de 50% dos GHG em 2004), além da produção de CH_4 na agricultura, energia e resíduos, corroborando os impactos mencionados na Seção I.I.

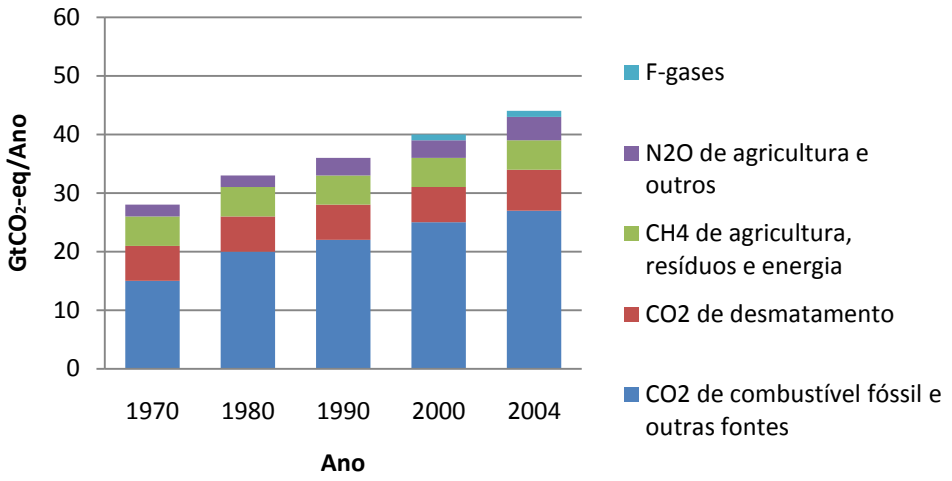

Figura 2.1 – Emissão de gases do efeito estufa de origem antrópica de 1970 e 2004 (Fonte: INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE, 2007).

Biofixação de CO_2 pelas culturas massivas de microalgas representa um grande avanço tecnológico e que tem influência direta na relação dos gases do efeito estufa, já que há a utilização de um CO_2 proveniente das atividades humanas e de processos naturais sendo direcionadas para a conversão de microalgas em biocombustíveis renováveis (DEMIRBAS, 2011). A biomassa formada por meio da biofixação de CO_2 microbiana pode ser uma importante solução para redução dos níveis de CO_2 na atmosfera, podendo ser usado para a produção de bioenergia, biodiesel microbiano e até mesmo plástico biodegradável (SAINI et al., 2011).

Alguns estudos demonstram o quanto o CO_2 pode ser convertido em biomassa gerando resultados interessantes, como o estudo feito por Chisti (APPUD SINGH & GU, 2010), onde apontou que 1kg de biomassa de algas secas seria capaz de fixar 1.83kg de CO_2, assim, a produção de biomassa de microalgas pode ajudar na biofixação de CO_2 auxiliando na manutenção da qualidade e melhoria do ar. Suali & Sarbatly (2012) fizeram um importante levantamento de revisão bibliográfica sobre a influência da biofixação de CO_2 no crescimento em diversas espécies de algas, obtendo relevantes e diferentes concentrações celulares.

Desta forma, a fixação biológica de dióxido de carbono através de microalgas parece fornecer uma forma de solução para os problemas que surgem devido ao aquecimento

global oriundo do excesso de CO_2 gerado pelas indústrias, bem como medida auxiliar sobre um possível esgotamento de combustíveis fósseis futuramente. Demirbas (2011) apresentou um quadro explicativo em que idealiza um possível ciclo de carbono atmosférico em um mundo com produção de energia essencialmente via biofixação algal (Figura 2.2).

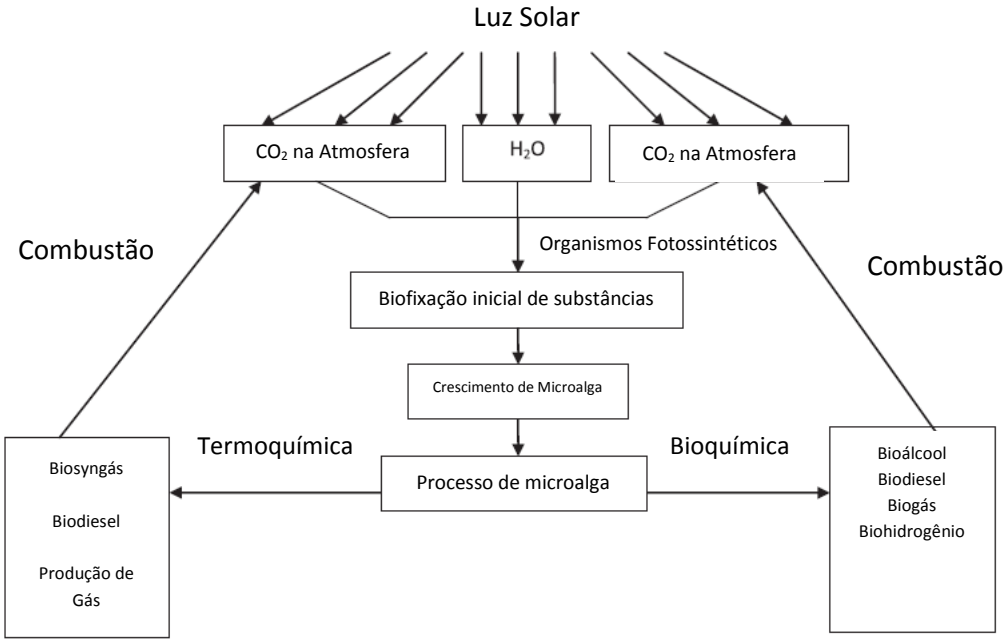

Figura 2.2 – Ciclo de Carbono Atmosférico em Contexto de Tecnologias de Microalgas (fonte: Demirbas, 2011).

As tecnologias baseadas em algas podem fornecer alternativa para reduzir as emissões de gases de efeito estufa a partir de plantas termelétricas a carvão e outros processos industriais intensivos em carbono fóssil (DEMIRBAS, 2011). Isto faria com que as atividades já iniciadas e consolidadas não precisassem ser interrompidas evitando-se uma perda econômica considerável. Portanto a sustentabilidade seria ainda mais fortalecida já que, além dos processos de cultivo de biomassa algal fornecer energia renovável, ainda são capazes de sequestrar dióxido de carbono atmosférico proveniente das demais atividades industriais, de produção de energia e de transporte.

A relação de produção e consumo ambiental de CO_2 deve ser encarada como uma das mais importantes relações a serem estudadas e observadas pelo homem. É notório que o CO_2 não é o GHG que apresenta o maior potencial destrutivo ao ambiente, mas é o que

apresenta maiores valores de concentrações atmosféricas (INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE, 2007, DEMIRBAS, 2011, EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA, 2011; SAINI et al., 2011), onde as atividades humanas têm um papel influente. À medida que a concentração de CO_2 aumenta no ambiente, as respostas dos diversos organismos também são diferentes. Ter um ambiente com excesso de CO_2 não quer dizer que seja sempre muito bom aos vegetais, pois se deve lembrar que há fases de consumo e fases de produção natural deste gás. Logo, o que deve haver é um equilíbrio nas concentrações iniciais gerais e o quanto é consumido e convertido em biomassa vegetal; isto é, há a necessidade de equilíbrio do *input*, consumo e *output*.

As microalgas são promissoras como fontes de biodiesel a partir da biomassa algal. Biodiesel produzido através de transesterificação de óleos de algas foi provado ser uma alternativa promissora para a recuperação de energia presente nas algas. Huang (APPUD DEMIRBAS, 2011) apresentou um panorama da produção de biodiesel via biotecnologias de microalgas, incluindo os vários modos de cultivo para a produção de óleo. A forma como o cultivo das algas é realizado tem influência direta nas respostas fisiológicas tanto de crescimento, como no consumo dos nutrientes e na geração dos produtos de interesse. As microalgas captam e utilizam a energia solar para oxidar H_2O, liberando O_2, reduzindo CO_2, produzindo compostos orgânicos, primariamente açúcares. Esta energia estocada nas moléculas orgânicas é utilizada nos diversos processos celulares e serve como fonte de energia para todas as formas de vida – sejam as próprias plantas ou os consumidores primários.

É na membrana tilacóide que se apresentam os pigmentos fotossintetizantes responsáveis pela absorção de toda a energia luminosa, ocorrendo a chamada etapa biofísica ou as reações luminosas da fotossíntese. Enquanto que é no estroma que está configurado todo o aparato bioquímico necessário para que a assimilação de CO_2 ocorra através das chamadas reações de carboxilação da fotossíntese (Ciclo de Calvin) (PICARDO, 2012).

Os cloroplastos, organelas circundadas por uma dupla membrana, possuem o pigmento verde clorofila o qual é extremamente especializado. É nos cloroplastos que a luz do ambiente é absorvida por duas diferentes unidades funcionais, conhecidas como

fotossistemas I e II. A energia da luz absorvida é utilizada para impulsionar a transferência de elétrons através de uma série de compostos que agem como doadores e aceptores de elétrons (PICARDO, 2012).

II.II – FOTOBIORREATORES E LAGOAS *RACEWAYS*

O custo de investimento para um projeto de crescimento de biomassa algal pode ser dividido em duas partes importantes: custos associados com o crescimento da biomassa e os custos com os sistemas utilizados para a extração de óleo. Além disso, há os custos do projeto de engenharia, da instalação da planta, e da operação (nutrientes, CO_2, reposição de água devido a perdas por evaporação, substituição de componentes) (SINGH & GU, 2010). Sendo assim, há que se buscar um sistema operacional onde todos os pontos sejam eficazmente monitorados, medidos e controlados para que toda cadeia produtiva não seja afetada ou, se for afetada, que seja minimamente.

Corroborando com o que foi mencionado acima e na Seção I.III, Lam & Lee (2012) apontaram que para uma produção eficiente de biomassa algal é necessário que alguns pontos importantes sejam alcançados no sistema de crescimento, sendo estes: (i) área com iluminação eficiente (*effective illumination area*), (ii) ótima transferência na relação gás-líquido (*optimal gas–liquid transfer*), (iii) de fácil operação (*easy to operate*), (iv) baixo nível de contaminação (*low contamination level*), (v) baixos valores de investimento inicial e na produção (*low capital and production cost*), e (vi) que necessite de menor área de uso (*minimal land area requirement*).

Atualmente existem dois grandes sistemas de crescimento de microalgas: as lagoas abertas do tipo *raceways* e os fotobiorreatores. As lagoas *raceways* são feitas com um canal de recirculação do meio em circuito fechado que apresenta, tipicamente, poucos centímetros de profundidade (PICARDO, 2012; CHISTI**,** 2007; LAM & LEE, 2012). A mistura e a recirculação do meio são produzidas por uma roda de pás, que vão ser direcionado de acordo com o formato das curvas do canal de circulação e, assim, evitando a sedimentação. Os canais por onde passam o meio podem ser construídas em concreto ou terra

compactada, e podem ser revestidos com plástico impermeável (CHISTI, 2007). As Figuras 2.3 e 2.4 demonstram exemplos de lagoas *raceways*.

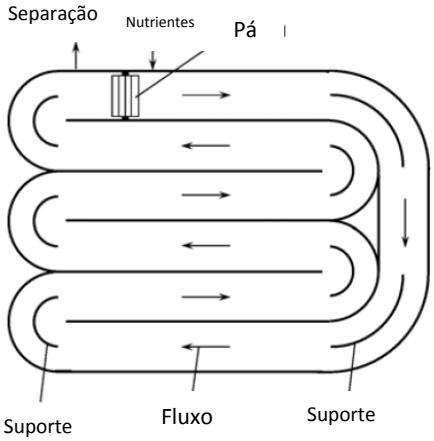

Figura. 2.3 – Esquema de *Raceway* (fonte: CHISTI, 2007)

Figura 2.4 – Lagoas *Raceways* de Microalgas (Fonte: http://www.ieaghg.org/index.php?/2009120761/greenhouse-issues-december-2005-number-80.html - Acessado 16/10/2012 às 09:28h)

Os fotobiorreatores são sistemas fechados, que consistem de uma série de tubos/placas transparentes (sendo feitos de plástico ou de vidro), geralmente com 0,1 m ou menos de diâmetro para facilitar a penetração da irradiação solar em culturas densas (assegurar uma produtividade elevada de biomassa), sendo diferente das lagoas *raceways*, onde o sistema permite o cultivo de culturas com uma única espécie em tempos prolongados (CHISTI, 2007). De acordo com a tecnologia utilizada para a construção do sistema, os fotobiorreatores apresentam mais vantagem quanto ao aproveitamento da irradiação solar (aumentando a eficiência e produtividade fotossintética) e diluição dos gases (através de sistemas como o *air-lift* - ar comprimido e CO_2) (PICARDO, 2012).

O formato do fotobiorreator é calculado de forma que a captação e absorção de luz solar, por parte das células, seja maximizada, podendo assim o arranjo dos tubos ser horizontal ou vertical, circular ou retilíneo (CHISTI, 2007; SUALI & SARBATLY, 2012). Seguem abaixo as Figuras 2.5 e 2.6 que demonstram esquemas de possíveis fotobiorreatores em arranjos do tipo tubular.

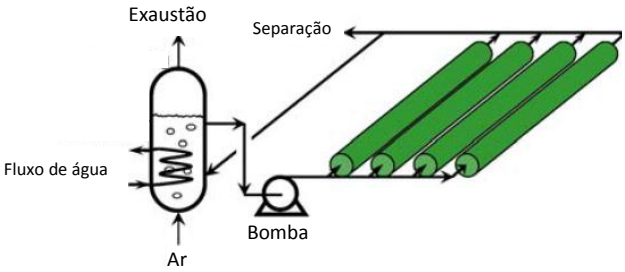

Figura 2.5 – Fotobiorreator com Tubos Paralelos Horizontais (fonte: CHISTI, 2007)

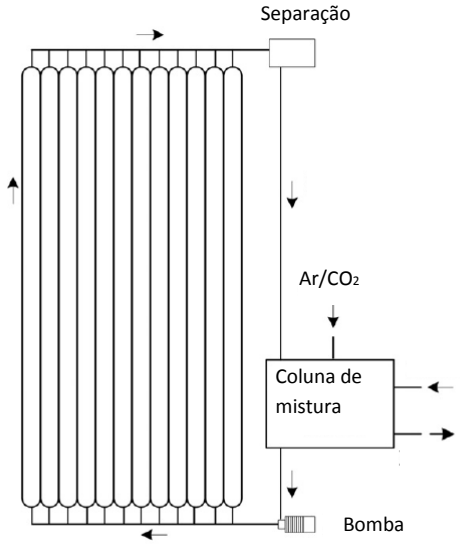

Figura 2.6 –Fotobiorreator com Arranjo Vertical de Tubos em *Air-Lift* (fonte: SUALI & SARBATLY, 2012)

A Tabela 2.1 relaciona as principais diferenças e características das lagoas e fotobiorreatores apresentados acima.

Tabela 2.1 - Principais diferenças e características das lagoas e fotobiorreatores.

Fator	Lagoas	Fotobiorreator	Fonte:
Custo de construção	Baixo	Alto	PICARDO, 2012; HARUN et al., 2010; SINGH & GU, 2010.
Produtividade de biomassa algal	Baixa	Alta	PICARDO, 2012; HARUN et al., 2010; SINGH & GU, 2010; SCOTT et al., 2010; DEMIRBAS, 2011.
Controle sobre os parâmetros ambientais	Baixo	Alto	PICARDO, 2012; HARUN et al., 2010; PARMAR et al., 2011.
Contaminação do meio de cultivo	Alto	Nenhum	PICARDO, 2012; HARUN et al., 2010; SCOTT et al., 2010.
Perda do uso de CO2	Alta	Baixa	PICARDO, 2012; HARUN et al., 2010; SCOTT et al., 2010.
Necessidade de grandes áreas	Alta	Baixa	PICARDO, 2012; HARUN et al., 2010; SCOTT et al., 2010.
Rearranjo do reator de acordo com as necessidades do projeto	Pouco viável	Altamente viável	CHISTI, 2007; HARUN et al., 2010.
Reaproveitamento da biomassa	Baixa	Alta	PICARDO, 2012; HARUN et al., 2010.
Necessidade de grandes áreas para o cultivo	Sim	Não	PICARDO, 2012; HARUN et al., 2010; SINGH & GU, 2010.
Produção com fins alimentícios	Sim	Sim	PICARDO, 2012; HARUN et al., 2010; SINGH & GU, 2010; CHISTI, 2007.
Alta produtividade em culturas com uma espécie	Baixa	Alta	CHISTI, 2007; HARUN et al., 2010; PARMAR et al., 2011.
Concentração de oxigênio	Baixa	Alta	HARUN et al., 2010.

Singh & Gu (2010) fizeram um importante levantamento de produção de diferentes microalgas usadas por diversas empresas de todo o mundo, observando que 52% das produções usaram técnicas de sistemas fechados, 25% de lagoas abertas e 22% de ambientes naturais, como mostrado na Fig. 2.7.

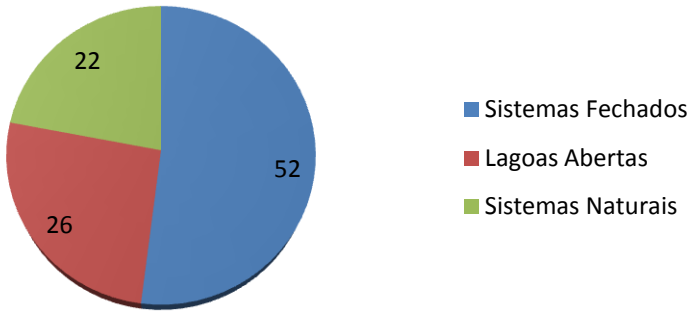

Figura 2.7 – Distribuição Mundial de Diferentes Técnicas para Cultivo Microalgal (fonte: SINGH & GU, 2010)

Como o cultivo em sistemas abertos, como as lagoas, é mais antigo, pode-se perceber na Fig. 2.7 que há uma tendência para se cultivar microalgas em sistemas fechados (fotobiorreatores), que apresentam maior potencial de controle/monitoramento e produtividade (SINGH & GU, 2010).

II.III – SEPARAÇÃO DA BIOMASSA: O GARGALO DA PRODUÇÃO INDUSTRIAL MICROALGAL

O sistema de produção de biomassa utilizado em fotobiorreatores apresenta três fases básicas: (i) *upstream process* (fase de tratamento da matéria-prima, preparação e esterilização do meio de cultivo e nutrientes, inoculação); (ii) crescimento celular; e (iii) *downstream process* (separação das células do meio de cultivo, extração e purificação do produto) (Figura 2.8). Cada fase vai apresentar uma característica específica que vai ser modificada de acordo com o volume total utilizado na produção nos fotobiorreatores, a célula cultivada, o ambiente de crescimento (estrutura do reator), entre outros pontos (CHISTI, 2007; PARMAR et al., 2011).

Nas duas primeiras etapas (i e ii) alguns pontos necessitam serem observados e medidos com precisão, como, por exemplo, a vazão, a temperatura do meio de cultivo, a velocidade de agitação do meio de cultivo, a aeração, o pH, volume de possíveis gases injetados entre tantos outros. Cada item deve ser mensurado e controlado para que todo o processo de crescimento algal ocorra de forma o mais eficiente possível – ambientalmente e economicamente (PARMAR et al., 2011).

A última fase (iii) pode ser encarada como um gargalo dentro da produção industrial de microalgas, que se não for muito bem estudada e projetada apresentará diversos problemas ambientais e operacionais que em última análise significarão custos. A seleção dos processos de obtenção de biomassa, nesta fase, depende do tipo de matéria-prima de cultivo e no produto desejado (PARMAR et al., 2011; DEMIRBAS, 2011).

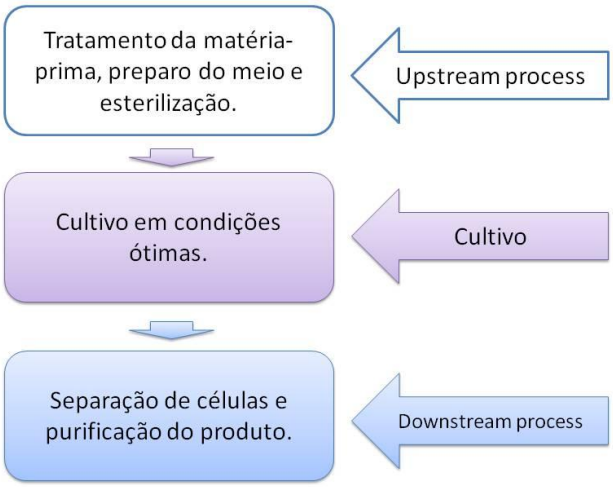

Figura 2.8 – Esquema com as principais fases em um sistema de produção de microalgas.

Após o cultivo, podem ser utilizadas diversas formas para a separação das células do meio de cultivo, porém cada um vai apresentar pontos negativos e pontos positivos. Pode-se dizer que microalgas podem ser separadas utilizando telas, técnicas de sedimentação, centrifugação, floculação e filtração por membrana (AHMAD et al., 2011; LAM & LEE, 2012; AMER et al., 2011), e que cada técnica empregada apresenta uma diversidade de características, concentrações, tamanhos, volumes e custos unitários.

Entende-se por separação celular qualquer técnica utilizada para separar as células (biomassa) do meio onde está ocorrendo o crescimento/cultivo. Podem-se dividir as técnicas

de separação em três grupos: física, química e biológica. Estas técnicas vão agrupar ou repelir as células de alguma forma, fazendo com que haja duas fases – uma com concentrado celular e outra com baixa concentração celular. Cada tipo de separação vai acarretar um gasto energético, tempo de reação e custo específicos.

As separações físicas utilizam fatores físicos, como exemplo, a força gravitacional, a temperatura, irradiância e pressão. As separações químicas ocorrem quando há emprego de compostos químicos que vão reagir com as estruturas celulares e/ou com o meio de cultivo, e que é chamada de floculação química (PARMAR et al., 2011; HARUN et al., 2010). As separações biológicas ocorrem quando um micro-organismo é adicionado ao meio de cultivo como coadjuvante na agregação celular acarretando a separação/sedimentação. Alguns estudos apontam que separação biológica utilizando espécies diferentes pode aumentar as concentrações de células separadas em comparação com testes de autofloculação (SALIM et al., 2012). Mas vale apontar que os próprios estudos reportam dados ainda muito abaixo do desejado relativos à eficiência de separação celular.

A floculação é um termo utilizado para explicar o processo que é usado para acumular células de microalgas a partir do meio de cultivo. As microalgas caracterizam-se por possuírem carga elétrica negativa em sua membrana que as impede de auto-agregação dentro do meio de cultivo. A carga de superfície nas algas pode ser anulada através da adição de produtos químicos conhecidos como floculantes, sendo estes produtos químicos capazes de “flocular” as algas sem afetar muito a composição e toxicidade do meio de cultivo (PICARDO, 2012; HARUN et al., 2010; SÁNCHEZ et al., 2012).

As técnicas mais empregadas na colheita das microalgas são decantação, flotação, centrifugação e filtração. Estas técnicas são auxiliadas pela floculação das células, seja por adição de agentes químicos floculantes ou por autofloculação. Na floculação, as células se aproximam formando agregados celulares, que decantam mais rapidamente por gravidade ou por aceleração (centrifugação) (PICARDO, 2012; DEMIRBAS, 2011; AMER et al., 2011)

Apesar da floculação química ser uma técnica mais simples de ser executada para separação de microalgas (LAM & LEE, 2012), envolve a utilização de produtos químicos no processo o que pode significativamente acarretar custos e descarte de meio de cultivo

tratado, o que pode ser ruim para a economia do processo e perigoso para o meio ambiente (HARUN et al., 2010).

Cabe então a busca por técnicas onde se alcance eficiência na separação biomassa x (versus) meio de cultivo, porém com baixo, ou mínimo, dano ambiental possível. Não adianta se ter uma técnica com altos valores de eficiência, mas que cause dano ou que se necessitem de tratamentos pós-processo.

III - MATERIAL E MÉTODOS

III.I – FOTOBIORREATOR E CONDIÇÕES DE CULTIVO

III.I.I CRESCIMENTO CELULAR E MATERIAL BIOLÓGICO

A espécie utilizada para o presente estudo foi a *Isochrysis galbana* Parke 1949, sendo uma microalga de comprimento entre 5-6 µm, apresentando dois flagelos para locomoção (de aproximadamente 7 µm cada um), cloroplastos simples e de coloração amarelo-marrom, de ocorrência na costa do Atlântico, com clorofilas a e c (TOMAS, 1997). Sua classificação taxonômica é: Domínio: Eukarya, Império: Eukaryota, Reino: Chromista, Subreino: Euchromista, Divisão: Haptophyta, Classe: Prymnesiophyceae, Ordem: Isochrysidales, Gênero: Isochrysis, Espécie: Isochrysis galbana (FALKOWSKI & RAVEN, 2007 apud PICARDO, 2012).

III.I.II MEIO DE CULTIVO

O meio de cultivo utilizado para o crescimento microalgal parte de um meio preparado com sal sintético (Sal Marinho - *Ocean Fish* - Prodac) na concentração de 33g/L com água destilada e deionizada. O meio é posteriormente filtrado em membrana de 0,22µm e autoclavado a 120°C durante 30 minutos. Após a execução destas etapas toda a manipulação para introdução de uma alíquota de volume pré-definido de células foi realizada em capela de fluxo laminar, previamente esterilizada.

Os nutrientes utilizados para o crescimento celular foram dosados com base no meio F/2 Guillard (GUILLARD, 1975) demonstrado na Tabela 3.1, todavia, o meio foi modificado por não ter sido utilizado o composto de silicato.

Tabela 3.1: Concentrações dos Compostos do Meio de Cultura (meio f/2, sem o uso de silicato) (Fonte: PICARDO, 2012).

Macronutrientes	µM
NaNO3	880,0
NaH2PO4.2H2O	36,2

Quelantes	µM
Ácido cítrico	21,40
Citrato férrico	13,45

Metais traço	nM
CoCl2.6H2O	47
CuSO4.5H2O	40
MnCl2.4H2O	910
NaMoO4.H2O	26
ZnSO4.7H2O	75

Vitaminas	nM
Biotina	2,0
Cianocobalamina (B12)	0,4
Tiamina HCl	300,0

Devido ao fato de serem realizados muitos procedimentos e testes, houve uma necessidade de ser criar uma curva padrão para que a concentração celular fosse obtida a partir da medida de absorbância celular (750 nm) em espectrofotômetro (Espectrofotômetro Modelo U2M - QUIMIS). Para que a curva fosse criada foi necessária a utilização de microscopia ótica (BIOVAL, L1000) - para a contagem de células - associada às medições de absorbância (750nm). A concentração celular em cada cultivo foi medida da seguinte forma: (i) foram retiradas alíquotas com 3 mL; (ii) adicionado 25 µL de lugol acético; (iii) sendo a contagem em microscopia realizada na câmara de Fuchs-Rosenthal.

A curva de calibração de concentração celular versus absorbância a 750nm corresponde à equação mostrada na Fig. 3.1, cuja construção ocorreu de acordo com o seguinte procedimento: (i) Medidas de absorbância foram colhidas a 750nm em várias concentrações celulares; (ii) Equação linear y = 0.0181 + 6.10^{-8}.x foi ajustada, onde "x" é o número de células (por mililitro) final e "y" é o valor da absorbância medida. O valor de R^2 desta regressão foi de 0,961.

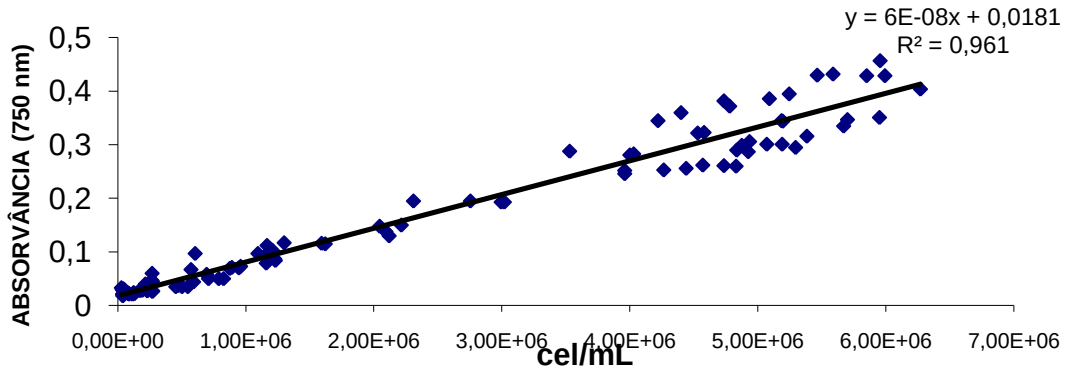

Figura 3.1 - Curva de Calibração de Concentração Celular em cel/mL (x) versus Absorbância a 750nm (y).

Para que fosse possível obter a biomassa desejável, foi realizado um pré-crescimento celular em "erlenmeyers" de dois litros fazendo-se com que a concentração celular chegasse aos 10 milhões de células por mililitro (concentração desejada para início do crescimento em reator com injeção de CO_2), sendo a aeração realizada através de bombas de aquário (800 $cm^3.min^{-1}$). Após o pré-crescimento ter chegado à concentração desejada, que ocorriam em média após 10 dias, as células eram transportadas para um reator (Figuras 3.2 e 3.3) de volume de 2 litros, onde era feita um segundo crescimento altamente controlado com a injeção de mistura de ar comprimido com dióxido de carbono (CO_2).

A taxa de ar comprimido foi estimada com o uso de um rotâmetro de gás (MORIYA, 0-15 $L.min^{-1}$), já a vazão do gás CO_2 foi controlada pelo controlador CD600 (SMAR) e em conjunto com um controlador de vazão mássica (*mass flow controller*, AALBORG, 0-200 $mL.min^{-1}$). A temperatura foi mantida entre 25-26°C utilizando-se um banho termostático com circulador e controle automatizado de temperatura (Modelo Q214M2, QUIMIS). A circulação da água de resfriamento foi feita através de mangueiras em um tubo em aço de formato em U, em direto contato com o cultivo.

Figura 3.2 - Fotobiorreator para o crescimento de microalgas.

Figura 3.3 – Interior do fotobiorreator e demonstração da disposição das lâmpadas e câmara de vidro de células.

A injeção de gás carbonatado ocorria por 6 horas diárias, iniciando-se, geralmente, às 8 da manhã e terminando às 14 horas da tarde, sendo desligados os controladores CD600 e o de vazão mássica. A injeção de gás foi realizada através de ar comprimido com um fluxo de 2L/min. O controle de iluminação foi executado através da utilização de temporizadores (12 horas de luz e 12 horas de escuridão). A medição da variação de pH, devido à injeção de mistura (ar comprimido + CO_2), foi conduzida pelo aparelho modelo pH300 - ANALYSER.

A relação da quantidade ideal (%) de CO_2 injetada com a concentração celular foi testada, previamente, por Eismann (2011), onde foi observado que seria recomendado iniciar utilizando-se valores menores de 1% de mistura de CO_2 para cultivos de aproximadamente 8-10x10^6 cels/mL, de forma que não houvesse acidificação excessiva causando a lise celular. Sendo assim, injetou-se 0,70% (+/- 0,05) de CO_2 na mistura com ar comprimido, sendo este valor sempre mantido independentemente da concentração celular.

Os cultivos no fotobiorreator ocorriam durante oito dias contínuos para que uma biomassa de concentração desejável fosse alcançada em g/L, correspondendo ao valor de 70x10^6 céls/mL. A Fig. 3.5 resume toda a sequência de etapas conduzidas para preparo dos cultivos de microalga utilizados neste trabalho.

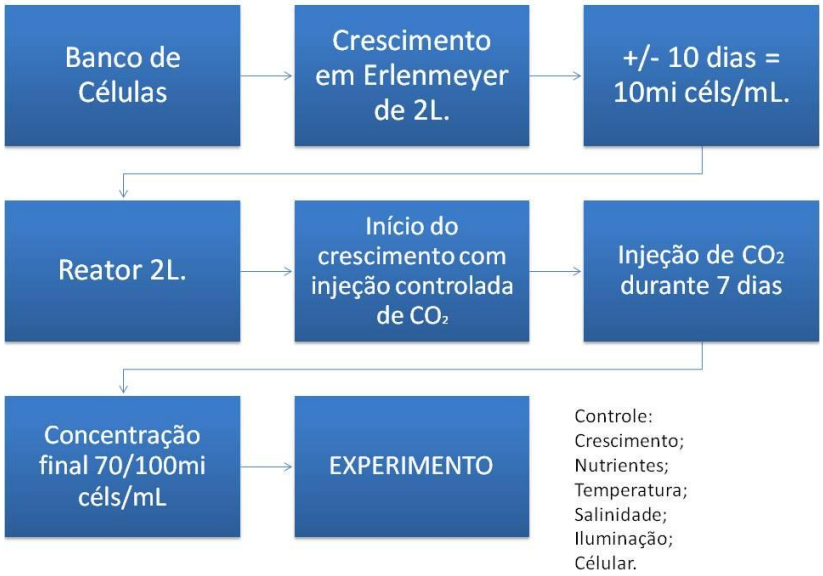

Figura 3.4 – Esquema de Desenvolvimento do Crescimento Microalgal em Fotobiorreator neste Trabalho.

III.I.III ANÁLISE DE NITRATO RESIDUAL

O nitrato residual do meio de cultivo foi medido utilizando-se espectrofotômetro seguindo-se o método de Collos et al. (1999) conforme as seguintes etapas: (i) Amostras do meio de cultivo foram coletadas e filtradas sob vácuo em membrana de celulose 0,45µm de porosidade; (ii) O filtrado foi recolhido e adicionou-se 30µL de HCl 1M; (iii) Leitura de absorbância foram realizadas a 220nm e 275nm, sendo os valores obtidos em 220nm correspondentes a nitrato e os a 275nm correspondentes a nitrogênio orgânico; (iv) A absorvância final é dada pela equação: $ABS_{Final} = ABS_{220} - 2ABS_{275}$. O ensaio em branco foi feito com água destilada com 30 µL de HCl 1M.

Uma curva de calibração padrão foi ajustada linearmente com ensaios utilizando-se com concentrações de 0 a 0,16 mM de nitrato de potássio como mostrado na Fig. 3.6. Esta curva é a ferramenta utilizada para as medições de nitrato residual no meio de cultivo.

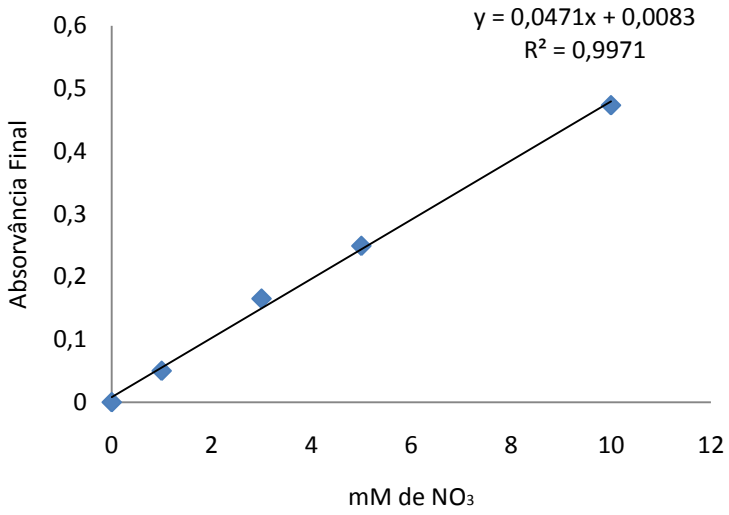

Figura 3.5 – Curva de Calibração de Absorbância (y) versus Concentração de Nitrato (x)

III.I.IV ANÁLISE DE FOSFATO RESIDUAL

O fosfato residual foi medido utilizando-se procedimento espectrofotométrico seguindo-se o método padronizado para o exame de águas e águas residuais (STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER, 1960). As seguintes soluções foram utilizadas para a análise:

Solução de Ácido Forte – Adiciona-se 150mL de ácido sulfúrico concentrado (H2SO4) em 300mL de água destilada. Após resfriamento, adiciona-se 2,0mL de HNO3 concentrado e afere-se em balão volumétrico de 500mL.

Solução de ácido forte e molibdato de amônia – Preparada com o seguinte procedimento:

a) dissolve-se 15,7g de (NH4)6Mo6O24.4H2O em 100mL de água destilada;

b) adiciona-se 126mL H2SO4 conc. em 200mL de água destilada. Após resfriar, adiciona-se 1,7mL de HNO3 concentrado;

c) misturam-se as soluções (a) e (b) e afere-se em balão de 500mL.

Solução de amino - naftol ácido sulfônico – Preparada com o seguinte procedimento:

- Pesa-se 0,375g de 1 amino-2-naftol-4-ácido sulfônico;
- Pesa-se 21g de sulfito de sódio anidro (Na2SO3);
- Pesa-se 35g de metabissulfito de sódio anidro (Na2S2O5);
- Mistura-se ácido sulfônico com pequena porção de Na2S2O5, em recipiente limpo e seco;
- Dissolve-se o restante dos sais em 400mL de água destilada;

• Adicionam-se os sólidos anteriormente misturados e afere-se em balão volumétrico a 500mL.

Para as medidas de fosfato seguiu-se o procedimento: (i) Alíquota da cultura é retirada e filtrada a vácuo em membrana de celulose 0,45 µm de porosidade; (ii) Adicionado 10mL da amostra (em alguns casos foi necessário fazer a diluição) a 0,5mL de ácido com molibdato e agita-se vigorosamente em vórtex; (iii) Adicionado 0,5mL de ácido sulfônico e agitado novamente; (iv) Aguarda-se 5min para que a reação seja completada; (v) Lê-se a absorbância das amostras em espectrofotômetro (Espectrofotômetro Modelo U2M - QUIMIS) a 690nm. O teste em branco foi feito com água destilada seguindo-se o mesmo tratamento, porém o ácido com molibdato sendo substituído pela solução de ácido forte. Uma curva de calibração foi ajustada com leituras de absorbância partindo-se de soluções de NaH_2PO_4 em concentrações entre 1 a 15 mg.L-1 como mostrado na Figura 3.7. Esta curva será utilizada para as medições de fosfato no meio de cultura.

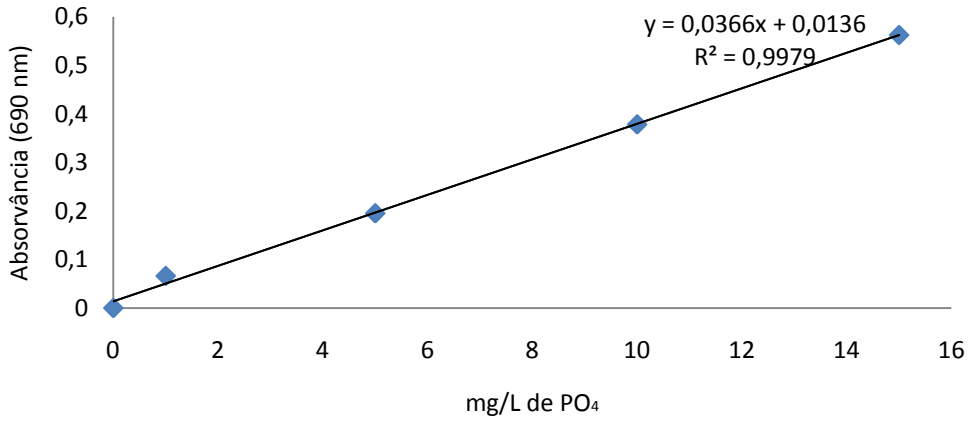

Figura 3.6 – Curva de Calibração de Absorbância (y) versus Concentração de Fosfato (x)

Visando a determinar-se em qual momento seria necessário repor os nutrientes, tanto no reator quanto nos bancos de células, as medidas de nitrato e fosfato foram realizadas em todos os dias de cultivo. Como o consumo de nutrientes no reator era sempre mais rápido do que no banco de células (este sem injeção de CO_2) criou-se o seguinte padrão de reposição nutricional: (i) Sempre que os valores de fosfato chegassem perto de 2ppm haveria a reposição do mesmo; e (ii) Sempre que os valores de nitrato chegassem perto de 5ppm haveria, também, reposição deste nutriente. Estes valores foram seguidos sendo baseados em observações de crescimento. Sempre que tais valores eram alcançados a taxa

de crescimento celular iniciava redução, dando indícios de início da fase estacionária.

III.II – EXPERIMENTOS DE SEPARAÇÃO DE CÉLULAS DO MEIO DE CULTIVO

Após o crescimento celular no reator alcançar a concentração celular desejada, experimentos de separação de células do meio de cultivo foram projetados varrendo-se a influência cruzada de Tempo de Exposição em três níveis com cada um de quatro Fatores Indutores de Separação (Concentração de NaOH, RPM de Centrifugação, Temperatura e Irradiância) em 5 níveis de intensidade cada, conforme o planejamento mostrado na Tabela 3.2. Isto corresponde a 15 experimentos por cruzamento Tempo de Exposição com Fator de Separação. O procedimento foi aplicado em dois conjuntos de amostras, A e B, de forma a gerar replicação, resultando em uma massa experimental com um total de 4 X 15 X 2 = 120 experimentos, sendo 30 experimentos por Fator Indutor de Separação estudado.

Tabela 3.2 – Planejamento Geral dos Experimentos de Separação de Células do Meio de Cultivo

Tempo / Medida	-2	-1	0	1	2	
T1	1A	2A	3A	4A	5A	Amostra A
T2	6A	7A	8A	9A	10A	
T3	11A	12A	13A	14A	15A	
Tempo / Medida	**-2**	**-1**	**0**	**1**	**2**	
T1	1B	2B	3B	4B	5B	Amostra B
T2	6B	7B	8B	9B	10B	
T3	11B	12B	13B	14B	15B	

Réplica

Desta forma, cada teste da Tabela 3.2 representa um cruzamento de:

- Variável independente Tempo de Exposição em um de três níveis pré-definidos de acordo com resultados dos pré-testes realizados anteriormente em bancada; e
- Um Fator Indutor de Separação em um de cinco níveis de intensidade definidos também em função de testes avulsos em bancada.

Os três níveis de Tempo de Exposição foram arbitrados de acordo com o Fator de Separação a ser utilizado, já que alguns fatores agem mais rapidamente que outros:

- Para os fatores com respostas muito rápidas (RPM de Centrifugação) foram escolhidos os níveis de Tempos de Exposição de 1, 2 e 3 minutos;
- Para os fatores com respostas rápidas (Concentração de NaOH) foram escolhidos 10, 30 e 60 minutos para os níveis de Tempos de Exposição; e

- Para os fatores com respostas lentas (Temperatura e Irradiância) foram escolhidas 1, 2 e 3 horas para os níveis de Tempos de Exposição.

Optou-se por utilizar Fatores Indutores de Separação com cinco níveis de intensidade, pois, inicialmente, buscou-se entender a influência de cada um deles como recurso de separação, e, posteriormente, localizar os resultados mais satisfatórios. Cada teste foi realizado em duas baterias de réplicas, A e B, para que os dados permitissem apuro estatístico (Tabela 3.2).

Como não havia a possibilidade de se fazer contagem celular dos resultados gerados em cada experimento, devido ao exíguo volume gerado e a rapidez de algumas das separações, as respostas (resultados) de cada teste foram obtidas através das medidas de absorvância (Espectrofotômetro Modelo U2M – QUIMIS) como mencionado na Seção III.I.II no líquido sobrenadante da amostra, medidas estas feitas antes e depois da aplicação do teste. Neste sentido, para que se conseguisse explicar e obter os resultados dos testes de separação utilizou-se a curva de calibração de concentração celular da Fig. 3.1, aplicando-se as devidas correções por diluições quando necessário. Vale mencionar que observações visuais também foram recursos úteis para a interpretação de respostas de todos os testes. Em cada caso, deve-se ter claro que a resposta procurada em cada teste consiste em um número de 0 a 100 que representa a percentagem de células que se depositaram no fundo do recipiente de análise em questão.

III.II.I – INFLUÊNCIA DO FATOR CONCENTRAÇÃO DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO - NaOH

Para estes testes foram utilizadas provetas de 50mL e hidróxido de sódio nas concentrações 1M, 2M, 3M, 4M e 5M (preparadas em balão de fundo chato de 200mL). Em cada proveta foram colocados 50mL de concentrado celular e acrescentado 1mL de NaOH nas concentrações citadas, homogeneizando-se a proveta três vezes e, posteriormente, aguardando-se a reação acontecer em um tempo determinado (Figura 3.8) como informado na Tabela 3.2 e nos parágrafos que a seguem. A temperatura para o experimento era de 26°C (temperatura ambiente).

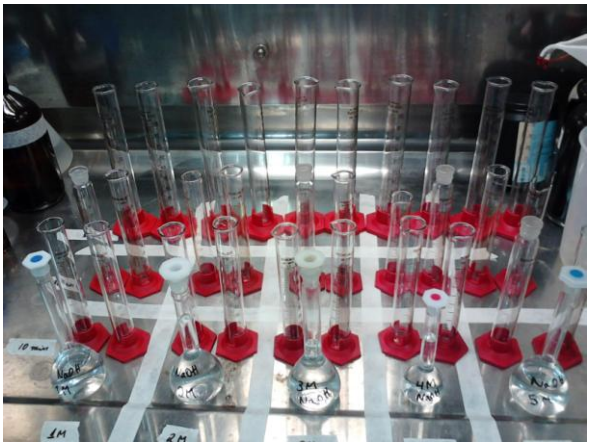

Figura 3.7 - Materiais Separados para Testes Concentração de NaOH versus Tempo de Exposição.

As medidas para quantificação celular foram baseadas nos valores de absorbância (750nm) obtidas no decantado de cada experimento, sendo utilizada a curva padrão da Fig. 3.1. Para a absorbância do "controle" (água do mar como mencionado na Seção III.I.II adicionado o mesmo volume e concentração de NaOH) também foram utilizadas, pois foi observado que os resultados poderiam ser diferentes se fossem realizados apenas em água destilada. A Tabela 3.3 abaixo demonstra as coordenadas do planejamento experimental realizado para aferir a influência cruzada de Tempo de Exposição com Concentração de NaOH, onde "Amostra B" representa o conjunto de réplicas dos testes na "Amostra A".

Tabela 3.3 - Planejamento Experimental para Influência de Concentração NaOH Cruzada com Tempo de Exposição na Separação Celular de Microalgas.

Planejamento	-2	-1	0	1	2	
10 minutos	1 M	2 M	3 M	4 M	5 M	Amostra A
30 minutos	1 M	2 M	3 M	4 M	5 M	
1 Hora	1 M	2 M	3 M	4 M	5 M	

Planejamento	-2	-1	0	1	2	
10 minutos	1 M	2 M	3 M	4 M	5 M	
30 minutos	1 M	2 M	3 M	4 M	5 M	Amostra B
1 Hora	1 M	2 M	3 M	4 M	5 M	

Em um dado teste, após cursar-se o Tempo de Exposição pré-determinado, uma amostra era retirada do decantado para medida de absorbância, amostra esta retirada sempre do ponto central da parte não floculada da proveta. Outra medida obtida era o valor de pH final de cada proveta após o tempo de reação, valendo ressaltar que o pH inicial proveniente do reator foi obtido antes do teste iniciar.

Após a realização dos testes de NaOH, retirou-se 10mL do decantado de cada proveta, em cada concentração de NaOH, sendo este material re-inoculado em outro recipiente visando-se a testar a possibilidade de um novo cultivo (mas, desta feita, sem a utilização de CO_2).

Como a reação do NaOH no meio era evidente, as relações das medidas de volume inicial e final – do floculado – foram anotadas para permitir melhor interpretação dos dados experimentais.

III.II.II - INFLUÊNCIA DO FATOR TEMPERATURA

Para os testes da influência da temperatura na possível separação do concentrado de células do meio, foram utilizadas provetas de 50mL colocadas diretamente em banho térmico (Figuras 3.9 e 3.10) de acordo com a temperatura desejada. A Tabela 3.4 reporta as coordenadas do planejamento experimental para testes de influência cruzada de Temperatura versus Tempo de Exposição.

Figura 3.8 – Exposição à Temperatura 5ºC

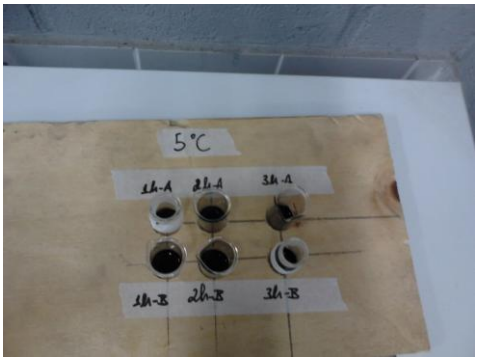

Figura 3.9 – Seis Testes para Exposição à Temperatura 5ºC

Tabela 3.4 – Planejamento Experimental para Influência de Temperatura Cruzada com Tempo de Exposição na Separação Celular de Microalgas.

Planejamento	-2	-1	0	1	2	
1 hora	05°C	15°C	25°C	35°C	45°C	Amostra A
2 horas	05°C	15°C	25°C	35°C	45°C	
3 horas	05°C	15°C	25°C	35°C	45°C	

Planejamento	-2	-1	0	1	2	
1 hora	05°C	15°C	25°C	35°C	45°C	
2 horas	05°C	15°C	25°C	35°C	45°C	Amostra B
3 horas	05°C	15°C	25°C	35°C	45°C	

As provetas ficavam submersas 45cm no banho térmico (o que equivale a 45mL de amostra) para que a atuação da temperatura atingisse um volume no teste de pelo menos 90% do volume total. Após cursar o Tempo de Exposição pré-determinado, medidas de absorbância foram feitas retirando-se alíquota da metade da altura da região de células não-precipitadas (i.e. suspensas). Caso não houvesse uma distinção nítida entre “suspenso” e “precipitado”, a medida era feita da camada superior da proveta.

As medidas das temperaturas foram controladas pelos medidores próprios dos instrumentos: banhos termostáticos com circulador e controle automatizado de temperatura (modelos QUIMIS,Q214M2); e no caso do banho realizado em béquer, a temperatura foi controlada manualmente com o uso de termômetro de mercúrio. Nos primeiros aparelhos automáticos de banho térmico as flutuações de temperatura foram sempre inferiores a 0,1°C logo corrigidas pelo próprio dispositivo. Já no caso dos termômetros de mercúrio o ajuste de temperatura era realizado manualmente contra variações observadas de 0,5°C.

Nos testes de temperatura também foi observado e anotado se ocorria variação na altura/volume do decantado. Como o número de provetas seria muito grande e o número de banhos térmicos disponíveis era reduzido (apenas três), o experimento foi realizado em duas etapas: Primeiro foram feitos os testes de 5°C, 15°C e 25°C, e em seguida os de 25°C, 35°C e 45°C.

III.II.III – INFLUÊNCIA DO FATOR RPM DE CENTRIFUGAÇÃO / FORÇA "G"

Para os testes de influência de RPM de Centrifugação/força "g" foi utilizada a Centrífuga Refrigerada Cientec CT 6000R, obedecendo-se ao planejamento experimental mostrado na Tabela 3.5, com temperatura de centrifugação de 20°C.

Tabela 3.5 – Planejamento Experimental para Influência de RPM de Centrifugação Cruzada com Tempo de Exposição na Separação Celular de Microalgas

Planejamento	-2	-1	0	1	2	
1 minuto	1500 rpm	2000 rpm	2500 rpm	3000 rpm	3500 rpm	**Amostra A**
2 minutos	1500 rpm	2000 rpm	2500 rpm	3000 rpm	3500 rpm	
3 minutos	1500 rpm	2000 rpm	2500 rpm	3000 rpm	3500 rpm	

Planejamento	-2	-1	0	1	2	
1 minuto	1500 rpm	2000 rpm	2500 rpm	3000 rpm	3500 rpm	**Amostra B**
2 minutos	1500 rpm	2000 rpm	2500 rpm	3000 rpm	3500 rpm	
3 minutos	1500 rpm	2000 rpm	2500 rpm	3000 rpm	3500 rpm	

Cada teste foi realizado com volume de 60mL de meio de cultura sendo colocado na centrífuga nas rotações desejadas o que impõe um campo de aceleração centrífuga específica (para deposição celular) como reportado na Tabela 3.6. Os Tempos de Exposição foram de 1, 2 e 3 minutos com aceleração de 40 segundos e frenagem de 60 segundos.

Tabela 3.6 – Velocidade Angular (RPM) da Centrífuga e Aceleração Centrífuga em "g's" (g = 9.81m/s^2).

1500 rpm A	2000 rpm A	2500 rpm A	3000 rpm A	3500 rpm A
302 g	537 g	840 g	1209 g	1646 g

membrana plasmática da microalga, observações em microscopia óptica (Modelo L1000, BIOVAL) foram realizadas paralelamente para averiguar tal ocorrência no precipitado. Para medição de absorbância, foram retiradas alíquotas no ponto médio do suspenso (não-precipitado), mantendo-se a inclinação dos tubos da centrífuga evitando-se resuspensões. Um pré-teste demonstrou que o transporte do líquido sobrenadante para medir concentração celular poderia remisturar o precipitado com a amostra. Por isto optou-se por retirar alíquota do ponto médio do sobrenadante para medição de absorbância e concentração celular. Os volumes de precipitado e sobrenadante também foram anotados.

III.II.IV - INFLUÊNCIA DO FATOR IRRADIÂNCIA

Para os testes de influência de Irradiância na separação celular o planejamento experimental é mostrado na Tabela 3.7.

Tabela 3.7 – Planejamento Experimental para Influência de Irradiância Cruzada com Tempo de Exposição na Separação Celular de Microalgas

Planejamento	-2	-1	0	1	2	
1 hora	30 µE	100 µE	200 µE	300 µE	500 µE	**Amostra A**
2 horas	30 µE	100 µE	200 µE	300 µE	500 µE	
3 horas	30 µE	100 µE	200 µE	300 µE	500 µE	

Planejamento	-2	-1	0	1	2	
1 hora	30 µE	100 µE	200 µE	300 µE	500 µE	
2 horas	30 µE	100 µE	200 µE	300 µE	500 µE	**Amostra B**
3 horas	30 µE	100 µE	200 µE	300 µE	500 µE	

Antes que o reator fosse inoculado com as células para o crescimento e a injeção de CO_2, foi obtida a medida da Irradiância no reator sem células, unicamente carregado com água salina. Observou-se então que o valor médio de Irradiância era de 200µE, sendo então este valor escolhido como ponto inicial para os estudos de migração vertical de células induzida por luz.

Foram utilizadas provetas de 50mL, onde apenas 5cm destas (o que correspondia a 5mL – 10% do volume total) permanecia em contato direto com luz artificial. O restante da proveta permanecia sem contato com a luz externa, enrolada com uma camada dupla de papel de revistas impedindo a passagem de luz externa ao seu interior (Figuras 3.11 e 3.12). Vale mencionar que a temperatura experimental era de 26°C.

Para cada nível de Irradiância testado foram utilizadas lâmpadas de luz fria branca (marca Taschibra) novas, sem qualquer uso e com várias potências diferentes. O uso de lâmpadas novas e sem uso permite estabilidade no campo de irradiância, enquanto o fato de apresentarem potências diferentes tem o objetivo de permitir que os vários níveis de irradiância fossem alcançados, evitando-se variar a distância de lâmpadas à proveta. As medidas de irradiâncias foram feitas pelo medidor de irradiância da LI-COR, modelo LI-250A (*Light Meter*). A Tabela 3.8 apresenta as relações entre potências e irradiâncias das lâmpadas utilizadas nos testes de influência de Irradiância na separação celular.

Tabela 3.8 – Relação entre Potência e Irradiância das Lâmpadas Utilizadas.

Potência	Irradiância	Altura "tubo PVC"	Diâmetro "tubo PVC"
10 watts	30µE	25 cm	28 cm
15 watts	100µE	17 cm	28 cm
20 watts	200µE	20 cm	28 cm
25 watts	300µE	21 cm	28 cm
40 watts	500µE	26 cm	28 cm

Figura 3.10 - Bancada com as Provetas de Ensaios nas Irradiâncias pré-Definidas

Figura 3.11 - Sistema de Testes de Irradiância em funcionamento.

III.II.V – INFLUÊNCIA CRUZADA DE CONCENTRAÇÃO DE NaOH E RPM DE CENTRÍFUGAÇÃO

Após os testes anteriores terem sido realizados e analisados, foram escolhidos os fatores que apresentaram os melhores desempenhos quanto à separação das células do meio de cultivo. Estes fatores são Concentração de NaOH e RPM de Centrifugação (força "G"). Em seguida, dentre os testes destes dois fatores, foram escolhidos os resultados que apresentaram os piores valores (separação menor do que 80%) como pontos para o desenvolvimento de Análise de Superfícies de Resposta para prever ações cruzadas dos dois fatores com melhor desempenho conjunto sob valor fixo de Tempo de Exposição em 01 minuto (menor tempo).

A Tabela 3.9 apresenta as coordenadas do planejamento experimental 3^2 (três níveis por dois fatores) para esta análise. A Figura 3.13 apresenta o esquema da Malha Experimental 3^2 para a Análise de Superfície de Resposta de Percentagem de Células Separadas. Nesta Fig. 3.13 verifica-se a distribuição espacial no Plano Concentração de NaOH versus RPM de Centrifugação dos Pontos do Planejamento Experimental na Tabela 3.9, evidenciando nove coordenadas distintas (3^2) com os Pontos 09, 10, 11 e 12 como réplicas no centro da malha.

Tabela 3.9: Planejamento Experimental 3^2 para Análise de Ação Cruzada de Fatores Concentração de NaOH e RPM de Centrifugação

Combinações		
Ponto 1	3 M	1500 RPM
Ponto 2	3 M	2000 RPM
Ponto 3	3 M	2500 RPM
Ponto 4	2 M	2500 RPM
Ponto 5	1 M	2500 RPM
Ponto 6	1 M	2000 RPM
Ponto 7	1 M	1500 RPM
Ponto 8	2 M	1500 RPM
Ponto 9	2 M	2000 RPM
Ponto 10	2 M	2000 RPM
Ponto 11	2 M	2000 RPM
Ponto 12	2 M	2000 RPM

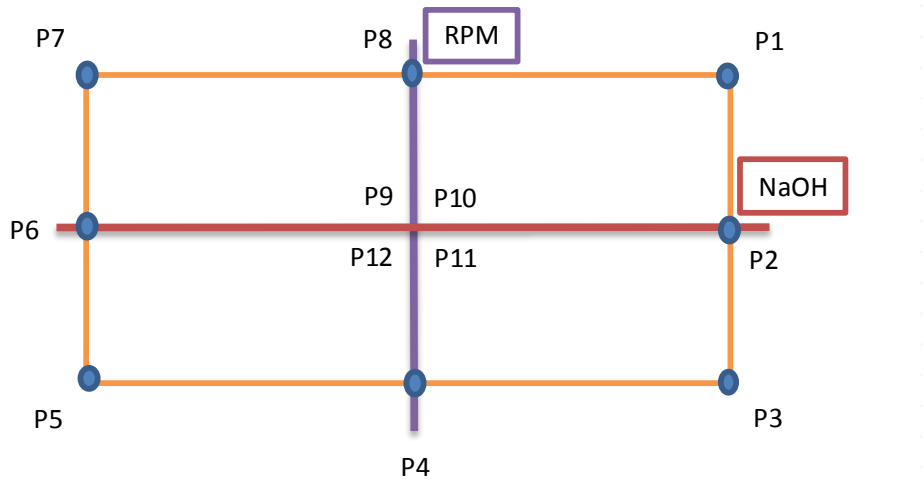

Figura 3.12 – Identificação Espacial de Pontos da Tabela 3.9 do Planejamento Experimental para Influência Cruzada de Concentração de NaOH com RPM de Centrifugação

Os pontos P1 a P8 são pontos periféricos da Malha Experimental de combinação de influências dos Fatores Concentração de NaOH e RPM de Centrifugação (sempre com duas réplicas cada a partir das séries “A”e “B” de ensaios). Por outro lado, os pontos P9, P10, P11 e P12 são replicantes extras do ponto central da malha (cada um deles também duplamente replicado a partir das séries “A” e “B” de ensaios) para elevar a densidade de informação no centro do Plano Experimental, definindo assim, teoricamente, um local de variância mínima do procedimento de Análise de Superfícies de Resposta. Em resumo, o Plano Experimental compreende 09 coordenadas espaciais distintas, contendo duas réplicas nos oito pontos periféricos e oito réplicas no ponto central, totalizando assim 24 testes experimentais sobre nove coordenadas distintas de influências Concentração de NaOH e RPM de Centrifugação.

Para os presentes testes de influência cruzada células foram cultivadas no fotobiorreator e extraídas amostras para o Plano Experimental seguindo-se os procedimentos das Seções III.I (fotobiorreator e crescimento) e III.II.III (centrifugação/força “G”). Com a exceção de que, antes da amostra ser centrifugada, era colocado 1mL de NaOH na concentração determinada na Tabela 3.9 nos tubos dos testes e nos tubos que serviriam de controle (água do mar como mencionado na Seção III.I.II acrescida do concentrado de NaOH). A necessidade de se centrifugar o controle deriva de terem sido observadas grandes diferenças nos valores de absorbância medidas do controle se o concentrado de NaOH era adicionada ou não.

Em seguida cada amostra era homogeneizada três vezes para que todo o material recebesse uniforme exposição ao NaOH, sendo logo colocado na centrífuga sob campo de aceleração centrífuga exercido por 01 minuto. Quando a centrífuga cessava movimento, retirava-se uma amostra de cada tubo para a medida de absorbância sendo determinados os seus volumes de floculado/separado e não-floculado/não-separado (como explicado na Seção III.II.III).

CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.I – EXPERIMENTOS DE SEPARAÇÃO CELULAR

IV.I.I – INFLUÊNCIA DE CONCENTRAÇÃO DE NAOH

Ao final da campanha de crescimento da biomassa para esta sequência de testes, o valor do concentrado celular atingiu a $7{,}6 \times 10^7$ céls/mL sendo o tempo de crescimento de 8 dias seguidos. Os experimentos sob ação do Fator Concentração de NaOH foram os que apresentaram melhores resultados quanto à qualidade e reprodutibilidade de separação de células do meio de cultivo. A Fig. 4.1 apresenta uma imagem demonstrando a disposição das 30 provetas de 50mL no início desta bateria de testes (03 níveis de Tempos de Exposição X 05 Concentrações de NaOH X 02 Réplicas).

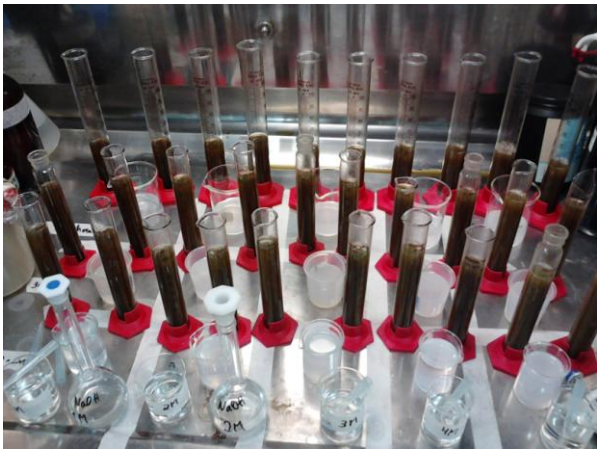

Figura 4.1 – Condições no Início dos Testes de Influência de Concentração de NaOH na Separação Celular, com 30 Provetas de 50mL de Cultura para Adição de NaOH

A Figura 4.2 apresenta os resultados quantitativos de desempenho de separação celular em termos do percentual de células separadas sob influência do Fator Concentração de NaOH. Pode-se observar na Fig. 4.2 que a partir da concentração de 2M em um Tempo de Exposição de 60 minutos, as percentagens de separação celular começam a nivelar próximo do satisfatório (75% de separação celular). Enquanto concentrações acima de 4M em 30 minutos ou em 60 minutos de exposição, produziam resultados muito próximos de 100% de separação. Porém, foi observado, nos testes de concentração 4M (30 e 60 minutos) e 5M (30 e 60 minutos), o rompimento celular (lise) e liberação de todo o conteúdo intracelular. Mas isto só foi possível constatar a partir de observação da amostra ao microscópio.

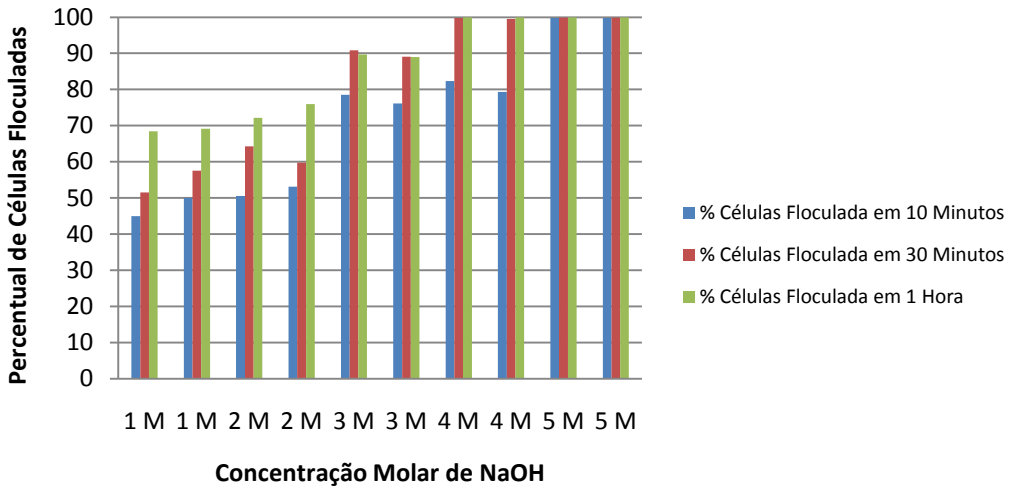

Figura 4.2 – Variação dos Valores Percentuais de Células Separadas do Meio por Ação de Concentração de NaOH.

Vale apontar também que a coloração natural do material no experimento (marrom – cor natural da célula) alterou-se para esverdeada devido ao fato da liberação de clorofila ao meio do experimento (Figura 4.3), sendo possível constatar na imagem da Fig. 4.3 abaixo que a separação celular atingida era bem definida, havendo uma faixa límpida e transparente demarcada pela "chave branca" (sem células ou com muito baixas concentrações) e uma camada inferior de forte concentrado celular. A Figura 4.4 apresenta a correspondente distribuição de pH ao longo dos testes do experimento de Influência de Concentração de NaOH ao final de cada Tempo de Exposição.

Outra resposta importante que foi possível observar corresponde ao volume de separado célula-meio na Fig. 4.5. Quanto maior a Concentração de NaOH do experimento menor era o volume do separado celular no fundo da proveta, estando mais concentrado. Porém quando o Tempo de Exposição cresce até atingir a 60 minutos, o volume de material separado diminui em alguns casos por dois motivos: possível superconcentração no fundo da proveta e rompimento celular (nos casos de 4M e 5M) como mostrado na Fig. 4.5.

Após o curso do experimento, retirou-se uma alíquota de 10mL de cada proveta correspondente a cada concentração de NaOH, no tempo de 30 minutos, e inoculou-se em um meio de cultivo com nutrientes para testar-se novo crescimento. A alíquota foi sempre retirada da parte suspensa da proveta simulando o que poderia acontecer no processo real com o fotobiorreator no qual o líquido suspenso volta ao cultivo, enquanto o floculado

segue para a extração de lipídios. Estas coletas são mostradas na Figura 4.6. Neste procedimento não foi utilizada injeção de CO_2.

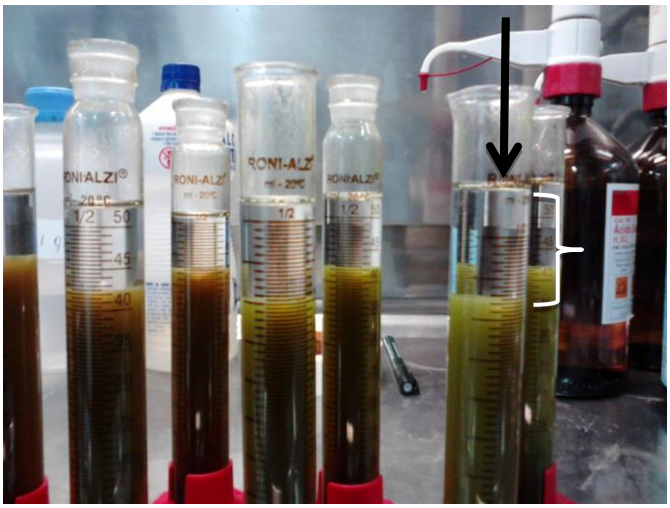

Figura 4.3 - Teste após 30 ou 60 minutos. Seta preta aponta proveta com 5M. Chave branca demonstrando o líquido límpido suspenso. Cor mais esverdeada indicando células rompidas.

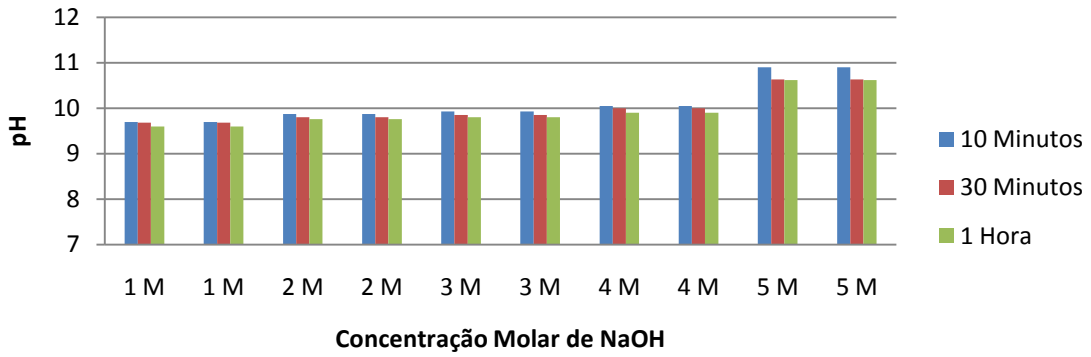

Figura 4.4 – Distribuição dos Valores de pH ao Final dos Experimentos de Influência de Concentração de NaOH.

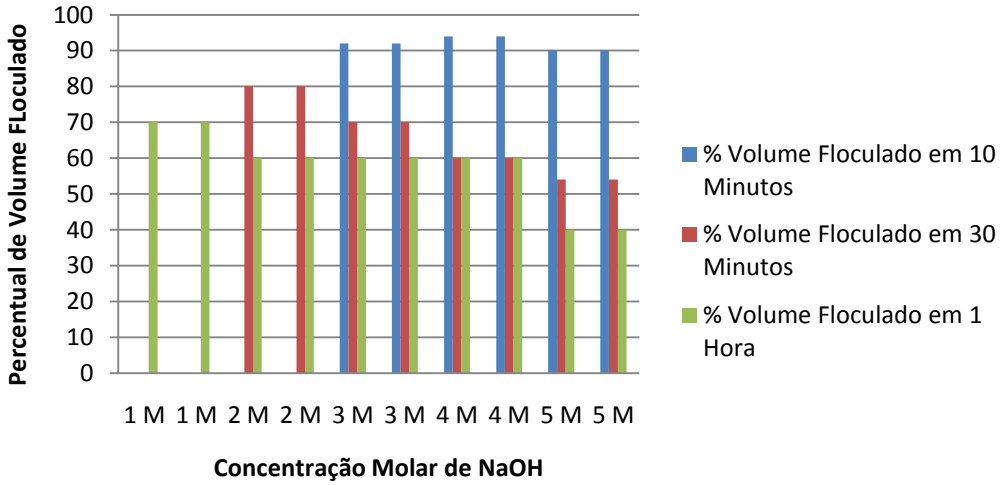

Figura 4.5 - Percentual de Volume de Células Separadas contra o Tempo de Exposição.

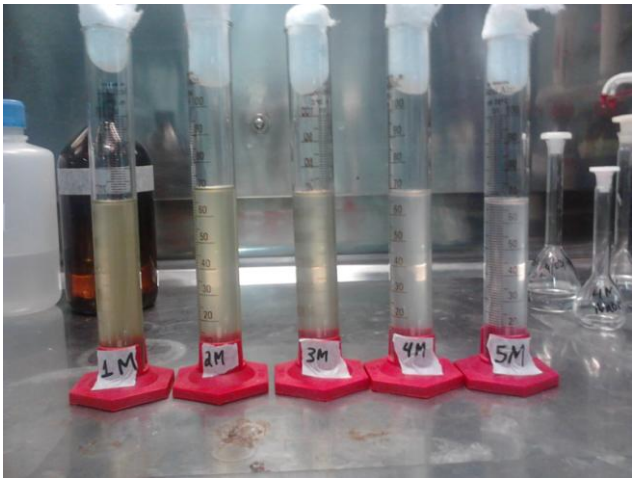

Figura 4.6 – Tentativa de Reaproveitamento de Meio Separado de Algas sem injeção de CO2.

Como a coloração do re-inoculante era transparente/clara o que indicava pouca presença de células, o material foi observado no microscópio. O que se constatou foi a mínima presença de células e, quando elas apareciam no campo de visão do microscópio, estavam totalmente imóveis – sem atividade celular.

Decorrido 1 hora foi observado (Figura 4.7) nova deposição celular no fundo da proveta, indicado, ainda mais, a ausência de atividade celular.

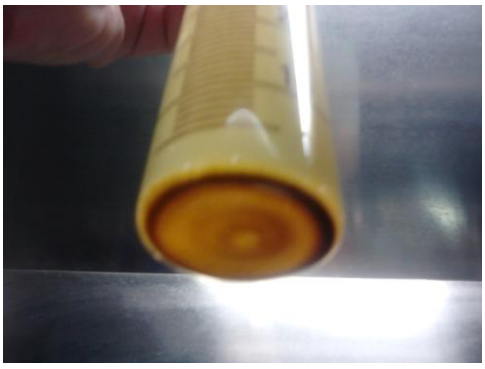

Figura 4.7 - Concentração Celular no Fundo do Tubo com Sobrenadante a 1M, após 1 hora de Exposição.

As provetas ficaram na bancada durante 24 horas e no final deste tempo foi observado que – em todos as concentrações testadas de NaOH – houve morte celular, como demonstra a imagem abaixo na Figura 4.8, além das observações em microscopia.

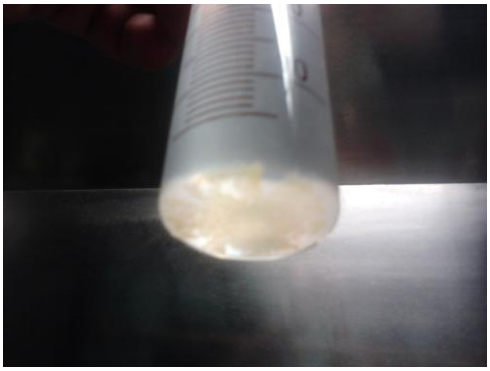

Figura 4.8- Concentração Celular no Fundo do Tubo com 5M de NaOH após 24 horas.

A análise da utilização de NaOH como agente floculante pode indicar bons resultados pelo fato de seus valores percentuais de separação celular terem sido altos e claramente identificados. No entanto, há dois pontos a serem observados. O primeiro é o fato deste floculante elevar o pH quase que instantaneamente, sendo assim há que se testar qual é o volume e concentrações ideais a serem utilizados para que o valor do pH não seja tão alto a ponto de causar morte celular. Uma das formas de se reduzir os valores de pH consiste na própria injeção de gás CO_2 que foi capaz de reduzir (em testes preliminares) o pH ideal de crescimento celular.

O segundo ponto é que cada vez que se introduz um reagente – com volumes consideráveis – no sistema do fotobiorreator há que se fazer testes para saber o grau de saturação limite que o próprio sistema irá suportar. Dispor grandes volumes de NaOH no meio pode fazer com que haja redução na atividade celular, lise celular e excesso de resíduos. Sendo assim, mesmo com ótimos resultados de separação celular, a adoção do agente NaOH deve ser muito bem avaliada para que todo o sistema não entre em “colapso” e/ou que sejam gerados custos associados à sua utilização excessiva.

Em diversos estudos da literatura o NaOH foi utilizado como floculante para separação da biomassa celular do meio de cultivo, porém em cada um destes trabalhos deve-se levar em conta as características das espécies estudadas e os níveis de concentração e volume utilizados do reagente. Knuckey et al., (2006) utilizaram o NaOH como floculante para separar sete diferente tipos de microalgas, alcançando resultados diversos desde 30% até 99% de eficiência na remoção de biomassa. Um dado importante mencionado no trabalho, assim como no presente estudo, é que com o passar do tempo os valores de pH

vão aumentando e criando floculos que facilitam a sedimentação celular (aumento do percentual de eficiência – separação celular). Os valores de pH alcançados giraram próximo a 10.6, sendo um pouco mais elevados do que aqueles do presente estudo reportados na Fig. 4.4.

Uma das espécies utilizadas, por Knuckey et al. (2006), foi a *Rhodomonas salina* que faz parte do grupo (Cryptophyceae) da espécie utilizada nos presentes experimentos (*I. galbana*). No estudo citado os autores utilizaram o concentrado de 1M de NaOH durante tempos de 10 a 20 minutos, sendo a eficiência alcançada de 85%-90% de remoção da biomassa. Porém, o concentrado celular que foi utilizado neste estudo foi baixo sendo apenas de $1x10^6$ céls/mL, muito inferior ao utilizado no presente trabalho ($7,6 \times 10^7$ céls/mL). Com maior concentrado de biomassa e um mesmo volume de floculante a reação tende a ser mais lenta. Ainda, no estudo de Knuckey et al. (2006), percebe-se que o valor mais elevado de concentrado celular que os autores utilizaram correspondeu a $1x10^7$ céls/mL, obtendo-se eficiência de separação de 95%-99%; porém, foi de outra espécie (*C. calcitrans*) pertencente a outro grupo de microalgas (Bacillariophyceae).

Harith et al. (2009), utilizaram a mesma espécie acima citada (*C. calcitrans*) em testes de floculação com NaOH, porém com concentração de 5M e tempo de 4 horas de exposição. Neste estudo os autores criaram ambientes distintos com temperaturas diferentes (4°C e 27°C). A melhor eficiência de separação alcançada foi de 91% em ambientes de temperatura maior (27°C), enquanto o ambiente de menor temperatura alcançou valores menores de separação abaixo de 70%. Como demonstrado na Fig. 4.2, observa-se que o valor aqui alcançado neste nível de concentração de NaOH foi bem próximo dos 100% de eficiência, sendo atingido em tempos de exposição bem menor (1 hora). O pH alcançado foi próximo de 10.6, um pouco mais alto do que os do presente estudo na Fig. 4.4. Mas vale apontar que concentrações de 5M foi suficiente para rompimento das células e perda do material intracelular para o meio.

Horiuchi et al. (2002), realizaram o mesmo teste na espécie *D. tertiolecta* com o tempo de teste de 1 hora, com a concentração de NaOH de 1M, e com concentrado celular de concentração 3 vezes menor do teste de Harith et al. (2009). O valor alcançado foi de 92% de separação com um pH final de 10.5 (bem próximo do que mostra a Fig. 4.4). A relação de

volume de floculado com o volume total da proveta também foi observado e apresentou um resultado diferente dos aqui mostrados na Fig. 4.5. Horiuchi et al., (2002) obtiveram uma reação mais rápida e com um decréscimo quase que de 90% de células nos 5 primeiros minutos, o que foi muito diferente do observado no presente estudo: aqui verificou-se que sob concentração de 1M só foi possível chegar em 70% de separação ao fim da primeira hora, e apenas em 3M, sob 10 minutos de exposição, foi possível atingir-se valores próximos de 90% de separação celular.

Outro estudo que aponta que há o aumento significativo na floculação de microalgas devido ao aumento de pH é o que foi realizado por Blanchemain & Grizeau (1999). Neste estudo observou-se que ocorria uma aumento significativo de biomassa depositada de uma espécie diatomácea quanto mais alto estivesse o valor de pH, no caso a partir de 10.2. Quando o pH ficava em torno de 7 e até 8 não havia floculação aparente.

IV.I.II – INFLUÊNCIA DE TEMPERATURA

Os experimentos de separação algal por exposição a níveis moderados de temperatura não revelou valores tão bons quanto o desejado, devido ao fato de tal fator não apresentar grande influência de interação no meio algal na faixa de valores estudada. Seguem abaixo, nas Figuras 4.9 e 4.10, a imagem de uma proveta após 1 hora de exposição e de uma das provetas demonstrando uma camada muito fina de coloração clara (região onde apresentava a menor concentração celular). Os concentrados celulares obtidos para este experimentos foram: para as temperaturas de 5°C, 15°C e 25°C foi de $11x10^7$ céls/mL e para as temperaturas de 25°C, 35°C e 45°C foi de $8,4x10^7$céls/mL.

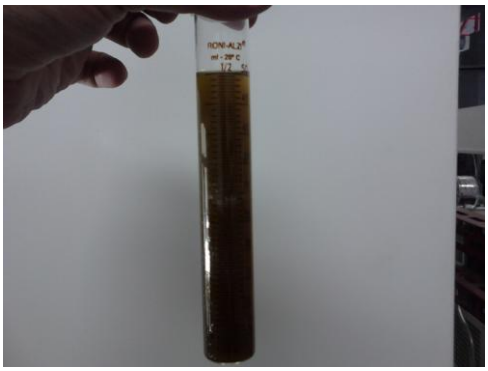

Figura 4.9 – Proveta a 15ºC, resultado quase um padrão para todas as temperaturas

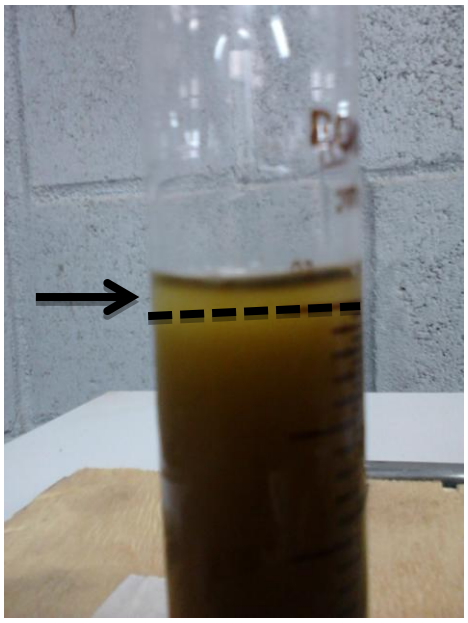

Figura 4.10 – Proveta a 5ºC após 3 horas de experimento. Uma "leve" separação é percebida na camada superior da proveta.

As Figuras 4.11 e 4.12 abaixo apresentam as percentagens de separação celular contra o Tempo de Exposição em diferentes Temperaturas testadas.

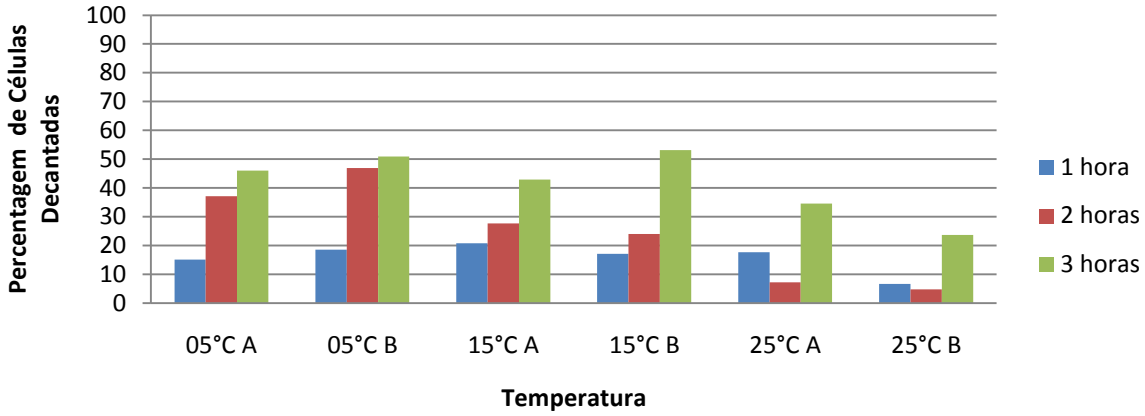

Figura 4.11 – Percentual de Células Separadas nos Testes de Exposição a Temperatura Baixa.

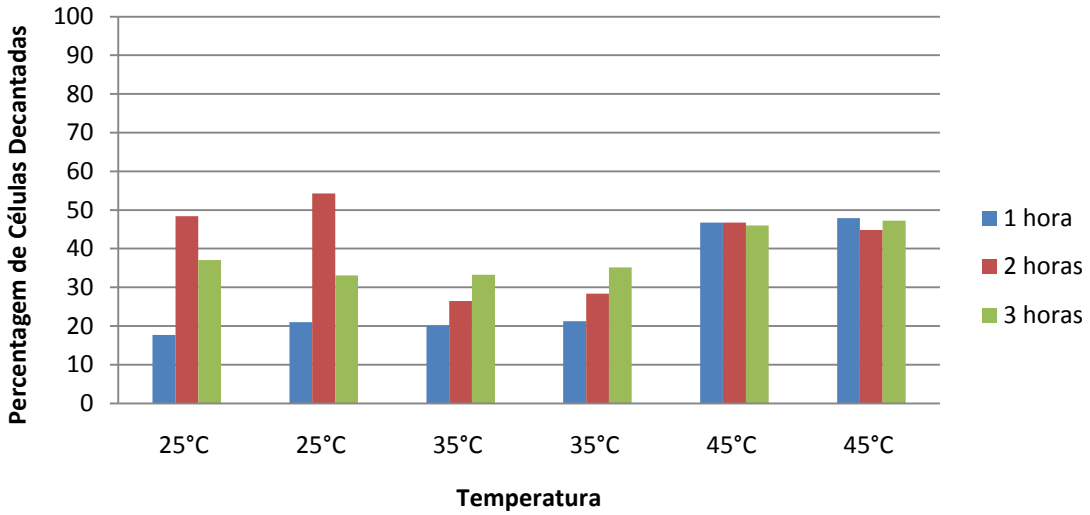

Figura 4.12 – Percentual de Células Separadas nos Testes de Exposição a Temperaturas Altas.

O que foi possível observar é que os experimentos não revelaram nenhum padrão consistente de resposta às diferentes variações das temperaturas, não importando qual temperatura fosse. Observando-se o comportamento geral das microalgas, a suposição inicial é que temperaturas altas ajudariam na separação celular. Todavia não foi possível confirmar tal fato, pelo menos na faixa de temperatura aqui estudada.

Também se observou que, com o aumento do Tempo de Exposição, as provetas submetidas a 35°C e 45°C começaram a ficar esverdeadas, o que aponta a lise celular.

Alíquotas foram retiradas e, de fato, foram capazes de comprovar que tais células estavam rompidas e que haviam liberado todo o seu conteúdo intracelular. Com a redução do número de células íntegras no meio de cultivo deu-se uma falsa impressão de separação mais eficiente. Isto é, assim como ocorrido com as altas concentrações de NaOH, aqui a lise celular também ocorreu com as altas temperaturas (35°C e 45°C) em Tempos de Exposição prolongados.

Em relação às baixas temperaturas utilizadas no experimento (5°C e 10°C) esperava-se que houvesse uma possível separação bem definida pela redução da atividade celular. Observando-se no microscópio alíquotas retiradas em cada temperatura, constatou-se que a atividade celular ficou bastante reduzida, porém a separação célula-meio não ocorreu apreciavelmente. Apenas a 5°C obteve-se a separação de 1 mL de camada sem células, o que traduz-se em um valor insuficiente para o desempenho pretendido.

A tentativa de se utilizar temperaturas moderadas como Fator Indutor de Separação celular, deriva do fato de que, no Brasil, a energia térmica solar está bastante disponível no ambiente. Em locais de altas temperaturas ou de baixas temperaturas o sistema poderia de alguma forma captá-la e direcioná-la ao processo de separação. Caso temperaturas altas apresentassem eficácia de separação, poderia haver ao lado do fotobiorreator um sistema de separação utilizando contato direto com metal aquecido por radiação solar captada. E, por outro lado, se temperaturas baixas fossem eficazes para separação, poderia ser proposto que as separações em fotobiorreatores fossem em ambientes de temperaturas baixas. Mas o que foi possível observar é que as temperaturas altas apenas agitavam mais as células e que, em alguns casos, causavam morte celular (lise).

Em temperaturas baixas comprovou-se apenas redução da atividade celular, mas não de forma a separar de forma eficiente as células do meio de cultivo. Adicionalmente, sendo necessário gerar ambientes com baixas temperaturas o gasto energético e financeiro seria alto o que poderia colocar a sustentabilidade de todo o processo em dúvida, já que refrigeração industrial apresenta um custo considerável.

Poucos estudos existem que tratam da utilização de temperatura como técnica de separação celular eficiente. Blanchemain & Grizeau (1999) utilizaram a temperatura como fator para decantar a biomassa crescida, mas seu estudo apresentou um tempo longo para o

propósito (4 e 15 horas em 4°C) e o ganho de biomassa não foi tão significativo a ponto da técnica dar grandes resultados, havendo separação de apenas aproximadamente 17% da massa celular. Como resfriar um sistema de alta capacidade é custoso e não tão simples, um ganho de 17% não parecer ser uma boa opção, assim como revelado no presente estudo em que a separação atingida girou na faixa de 10%-15% de células separadas.

Heaney & Eppley (1981) também tentaram utilizar a temperatura como forma de separação celular em duas espécies de dinoflagelados. O que tal estudo conseguiu comprovar é que quando há a modificação na temperatura confortável de crescimento das microalgas há a formação de estratos diferentes, onde as células, que conseguem vencer as temperaturas mais baixas, migram para outros pontos. E a células que não conseguem vencer as baixas temperaturas se agrupam, aumentando a chance de decantação e sedimentação.

Em resumo, a temperatura pode ser um fator importante para aplicar ao sistema fotobiorreacional visando a induzir produção de determinados compostos ou metabólitos ou até mesmo o aumento ou redução da atividade celular (BLANCHEMAIN & GRIZEAU, 1999; FLYNN, 2002), mas não parece servir como técnica de separação eficiente de biomassa caracterizada por baixo custo.

IV.I.III – INFLUÊNCIA DE RPM DE CENTRIFUGAÇÃO

Os experimentos envolvendo exposição ao Fator RPM de centrifugação apresentaram bons valores consistentes de separação celular. A Fig. 4.13 abaixo demonstra que a partir de rotações de 2000 RPM (aceleração de 537g) a eficiência de separação celular resulta acima de 80%.

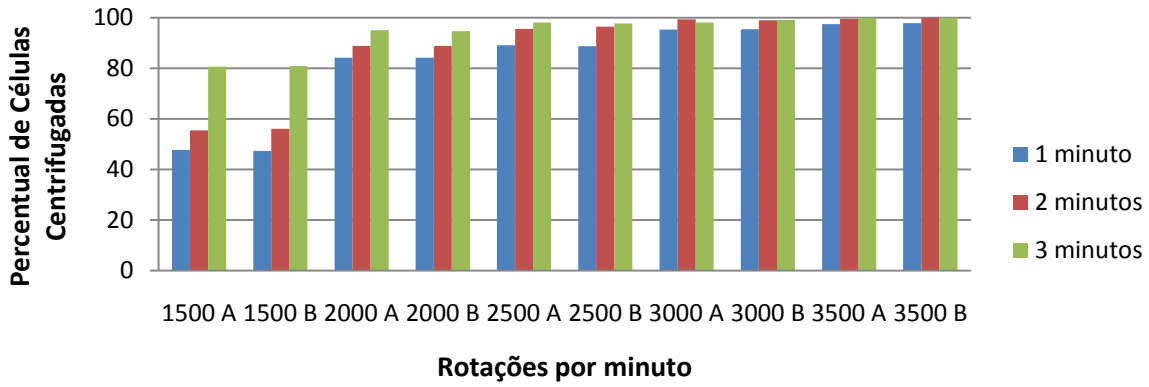

Figura 4.13 – Valores em Percentuais do Volume de Células Separadas por Centrifugação versus RPM e Tempos de Exposição.

No entanto, a lise celular também poderia ocorrer devido ao grande campo de aceleração exercido pela centrífuga. Sendo assim, uma alíquota de amostra era retirada tanto do fundo do tubo quando da parte suspensa para averiguação de rompimento celular. Tanto no concentrado do fundo do tubo quanto na parte suspensa não foi observado lise celular e nem redução da atividade celular, apontando assim a centrifugação como uma boa opção para ser utilizada como separador célula-meio de cultivo. Seguem abaixo as imagens nas Figuras 4.14, 4.15 e 4.16 feitas no dia do experimento demonstrando a ocorrência de concentrados no fundo dos tubos de centrifugação.

A técnica de centrifugação para separar as células do meio de cultivo apresentou resultados quantitativos e qualitativos interessantes. Os valores alcançados chegaram a quase 100% de eficiência e sem rompimento celular, o que demonstra que a técnica é plausível. Ainda que se utilizem valores de RPM baixos e em pequenos Tempos de Exposição, ainda sim resultam valores percentuais de separação celular significativos.

Figura 4.14 - Centrifugado em 2 minutos a 2500 RPM.

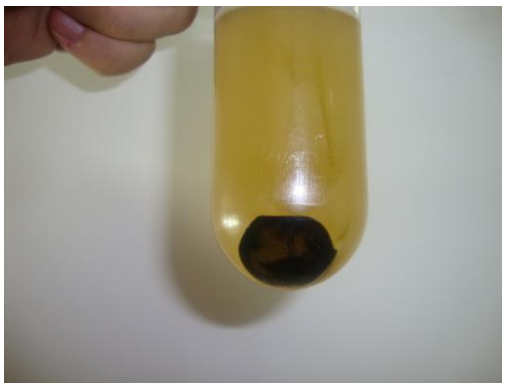

Figura 4.15 - Centrifugado em 3 minutos a 2500 RPM.

Figura 4.16 - Centrifugado em 2 minutos a 1500 RPM.

Alguns estudos na literatura apontam a técnica de centrifugação com uma das possíveis técnicas a serem utilizadas para separação biomassa-meio de cultivo com resultados importantes. Entretanto, deve ser estudado até que nível de aceleração as células conseguem suportar sem romperem suas paredes celulares e membranas plasmáticas (PRICE et al., 1974).

Price et al., (1974) alcançaram valores significativos de remoção de biomassa algal em baixas rotações a 1500 RPM em três diferentes espécies de algas (*Dunaliella tertiolecta*, *Pyramimonas sp.* e *Thalassiosira fluviratilis*) com separações de mais de 90 % em Tempos de Exposição de 5 minutos. Apenas a espécie *Synechococcus bacilaris* obteve valores inferiores de 78% de separação em Tempo de Exposição de 5 minutos. Tais valores corroboram os do presente estudo onde apontamos que baixos valores de RPM podem ser alternativas

importantes para se tentar separar biomassa com centrifugação de baixo custo e em baixos tempos.

Schenk et al. (2008) apontam que no caso da centrifugação é necessário que se estude e encontre a melhor relação entre o tamanho celular e meio de cultivo, já que a interação de cada espécie com o meio de cultivo podem apresentar valores experimentais consideravelmente diferentes, visto que quanto maior a célula maior e mais rápido tenderá ser a separação.

Outro ponto a ser mencionado, que favorece a técnica de centrifugação, é que o sistema deve funcionar normalmente apenas direcionando um volume reduzido à separação e o restante do *hold-up* algal apenas regressa ao sistema de fotobiorreação para que não haja perda nas taxas de crescimento celular. No caso a centrifugação seria implementada através de hidrociclones. Após a separação algal por hidrociclones, todo o meio aquoso residual poderá regressar ao sistema de fotobiorreação sem perdas ou maiores necessidades de *make-up* de meio de cultura. Por fim, questões a decidir em um projeto, seriam: (i) qual o percentual de meio direcionado ao sistema de separação; (ii) qual a eficiência de separação; e (iii) quais os valores de RPM de centrifugação escolhidos para projeto.

IV.I.IV – INFLUÊNCIA DE IRRADIÂNCIA

Em princípio, a utilização da irradiância para a separação celular pareceria viável pelo fato de tais células apresentarem mobilidade e fototropismo. Alguns estudos apontam que a migração celular na coluna da água pode ocorrer devido às variações de irradiância no ambiente (ANDERSON & STOLZENBACH, 1985; FLYNN & FASHAM, 2002; MITBAVKAR S & ANIL, 2004; RICHTER et al., 2007; SERIZAWAA et al., 2010). Portanto, tentou-se aferir a influência deste fator indutor de floculação desde níveis de irradiância baixa até níveis de irradiância altos por meio de instigação da migração celular vertical por fototropismo.

Observou-se que tal fator Irradiância não foi eficaz como recurso de separação celular como apontam os dados abaixo na Figura 4.17. Os valores percentuais de células separadas mantiveram-se praticamente constantes apontando que não importando o valor de irradiância fornecido, não ocorreria migração vertical suficiente para induzir separação célula-meio.

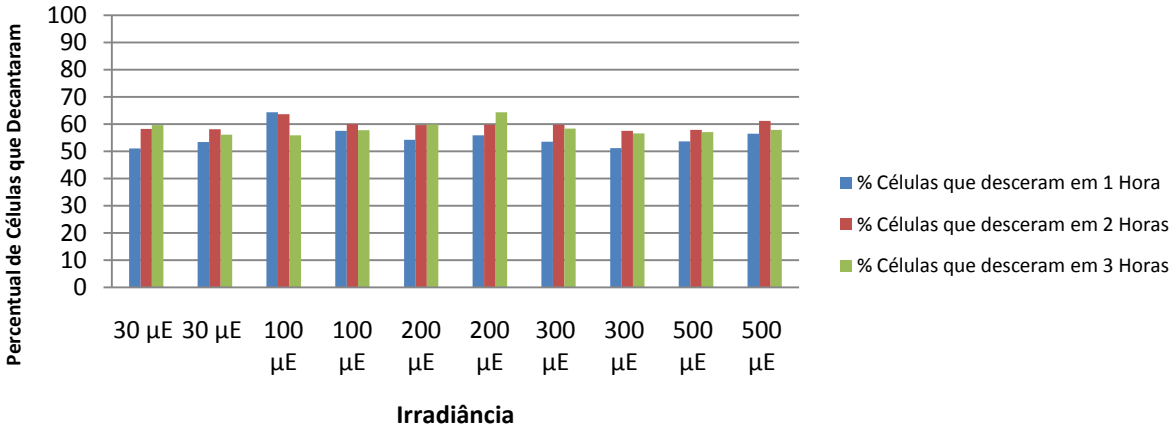

Figura 4.17 – Percentual de Células que Desceram durante os Experimentos com Irradiância.

Foram feitas fotografias depois do experimento ter ocorrido para que se pudesse comprovar a eficiência ou não do sistema de irradiância diferencial como mostrado nas Figuras 4.18 e 4.19.

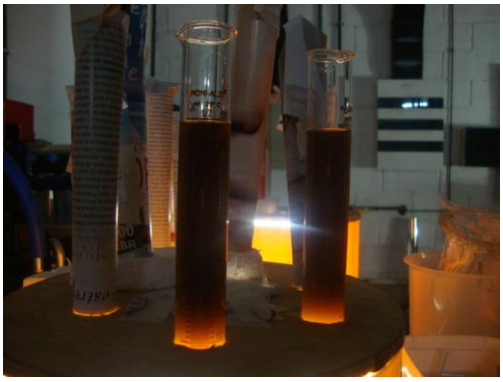

Figura 4.18 - Sistema em funcionamento após 1 hora a 200μE.

Figura 4.19 - Sistema em funcionamento após 1 hora a 30μE.

A imagem da Figura 4.20 foi obtida como vista da parte superior das provetas de ensaio, demonstrando que todo o feixe de luz acessando o tubo afetava apenas a parte inferior dos mesmos, permanecendo o restante das provetas em escuridão; i.e. realmente obteve-se concentração da luz incidente em apenas uma faixa estreita no fundo das provetas com amostra algal.

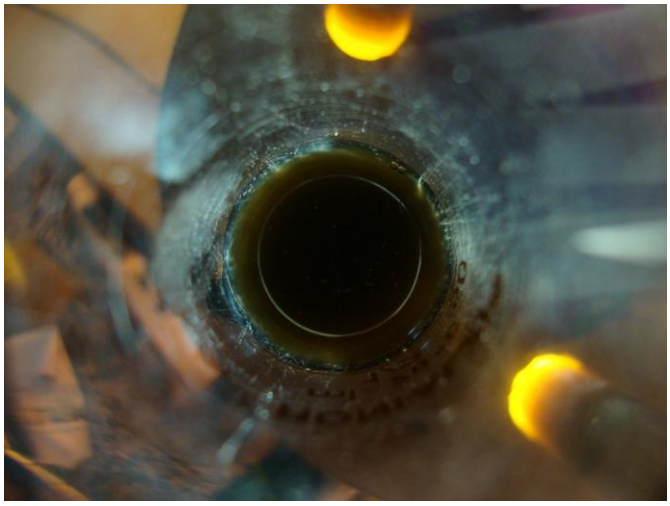

Figura 4.20 - Interior de Proveta de Ensaio Preparada para Teste de Irradiância demonstrando o "Não Acesso" de Luz ao seu Interior.

Os testes com irradiância não apresentaram resultados eficientes que pudessem ser direcionados para projetar-se um sistema inovador de separação celular. O presente estudo aponta que houve, sim, migração celular vertical; o que não houve foi uma separação

eficiente que pudesse ser considerado producente como técnica de separação de biomassa microalgal para extração de biocompostos.

A tentativa de se usar a irradiância para separação celular resulta da conjectura de que, no Brasil, os ambientes abertos onde os fotobiorreatores seriam implantados, são áreas de grande incidência de radiação solar, com energia considerável capaz de induzir migração de células com motilidade, como no caso de *I. galbana*. Mas o que se observou, foi que a migração não foi eficaz, nos tempos testados, o que leva a crer que o fator Irradiância não é relevante para ser considerado como alternativa de separação celular em processos mais complexos com fotobiorreatores.

Os estudos supracitados apenas apontam valores positivos ou negativos quanto à relação de migração vertical das mais diferentes espécies em diferentes épocas do ano e em diferentes ambientes. Vale ressaltar que os valores observados são de migrações verticais de poucos metros até, em alguns casos, de 30 ou 40 metros, o que torna inviável em um fotobiorreator. Além disto - para o presente experimento de irradiância - qualquer que seja a modificação tanto da temperatura quanto da agitação do meio há uma possível suspenção de todo o material separado.

IV.I.V – INFLUÊNCIA CRUZADA DE CONCENTRAÇÃO DE NaOH E RPM DE CENTRIFUGAÇÃO

A combinação de dois fatores realmente indutores de separação celular foi testada visando-se à otimização dos resultados e redução de consumo energético de separação algal. Isto foi realizado com o cruzamento dos Fatores Concentração de NaOH e RPM de Centrifugação. Comparando-se as influências isoladas da Concentração de NaOH e de RPM de Centrifugação com o cruzamento de tais fatores no presente experimento (NaOH-Centrífuga) observa-se que houve um acréscimo nos valores de separado-floculado. A Figura 4.21 abaixo demonstra tais desempenhos obtidos com o Plano Experimental Concentração NaOH versus RPM de Centrifugação apresentado na Tabela 3.9 e na Fig. 3.13.

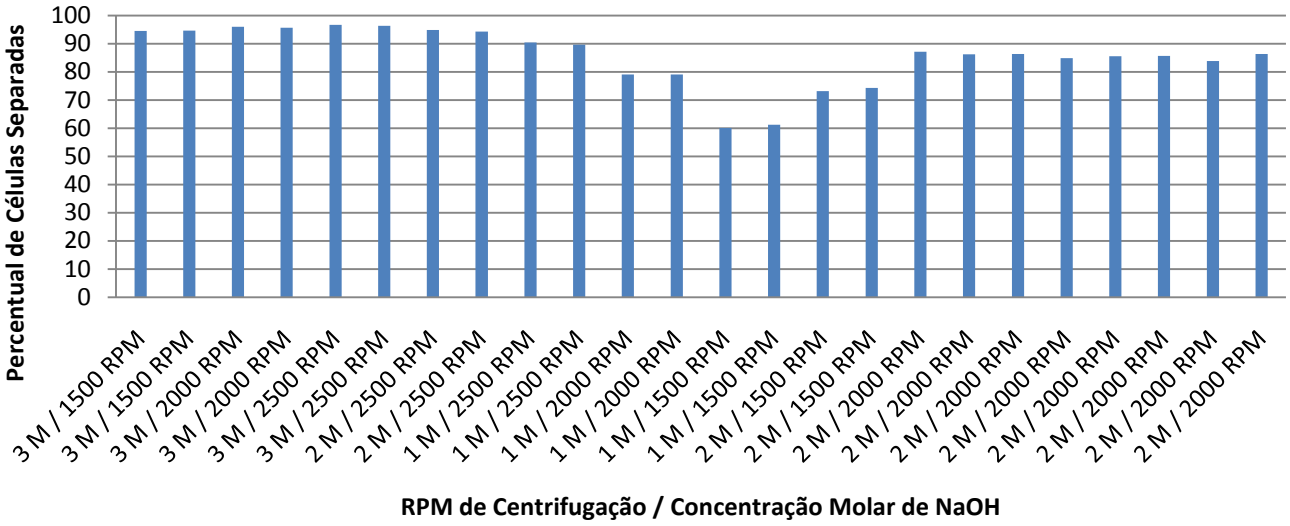

Figura 4.21 – Percentual de Células Separadas via Cruzamento de Fatores Concentração NaOH e RPM Centrífuga.

Combinar valores baixos de concentração de NaOH e baixas RPM de centrifugação fez com que as eficiências de separação fossem superiores aos casos em que são tomados isoladamente contra o Tempo de Exposição. Portanto, cruzar influências de baixas concentrações de NaOH e baixas RPM de rotações parece ser uma boa alternativa para separações celulares eficientes e de menor custo. A Tabela 4.1 abaixo faz uma comparação dos valores de resposta de % de separação celular nos testes efetuados isoladamente com cada fator e nos testes em que atuaram combinados conforme expresso na Fig. 4.21. Nota-se que em todos os casos há um ganho percentual considerável o que demonstra que a combinação de fatores de separação aperfeiçoa e melhora a separação célula-meio.

Tabela 4.1 – Comparação do Percentual de Células Separadas com Fatores Concentração NaOH e RPM Centrífuga agindo Isoladamente e com os mesmos Fatores agindo Combinados.

Concentração NaOH

10 minutos	1 M A	1 M B	2 M A	2 M B	3 M A	3 M B
% Células floculadas	45,02	50,00	50,52	53,14	78,54	76,18

RPM Centrífuga

1 minuto	1500 A	1500 B	2000 A	2000 B	2500 A	2500 B
% Células separadas	47,75	47,39	84,08	84,08	89,11	88,63

Conc. NaOH – RPM Centrífuga

1 minuto	1 M / 2500 RPM	1 M / 2500 RPM	2 M / 2500 RPM	2 M / 2500 RPM	3 M / 1500 RPM	3 M / 1500 RPM
% Células floculadas-separadas	90,38	89,63	94,85	94,22	94,47	94,59

1 M / 2000 RPM	1 M / 2000 RPM	2 M / 1500 RPM	2 M / 1500 RPM	3 M / 2000 RPM	3 M / 2000 RPM
79,07	79,01	73,20	74,23	95,99	95,68

1 M / 1500 RPM	1 M / 1500 RPM	2 M / 2000 RPM	2 M / 2000 RPM	3 M / 2500 RPM	3 M / 2500 RPM
60,14	61,22	87,12	86,20	96,62	96,28

2 M / 2000 RPM	2 M / 2000 RPM
86,37	84,83

2 M / 2000 RPM	2 M / 2000 RPM
85,51	85,63

2 M / 2000 RPM	2 M / 2000 RPM
83,85	86,31

IV.II – ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA PERCENTAGEM DE SEPARAÇÃO CELULAR VERSUS FATORES CONCENTRAÇÃO NAOH E RPM DE CENTRIFUGAÇÃO

Após a observação de que a combinação de fatores Concentração NaOH e RPM de Centrifugação foram mais eficientes conjuntamente para separação celular na Seção IV.I.V utilizou-se o software SURFACE_RESPO para desenvolver modelos de Superfície de Resposta de modo a prever o comportamento da Percentagem de Separação Celular em função dos níveis de Concentração NaOH e RPM de Centrifugação. O Software SURFACE_RESPO foi desenvolvido em MATLAB R2007a pela Equipe do Lab. H2CIN para tratamento estatístico de Análise de Superfícies de Resposta (SR) com dois fatores independentes sobre malhas experimentais fatoriais. Nesta categoria enquadra-se a Malha Experimental utilizada na Sec. IV.I.V cujos valores de Respostas e de Fatores são consolidados na Fig. 4.21 em referência ao Plano Experimental 3^2 de Concentração NaOH versus RPM de Centrifugação na Tabela 3.9 e na Fig. 3.13, envolvendo 09 Experimentos com um total de 24 réplicas (16 réplicas periféricas + 08 réplicas centrais).

O programa SURFACE_RESPO fornece uma grande gama de planilhas e gráficos de resultados, porém aqui só serão analisados os mais pertinentes. Os fatores independentes F_1 e F_2 considerados foram:

- Logaritmo da Concentração de NaOH (níveis 1M, 2M e 3M), representada no programa como $F_1 \equiv$ ln(C(NaOH)); e
- RPM de Centrifugação (níveis 1500 RPM, 2000 RPM e 2500 RPM), representada no programa por $F_2 \equiv$ RPM.

A Variável Dependente ou Resposta (Y) a ser modelada foi o Logaritmo da Percentagem de Células Floculadas, representada nas saídas do programa por $Y \equiv$ ln(%Cel.Floculadas). O melhor modelo de Superfície de Resposta (SR) apresentado pelo programa SURFACE_RESPO para os dados da Fig. 4.21 e pela análise de resultados foi o mostrado na Eq. (4.1) seguinte:

$$Y = \beta_0 + \beta_1.F_1 + \beta_2.F_2 + \beta_3.F_1.F_2 + \beta_4.F_1^2 + \beta_5.F_2^2 + \beta_6.F_1^2.F_2 + \beta_7 F_2^2.F_1 \qquad (4.1)$$

Modelo este de natureza cúbica a 8 parâmetros expressos pelas constantes $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4, \beta_5, \beta_6, \beta_7$. Os valores estimados são representados com o símbolo ^ acima da variável ou do parâmetro em questão como em $\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1, \hat{\beta}_2, \hat{\beta}_3, \hat{\beta}_4, \hat{\beta}_5, \hat{\beta}_6, \hat{\beta}_7$.

O modelo da Eq. (4.1) proposto pelo programa SURFACE_RESPO foi realmente o melhor por apresentar respostas preditas mais próximas dos valores observados na Fig. 4.21. O programa SURFACE_RESPO também exporta os resultados mostrados na Tabela 4.2 "*Significance Test of Parameters*" onde se apresentam os valores estimados para os parâmetros $\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1, \hat{\beta}_2, \hat{\beta}_3, \hat{\beta}_4, \hat{\beta}_5, \hat{\beta}_6, \hat{\beta}_7$ da Eq. (4.1) e se executa a avaliação de significância estatística dos mesmos parâmetros. Pode-se observar na Tabela 4.2 que todos os parâmetros são significantes, não havendo necessidade de excluir nenhum para aprimorar-se o modelo.

Outro ponto importante diz respeito às estatísticas S_R^2, S_L^2, S_Y^2 que são denominadas, respectivamente, ***Soma de Quadrados de Resíduos Modelo-Médias***, ***Soma de Quadrados de Resíduos Réplicas-Médias*** e ***Soma de Quadrados de Resíduos Modelo-Réplicas***. Os termos DFR, DFL, DFY são os Números de Graus de Liberdade (*Degrees of Freedom*) associados às estatísticas S_R^2, S_L^2, S_Y^2. Todas estas três Estatísticas são estimadores para a Variância Fundamental do Processo, sendo S_Y^2 considerada a melhor delas. Estas estatísticas são dadas pelas Eqs. (4.2), (4.3) e (4.4) abaixo:

$$S_R^2 = \frac{\sum_{i=1}^{N} P_i (\bar{Y}_i^E - \hat{Y}_i)^2}{DFR} \quad , \quad DFR = N - q - 1 \quad , \quad \bar{Y}_i^E = \frac{\sum_{j=1}^{P_i} Y_{ij}^E}{P_i} \tag{4.2}$$

$$S_L^2 = \frac{\sum_{i=1}^{N} \sum_{j=1}^{P_i} (Y_{ij}^E - \bar{Y}_i^E)^2}{DFL} \quad , \quad DFL = \sum_{i=1}^{N} P_i - N \tag{4.3}$$

$$S_Y^2 = \frac{\sum_{i=1}^{N} \sum_{j=1}^{P_i} (Y_{ij}^E - \hat{Y}_i)^2}{DFY} \quad , \quad DFY = \sum_{i=1}^{N} P_i - q - 1 \tag{4.4}$$

Onde i, j são índices de Experimento e de Réplica; $N, q+1, P_i$ são, respectivamente, o Número de Pontos Experimentais da malha ($N = 9$, na Fig. 3.13), o Número de

Parâmetros da SR na Eq. (4.1) ($q+1=8$) e o Número de Réplicas do Experimento i (na maioria deles $P_i = 2$, mas há o Ponto Central com $P_9 = 8$ como mostrado na Tabela 3.9 e na Fig. 3.13). Y_{ij}^E, $\overline{Y}_i^E$, $\hat{Y}_i$ são, respectivamente, a Resposta Experimental da Réplica j no Experimento i; a Resposta Experimental Média (*Observed Average*) do Experimento i e a Resposta Estimada pela Eq. (4.1) para o Ponto Experimental i dada por $\hat{Y}_i = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1.F_{1i} + \hat{\beta}_2.F_{2i} + \hat{\beta}_3.F_{1i}.F_{2i} + \hat{\beta}_4.F_{1i}^2 + \hat{\beta}_5.F_{2i}^2 + \hat{\beta}_6.F_{1i}^2.F_{2i} + \hat{\beta}_7 F_{2i}^2.F_{1i}$.

No presente caso, o valor de S_R^2 foi de 4.407e-007 demonstrando que o modelo responde bem às respostas experimentais de Percentagem de Células Separadas sobre o Plano Experimental na Fig. 3.13. O valor de S_Y^2 foi de 8.2888e-005 que também está baixo e muito próximo de S_L^2 que vale 8.8385e-005, o que aponta que o modelo está com bom desempenho para os dados em questão. Na Figura 4.22 o modelo de Superfície de Resposta na Eq. (4.1) foi submetido ao Teste F de Significância do Modelo por meio das estatísticas S_R^2 e S_L^2 (Teste F estabelece Modelo Aprovado se $S_R^2 / S_L^2 \leq 4.54$ = Abscissa Fisher a 95% Probabilidade com Graus de Liberdade $DFR=1$ e $DFL=15$). Por fim, o valor de S_L^2 sendo pequeno (menor do que 0,001) indica dados experimentais consistentes e de boa qualidade, com plausível distribuição Normal ao redor de Médias Experimentais com variância S_L^2.

Tabela 4.2 – Parâmetros Estimados e Testes de Significância no Modelo de Superfície de Resposta na Eq. (4.1).

<<<<< Significance Test of Parameters >>>>>				
NaOH/Centrifuga1 d ln(%Cel.Floculadas) vs ln(C(NaOH)), RPM [9Pts] [Y=B0+B1.F1+B2.F2+B3.F1.F2+B4.F1^2+B5.F2^2+B6.F1^2.F2+B7.F2^2.F1]				
N= 9, No.Y=24, Pars=8, DFR=1, S2R=4.407e-007, DFY=16, S2Y=8.2888e-005, DFL=15, S2L=8.8385e-005				
Estimated B0= 2.50877, B1= 0.91968, B2= 0.00146676, B3= -0.000914666, B4= 0.787302, B5= -2.68119e-007, B6= -0.000322293, B7= 2.32038e-007				
Parameter	Value	Test	Limit	Significant

B0	2.5088	482.7962	4.494	YES
B1	0.91968	26.72352	4.494	YES
B2	0.0014668	154.7586	4.494	YES
B3	-0.00091467	30.50721	4.494	YES
B4	0.7873	93.29786	4.494	YES
B5	-2.6812e-007	83.23583	4.494	YES
B6	-0.00032229	64.51479	4.494	YES
B7	2.3204e-007	22.78645	4.494	YES

```
<<<<< F Test of Model >>>>>
NaOH/Centrifuga1d ln(%Cel.Floculadas) vs ln(C(NaOH)), RPM [9Pts]
Y=B0+B1.F1+B2.F2+B3.F1.F2+B4.F1^2+B5.F2^2+B6.F1^2.F2+B7.F2^2.F1
N= 9, No.Y=24, Pars=8, DFR=1, S2R=4.407e-007, DFY=16, S2Y=8.2888e-005, DFL=15, S2L=8.8385e-005
Estimated B0= 2.50877, B1= 0.91968, B2= 0.00146676, B3= -0.000914666, B4= 0.787302, B5= -2.68119e-007, B6= -0.000322293, B7= 2.32038e-007

S2R/S2L= 0.00499, FI95%(df=1,df=15)= 4.54 --> <<<<< Model Accepted >>>>>
```

Exp. Point	No. Repl.	Factor F1 r	Factor F2 C(NaOH)(M)	RPMrpm	Average %Cel.Floculadas	Predicted %Cel.Floculadas	Lower 95%Confidence	Upper 95%Confidence	Std.Deviation %Cel.Floculadas
1	2	1	3	1500	94.53	94.541	93.301	95.798	0.589
2	2	1	3	2000	95.835	95.812	94.691	96.946	0.532
3	2	1	3	2500	96.45	96.461	95.196	97.743	0.601
4	2	1	2	2500	94.534	94.517	93.343	95.705	0.557
5	2	1	1	2500	90.004	90.01	88.804	91.234	0.573
6	2	1	1	2000	79.04	79.029	78.006	80.066	0.486
7	2	1	1	1500	60.678	60.682	59.868	61.506	0.386
8	2	1	2	1500	73.713	73.699	72.784	74.626	0.435
9	8	1	2	2000	85.722	85.73	85.196	86.268	0.253

Figura 4.22 – Teste F do Modelo com S^2_R , S^2_L e Abscissa Fisher a 95% Probabilidade (4.54): *Modelo Aceito*. Quadro de Fatores (F_1, F_2), Médias de Observações, Respostas Preditas (%Cel.Floculadas), Limites de Confiança a 95% de Prob. Inferior (*Lower*) e Superior (*Upper*) para Respostas Corretas e Desvio Padrão de Respostas Estimadas (% Cel.Floculadas) [Superfície de Resposta da Eq. (4.1)]

Na Figura 4.23 são locados em gráfico as Médias Experimentais dos $N=9$ pontos da malha na Fig. 3.13 versus as Predições das Respostas (%Cel.Floculadas) da Eq. (4.1). A distribuição sobre a linha diagonal dos 9 pontos retrata a excelente concordância do modelo Eq. (4.1) com as médias experimentais dos 9 pontos da malha.

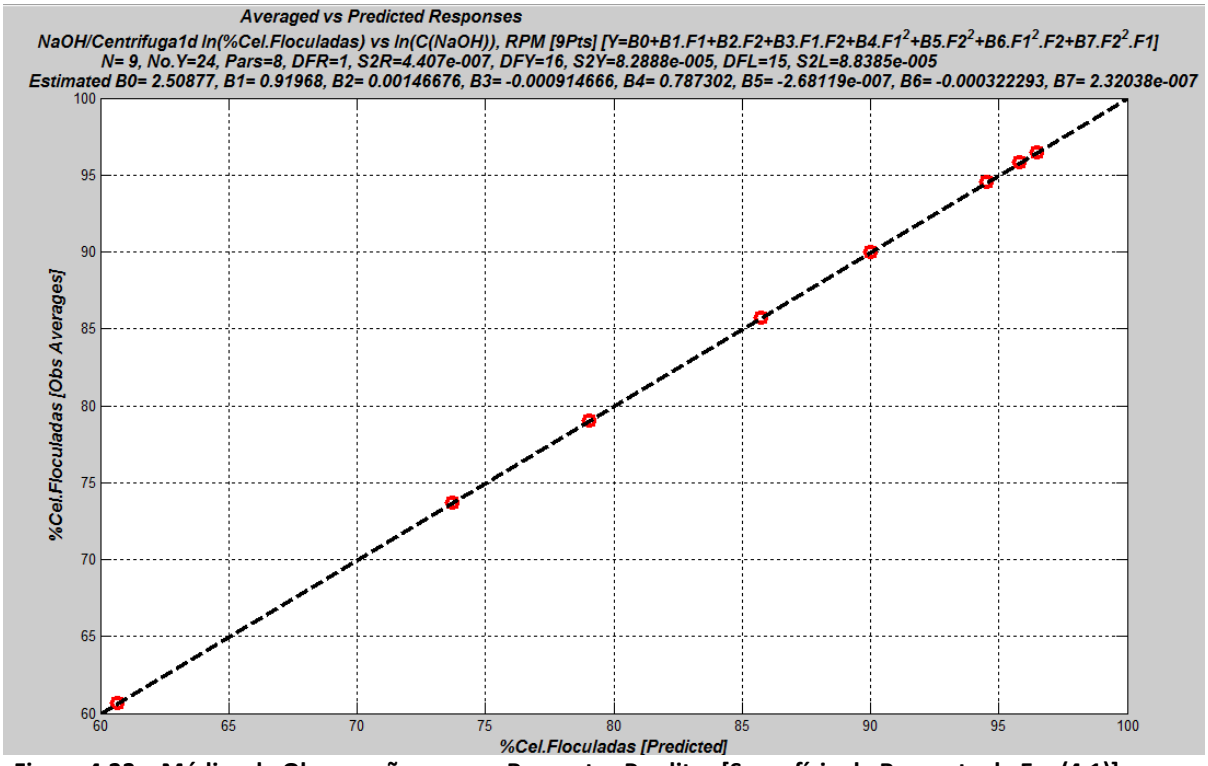

Figura 4.23 – Médias de Observações versus Respostas Preditas [Superfície de Resposta da Eq. (4.1)].

O conteúdo da Figura 4.24 é similar ao da Fig. 4.23, exceto que agora são lançados, contra as predições da Eq. (4.1), os próprios valores experimentais observados nas várias réplicas dos $N=9$ pontos da malha na Fig. 3.13. Observa-se que os valores preditos de %Cel. Floculadas e valores observados estão distribuídos próximos à linha diagonal, apontando que as predições do modelo Eq. (4.1) são boas, assim como as réplicas estão dispostas de forma consistente ao redor das predições de respostas do modelo (diagonal) indicando boa qualidade e equilíbrio dos valores experimentais.

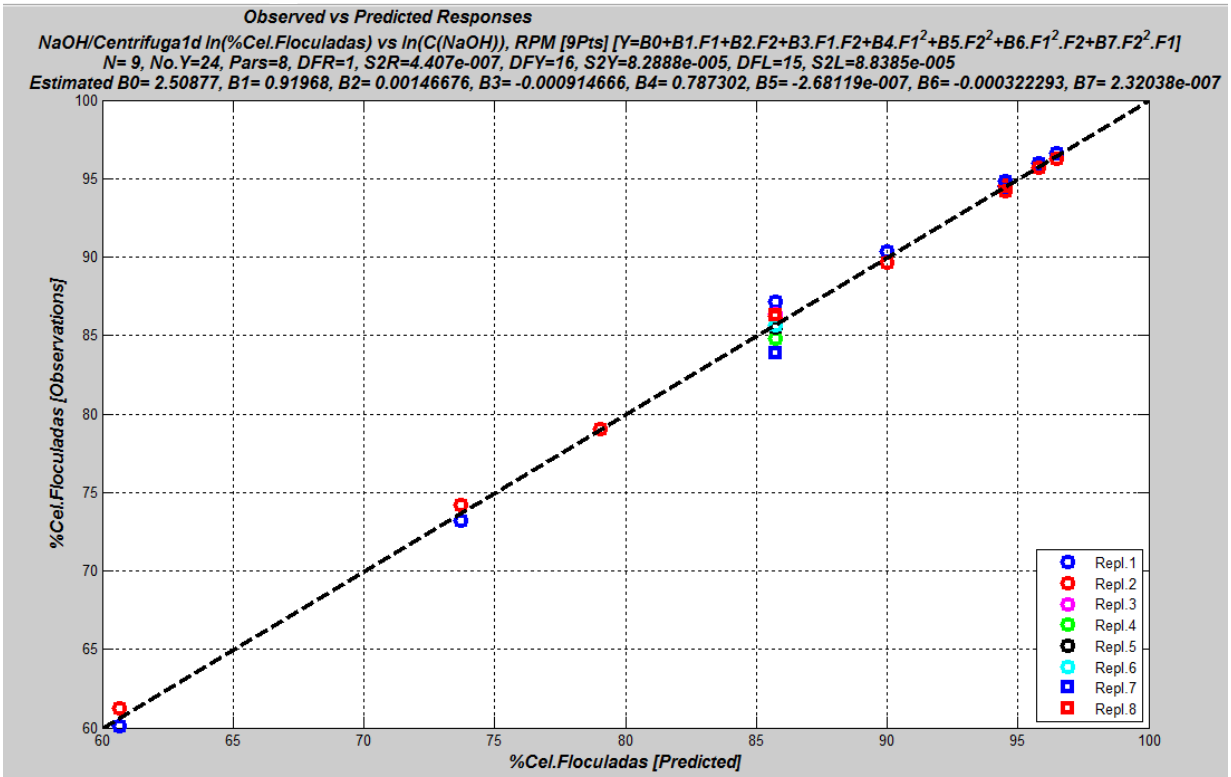

Figura 4.24 – Respostas Observadas (%Cel. Floculadas) em Réplicas versus Respostas Preditas via Eq. (4.1) [Superfície de Resposta da Eq. (4.1)]

A Figura 4.25 apresenta a Superfície de Resposta Eq. (4.1) propriamente dita, para prever Percentagem de Células separadas em função de RPM de Centrifugação e da Concentração de NaOH. Nesta Fig. 4.25 também são apresentadas as Superfícies de Limites de Confiança de 95% de probabilidade que “cercam” a Superfície de Resposta Eq. (4.1). Na Fig. 4.25 evidencia-se que quase todos os valores de respostas experimentais estão dentro do volume definido pelas “folhas” das Superfícies Limites de Confiança Inferior e Superior.

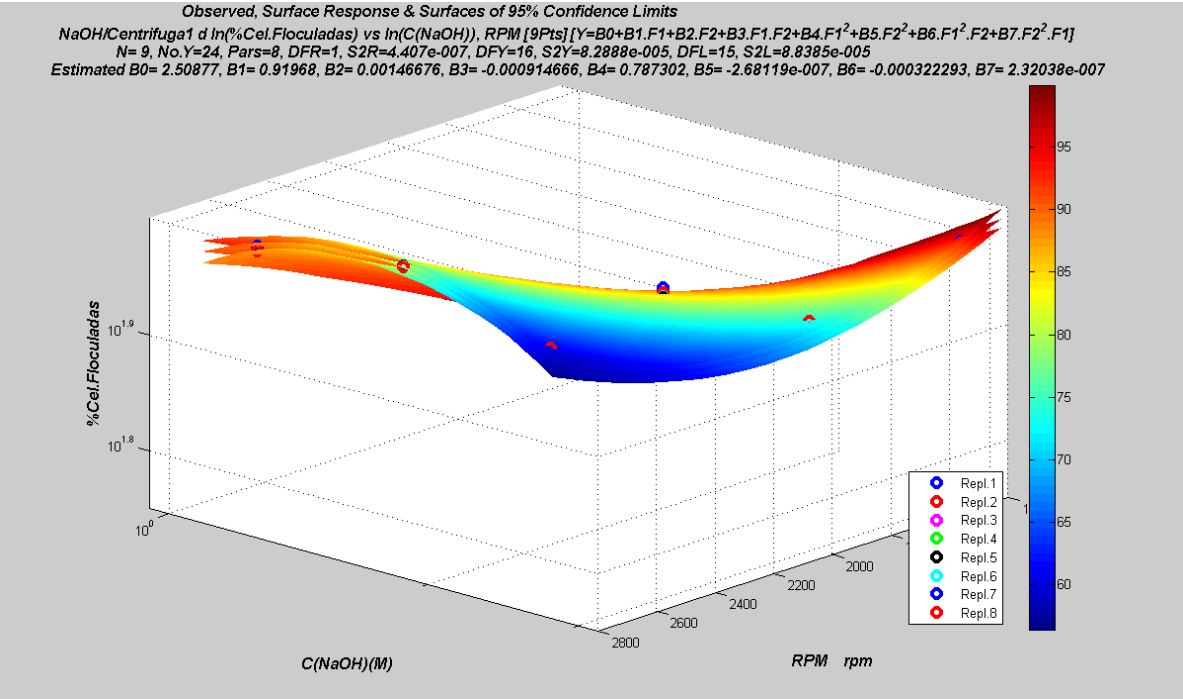

Figura 4.25 – Superfície de Resposta de Percentagem de Células Separadas e Superfícies Limites de Confiança (95%) [Superfície de Resposta da Eq. (4.1)]

As Figuras 4.26 e 4.27 apresentam diversos avaliadores estatísticos (e.g. Limites de Confiança 95% para Respostas Corretas, etc) das respostas geradas pela Eq. (4.1), após a estimação de parâmetros. Ambas Figs. 4.26 e 4.27 reportam dados locados contra o número do ponto experimental na Fig. 3.13 (1 a 9). Na Fig. 4.26 são locados as Médias Experimentais de %Cel.Floculada; as correspondentes Respostas Preditas pelo modelo; os Limites de Confiança (Superior e Inferior) a 95% de Probabilidade de Respostas Corretas e as Respostas Preditas acrescidas dos Desvios Padrões de Respostas Estimadas. É possível observar-se que Respostas Preditas e Médias de Respostas Observadas concordam muito bem, confinados pelo "corredor" de 95% de probabilidade de Respostas Corretas definido pelas curvas de Limites Inferior e Superior de Confiança a 95% de probabilidade. Tal "corredor" é bastante estreito o que caracteriza baixas incertezas, bom desempenho estatístico e pequeno desvio padrão de Respostas Estimadas (i.e. pequena variância de Respostas Estimadas). Em outras palavras, a estreiteza do "corredor" de 95% de probabilidade de Respostas Corretas significa indiretamente que as Respostas Estimadas (Preditas) pela

Eq. (4.1) estão realmente próximas das Respostas Corretas associadas ao fenômeno de Separação de Células por ação de Concentração de NaOH e RPM de Centrifugação.

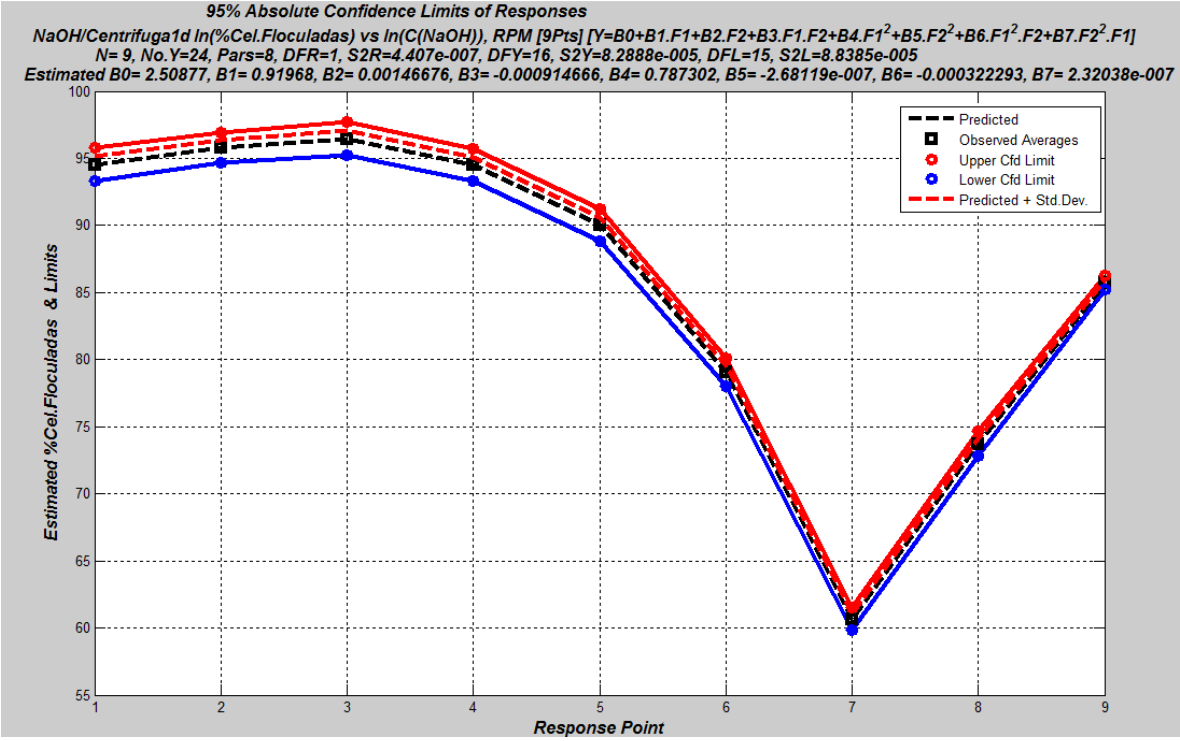

Figura 4.26 – Análise de Respostas da Superfície de Resposta na Eq. (4.1). Respostas de % Células Floculadas Estimadas (*Predicted*) vs Ponto; Médias de Observações (*Observed Averages*) de % Cel.Floculadas vs Ponto; Limites Inferior (*Lower Cfd*) e Superior (*Upper Cfd*) de Confiança a 95% de Prob. para Respostas Corretas; Respostas Preditas + Desvio Padrão de Predições versus Ponto.

A Fig. 4.27 apresenta essencialmente o mesmo conteúdo da Fig. 4.26, porém com ordenadas expressas como % de Desvio Relativo com respeito às Respostas Estimadas (*Predicted*) pelo modelo. Isto é, Limites de Confiança para Respostas Corretas são lançados como % das Respostas Preditas, sendo o mesmo feito para o Desvio Padrão % de Respostas Estimadas e para as Médias de Respostas Observadas. É interessante perceber que os afastamentos de Respostas Observadas das Respostas Preditas são diminutos, flutuando entre -0.02% e +0.05%. Do mesmo modo, é interessante realizar que o "corredor" de Limites de Confiança a 95% de Probabilidade da Fig. 4.26, aparece desta feita na Fig. 4.27 com impressionante mínima largura oscilando entre -0.3% e +0.3%. Isto é um indicador de que as Respostas Estimadas pela Eq. (4.1) estão incrivelmente próximas das Respostas Corretas associadas ao fenômeno de Separação de Células de microalga por ação cruzada de Concentração de NaOH e RPM de Centrifugação.

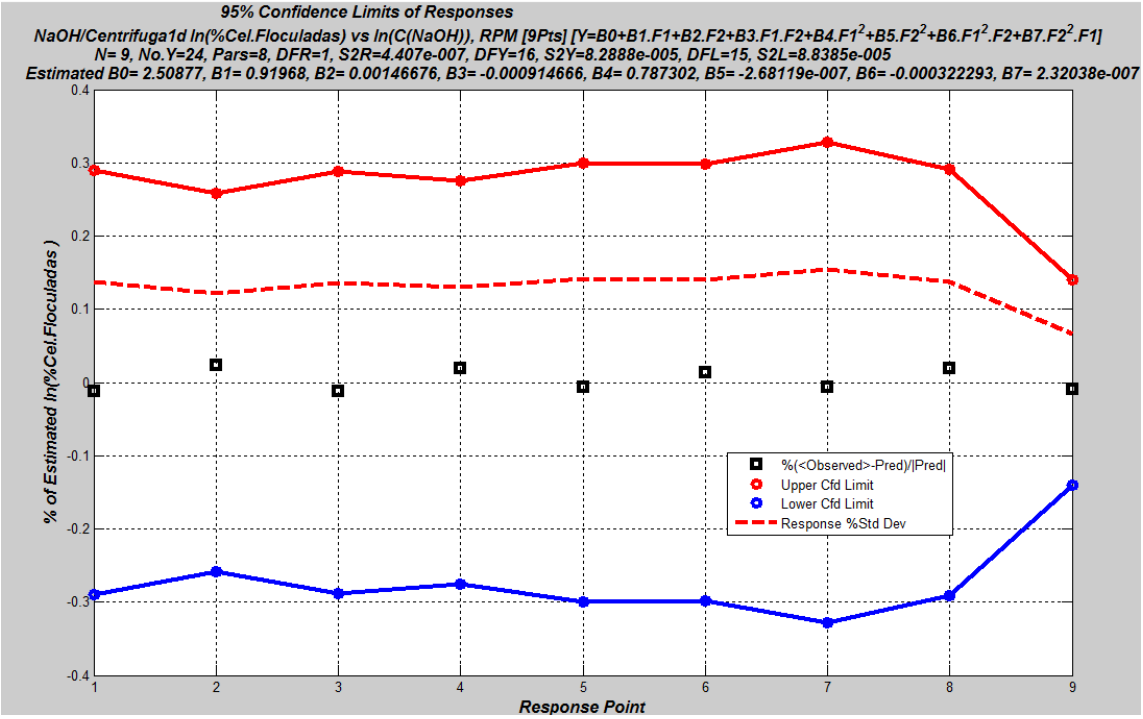

Figura 4.27 – Análise de Respostas da Superfície de Resposta na Eq. (4.1). Desvios Percentuais de Médias de Observações de % Cel.Floculadas (<*Observed*>) com respeito a Respostas de % Células Floculadas Estimadas (*Predicted*) versus Ponto; Desvios Percentuais de Limites de Confiança Inferior (*Lower Cfd*) e Superior (*Upper Cfd*) com 95% Probabilidade com respeito a Respostas Estimadas de %Cel.Floculadas; Desvio Padrão Percentual (% *Standard Deviation*) de Respostas Estimadas.

A Figura 4.28 representa em 3D a Matriz de Variâncias e Covariâncias de Respostas Estimadas (Preditas) para os 9 pontos da Fig. 3.13, sendo, portanto, uma matriz 9 X 9, simétrica e positiva-definida. É perceptível a ordem minúscula de magnitude dos termos desta matriz (todos abaixo de 5.10^{-5}) o que significa que as respostas preditas pelo modelo, nos pontos do Plano Experimental 3^2 da Fig. 3.13, têm Desvios Padrões também minúsculos da ordem de 0.007. Outro fato que chama a atenção tem a ver com a inequívoca dominância das 09 torres diagonais (variâncias de Respostas Preditas) sobre os termos não diagonais (covariâncias entre Respostas Preditas), significando pouca ou nenhuma correlação entre as Respostas Preditas pela Eq. (4.1) em pontos distintos da Malha Experimental da Fig. 3.13. Naturalmente, o Ponto 09 (ponto central), por possuir alta densidade de réplicas (08), induz mínima variância (incerteza) na resposta do modelo, sendo a torre diagonal correspondente a de menor tamanho na Fig. 4.28.

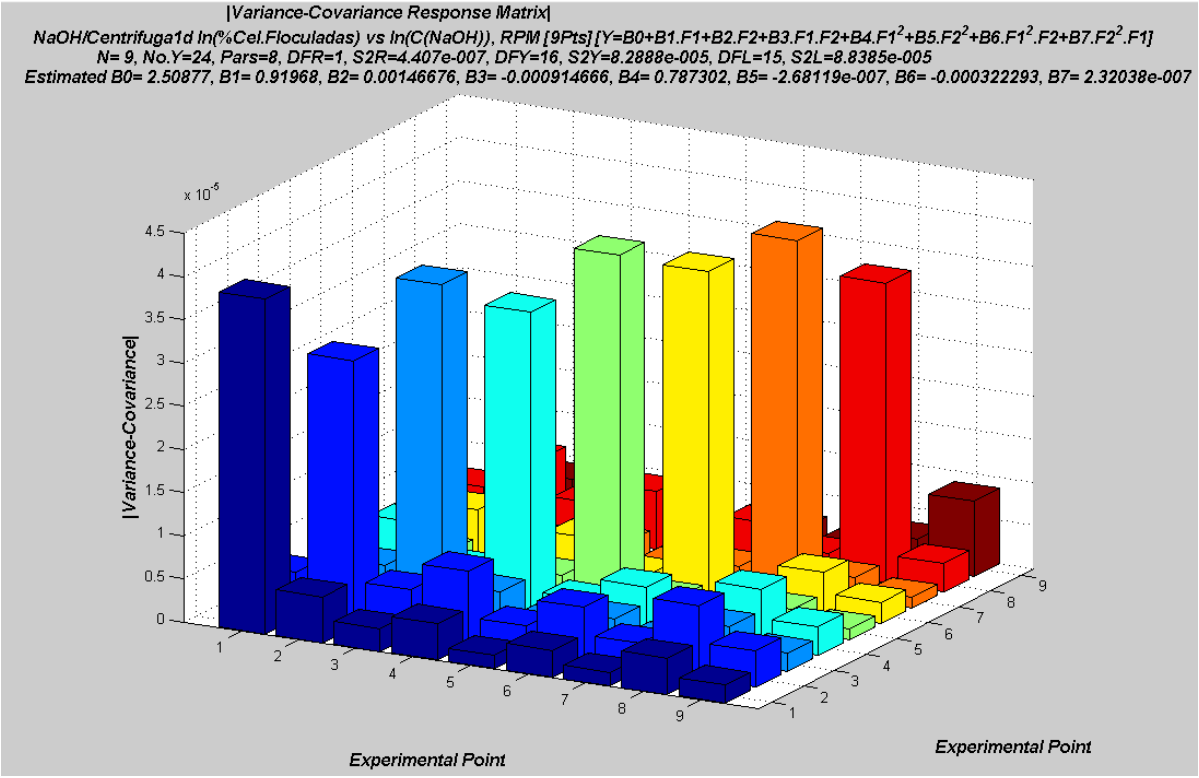

Figura 4.28 – Matriz Variâncias-Covariâncias de Respostas Estimadas [Superfície de Resposta da Eq. (4.1)].

A Figura 4.29 apresenta a distribuição de valores estimados dos 8 parâmetros (β_0 a β_7) do modelo na Eq. (4.1), seus Limites de Confiança Superior (*Upper Cfd*) e Inferior (*Lower Cfd*) a 95% de Probabilidade, bem como os valores estimados acrescidos dos respectivos Desvios Padrões. Os Limites de Confiança a 95% de Probabilidade situam-se bem próximo dos valores estimados para parâmetros, o que aponta o modelo como bem calibrado para explicar os dados no Plano Experimental da Fig. 3.13.

A Figura 4.30 representa em 3D a Matriz de Variâncias e Covariâncias (8 X 8) de Parâmetros Estimados. Ressalta-se que os valores têm também magnitude minúscula (ordem máxima de 10^{-2}) e que as torres diagonais (variâncias) são dominantes em comparação às torres não diagonais (covariâncias). Isto sinaliza que as incertezas dos parâmetros estimados são pequenas e que as correlações entre estes parâmetros também são pequenas, o que é bom.

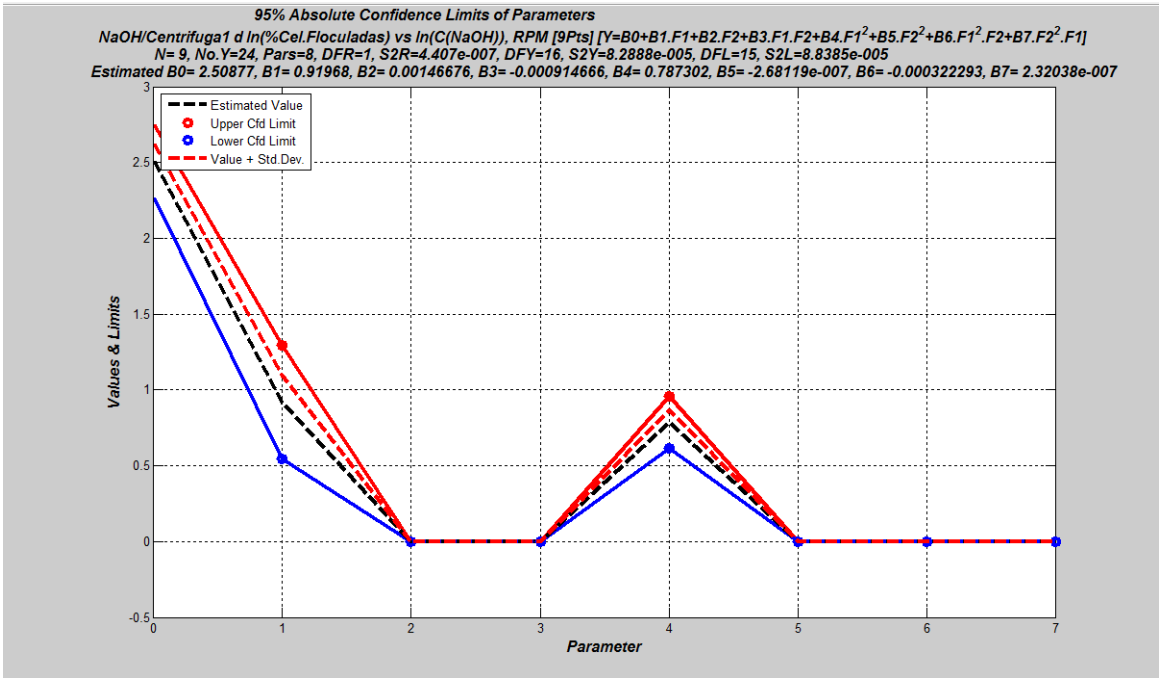

Figura 4.29 – Valores Absolutos de Parâmetros 0 a 7 Estimados e seus Limites de Confiança a 95% de Probabilidade para o Modelo de Superfície de Resposta na Eq. (4.1) para prever Percentagem de Células Separadas versus Concentração NaOH e RPM de Centrifugação.

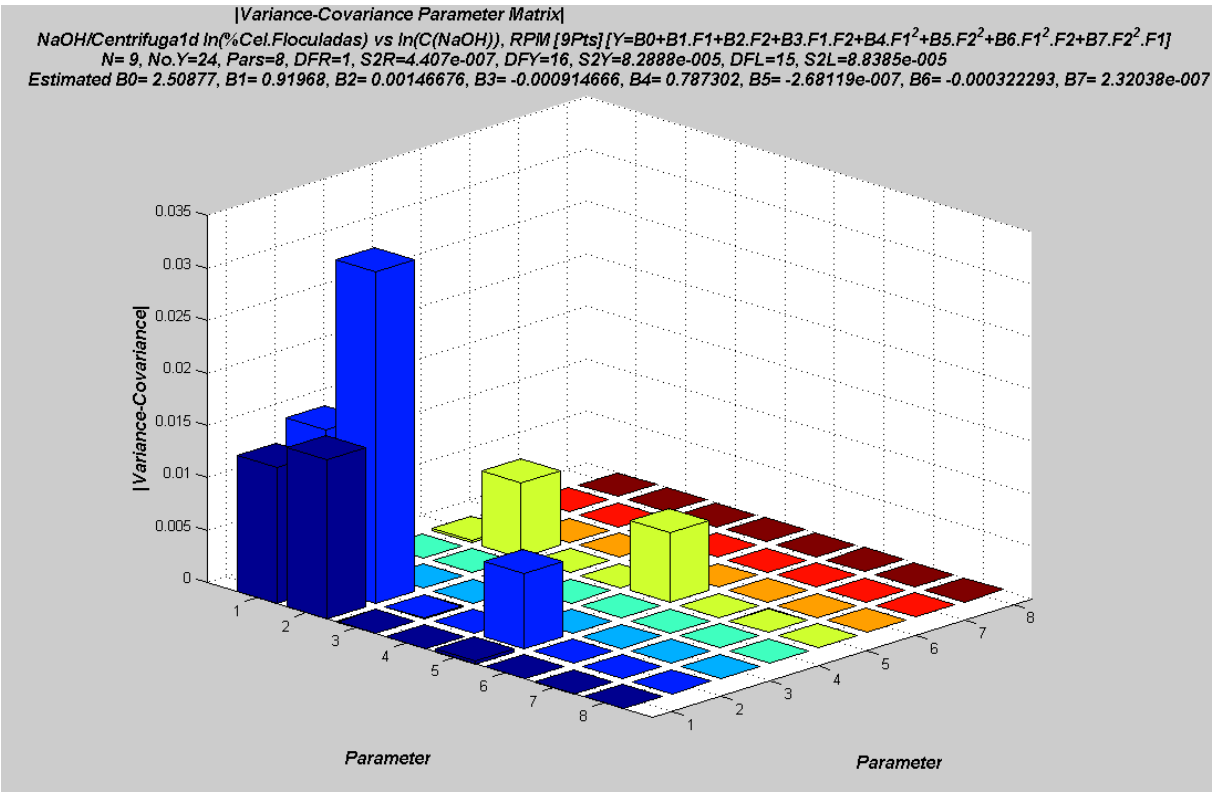

Figura 4.30 – Matriz Variâncias-Covariâncias de Parâmetros Estimados [Superfície de Resposta da Eq. (4.1)].

A Fig. 4.31 traz a projeção 3D da Região de Confiança a 95% de Probabilidade para Parâmetros Corretos da Eq. (4.1). Nesta projeção a Região de Confiança, originalmente um hiper-elipsóide multidimensional, é projetada com respeito à Tríade β_0, β_1, β_2, definindo o volume elipsoidal da Fig. 4.31 em que, com 95% de probabilidade, residiriam os corretos β_0, β_1, β_2, cabendo notar que as Regiões de Confiança de Parâmetros Corretos são volumes elipsoidais centrados nos Parâmetros Estimados na Tabela 4.2. A Fig. 4.32 aplica esta noção ao caso 2D em que se faz a projeção para uma Dupla de Parâmetros apenas, a saber, a Dupla β_0,β_1. O fato da Fig. 4.32 é que a Elipse de Confiança 95% da Dupla β_0,β_1 é realmente "estreita" em valores absolutos. Isto é, pela Fig. 4.32, é cabível dizer que o valor correto de β_0 situa-se, com alta probabilidade, entre 2.46 e 2.56, sendo estimado com 2.50877. Analogamente para β_1, a elipse de confiança mostra que seu valor correto situa-se, com alta probabilidade, entre 0.895 e 0.942, sendo estimado com 0.91968. Teoricamente, todos os pontos no interior de elipses e elipsoides de confiança são candidatos a parâmetros da Superfície de Resposta (Eq. (4.1)), de modo que, quanto menor o volume (ou área) de tais regiões maior a certeza no conhecimento dos parâmetros envolvidos; i.e. maior a proximidade entre valores estimados (Tabela 4.2) e os valores corretos de tais parâmetros.

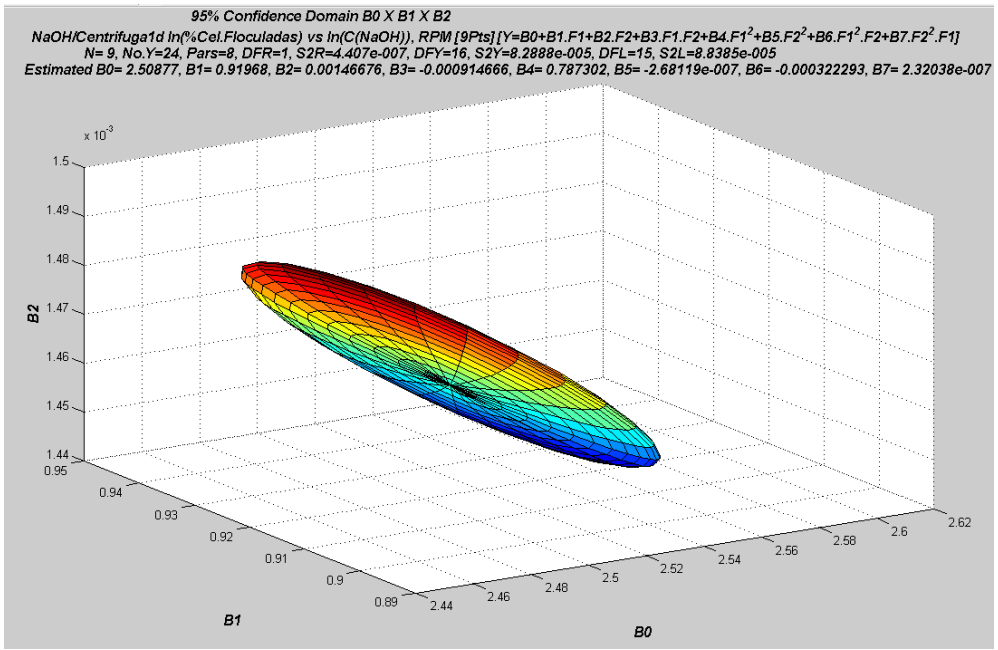

Figura 4.31 – Região de Confiança 3D a 95% de Probabilidade para Valores Corretos da Tríade de Parâmetros β_0, β_1, β_2 Centrada nos Valores Estimados destes Parâmetros [Superfície de Resposta na Eq. (4.1)].

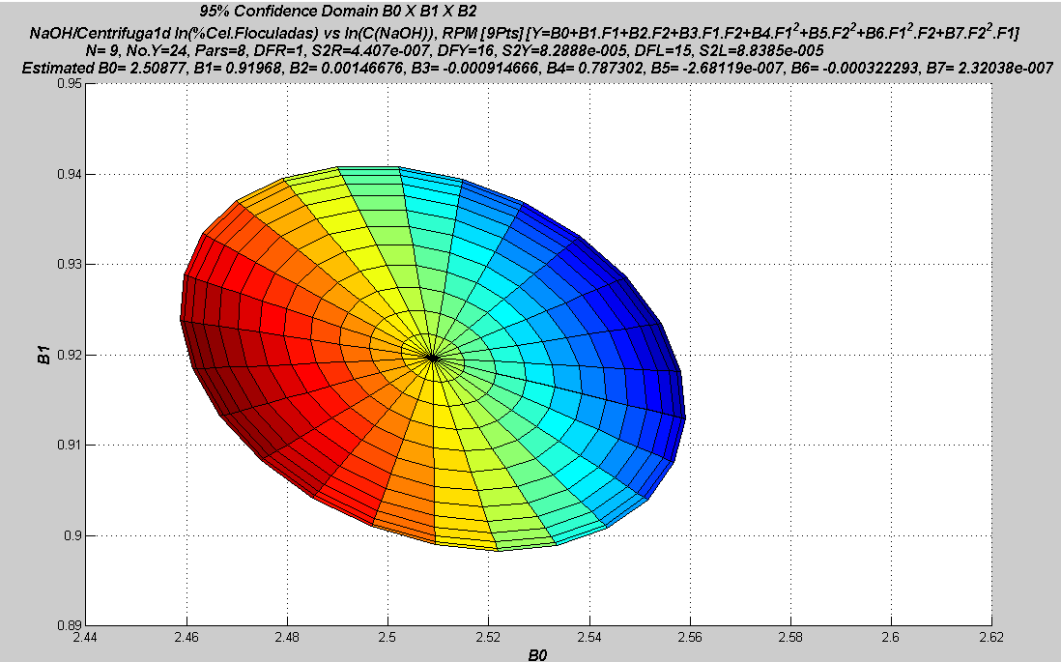

Figura 4.32 – Região de Confiança 2D a 95% de Probabilidade para Valores Corretos da Dupla de Parâmetros β_0, β_1 Centrada nos Valores Estimados destes Parâmetros [Superfície de Resposta na Eq. (4.1)].

A Figura 4.33 apresenta histogramas referentes às distribuições de Resíduos pertinentes à construção da Superfície de Resposta na Eq. (4.1) com dados das Figs. 4.21 e 3.13. Na Fig. 4.33A tem-se o histograma dos 24 resíduos Réplicas-Médias construídos com as diferenças $Y_{ij}^E - \overline{Y}_i^E$ entre a Resposta Experimental da Réplica j no Experimento i e a Resposta Experimental Média (*Observed Average*) do Experimento i, $i = 1..N$. Como estes resíduos têm media zero, são normais e sua variância é relacionada a S_L^2, este histograma é traçado juntamente com a Função Densidade Normal (PDF Normal) de média zero e variância S_L^2, PDF esta escalada para apresentar a mesma área que o histograma. A Fig. 4.33A reflete apenas características da massa de valores experimentais, não tendo nada em comum com o modelo de Superfície de Resposta utilizado. A concordância aproximada entre o histograma e o traçado da PDF Normal reflete que os valores experimentais têm consistência e equilíbrio, estando razoavelmente bem distribuídos ao redor de suas médias em cada ponto da malha. Já no caso da Fig. 4.33B, tem-se o histograma dos 24 resíduos Réplicas-Modelo construídos com as diferenças $Y_{ij}^E - \hat{Y}_i$ entre a Resposta Experimental da Réplica j no Experimento i e a Resposta Predita pelo Modelo no Experimento i, $\hat{Y}_i = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1.F_{1i} + \hat{\beta}_2.F_{2i} + \hat{\beta}_3.F_{1i}.F_{2i} + \hat{\beta}_4.F_{1i}^2 + \hat{\beta}_5.F_{2i}^2 + \hat{\beta}_6.F_{1i}^2.F_{2i} + \hat{\beta}_7 F_{2i}^2.F_{1i}$, $i = 1..N$.

Como estes resíduos também têm media zero, também são normais e sua variância é relacionada a S_Y^2, este histograma é traçado juntamente com a Função Densidade Normal (PDF Normal) de média zero e variância S_Y^2, PDF esta escalada para apresentar a mesma área que o histograma. Em oposição à anterior, a Fig. 4.33B depende das características dos dados experimentais e do modelo de Superfície de Resposta ajustado. Novamente há concordância aproximada entre o histograma e o traçado da PDF Normal, e, mais ainda, o histograma da Fig. 4.33B é muito similar ao da Fig. 4.33A, refletindo que a Superfície de Resposta tem excelente aderência às Médias Experimentais, podendo substituí-las no cálculo de resíduos que não haverá grandes alterações no histograma.

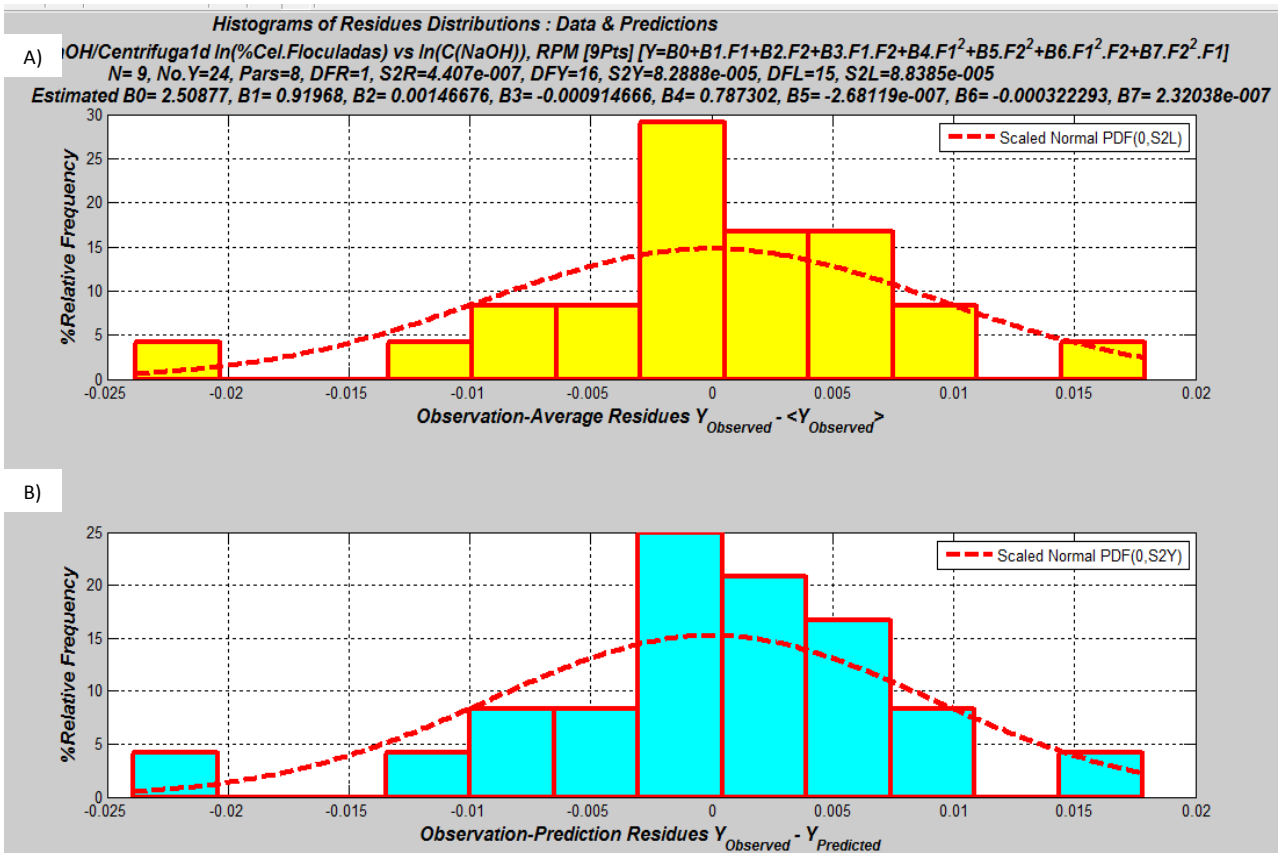

Figura 4.33 – Histogramas de Resíduos ($Y = ln(\%Cel.Floculadas)$) versus Função Densidade de Probabilidade Normal (PDF) [Superfície de Resposta na Eq. (4.1)]: (a) Resíduos $Y_{OBSERVED}$ - < $Y_{OBSERVED}$ > (PDF Escalada com Variância S^2_L)); (b) Resíduos $Y_{OBSERVED}$ - $Y_{PREDICTED}$ (PDF Escalada com Variância S^2_Y).

IV.II.I – DESEMPENHO DE SUPERFÍCIES DE RESPOSTA ALTERNATIVAS PARA PERCENTAGEM DE SEPARAÇÃO CELULAR VERSUS FATORES CONCENTRAÇÃO NaOH E RPM DE CENTRIFUGAÇÃO

É possível verificar que a Superfície de Resposta da Eq. (4.1) é realmente a melhor que poderá ser construída com os dados da Fig. 4.21 de % Cel. Floculadas versus Concentração NaOH e RPM de Centrifugação. Para isto bastará alterar levemente o modelo de Superfície de Resposta da Eq. (4.1) e verificar que o desempenho estatístico deteriora-se enormemente. Por exemplo, considere-se um modelo SR derivado da Eq. (4.1) pela remoção dos coeficientes β_6 , β_7 como mostrado na Eq. (4.5):

$$Y = \beta_0 + \beta_1.F_1 + \beta_2.F_2 + \beta_3.F_1.F_2 + \beta_4.F_1^2 + \beta_5.F_2^2 \qquad (4.5)$$

Submetendo-se este modelo de SR à regressão linear com os mesmos dados da Fig. 4.21 utilizados com a Eq. (4.1), verifica-se um ajuste de qualidade estatística muito inferior. Por exemplo, a Fig. 4.34 apresenta o desempenho de Respostas Preditas pela Eq. (4.5) versus Médias Experimentais dos $N=9$ pontos da Malha Experimental. Comparando-se esta Fig. 4.34 com a anterior Fig. 4.23 para a Superfície de Resposta da Eq. (4.1) tem-se noção de quanto houve de deterioração no desempenho da Eq. (4.5) em comparação com Eq. (4.1), já que agora há sensível perda de aderência de pontos à diagonal. O cabeçalho da Fig. 4.34 também informa forte degradação nas estatísticas S_R^2 e S_Y^2 que agora apresentam valores com ordens de grandeza superiores aos anteriores, a saber, agora têm-se $S_R^2 = 0.002716, S_Y^2 = 0.000526$, enquanto que para a Eq. (4.1) tinham-se $S_R^2 = 4.4.10^{-7}$, $S_Y^2 = 8.3.10^{-5}$. Estes valores altos para as estatísticas avaliadoras farão com que o modelo da Eq. (4.5) seja Rejeitado pelo Teste F do Modelo como mostrado na Fig. 4.35. Isto pode ser corroborado pela Fig. 4.36 (análoga à Fig. 4.27 para Eq. (4.1)) que apresenta o desempenho estatístico das Respostas Estimadas da SR da Eq. (4.5). Nesta Fig. 4.36, têm-se que as Médias Experimentais (*Observed Averages*) afastam-se das Respostas Estimadas pela Eq. (4.5) entre -2% a +3% (compare com a Eq. (4.1) onde tais afastamentos, como vistos na Fig. 4.27, situavam-se entre -0.02% e +0.03%), excedendo por larga margem os próprios Limites de Confiança de Respostas Corretas a 95% de probabilidade. A Fig. 4.37 apresenta a

Superfície de Resposta da Eq. (4.5) conjuntamente com os valores observados nas réplicas experimentais e com as superfícies de limites de confiança superior (*Upper Cfd*) e inferior (*Lower Cfd*). Pela Fig. 4.37 não é clara a perda de desempenho da SR Eq. (4.5) comparativamente à SR Eq. (4.1), mas as Figs. 4.34 e 4.36 não deixam dúvidas a respeito.

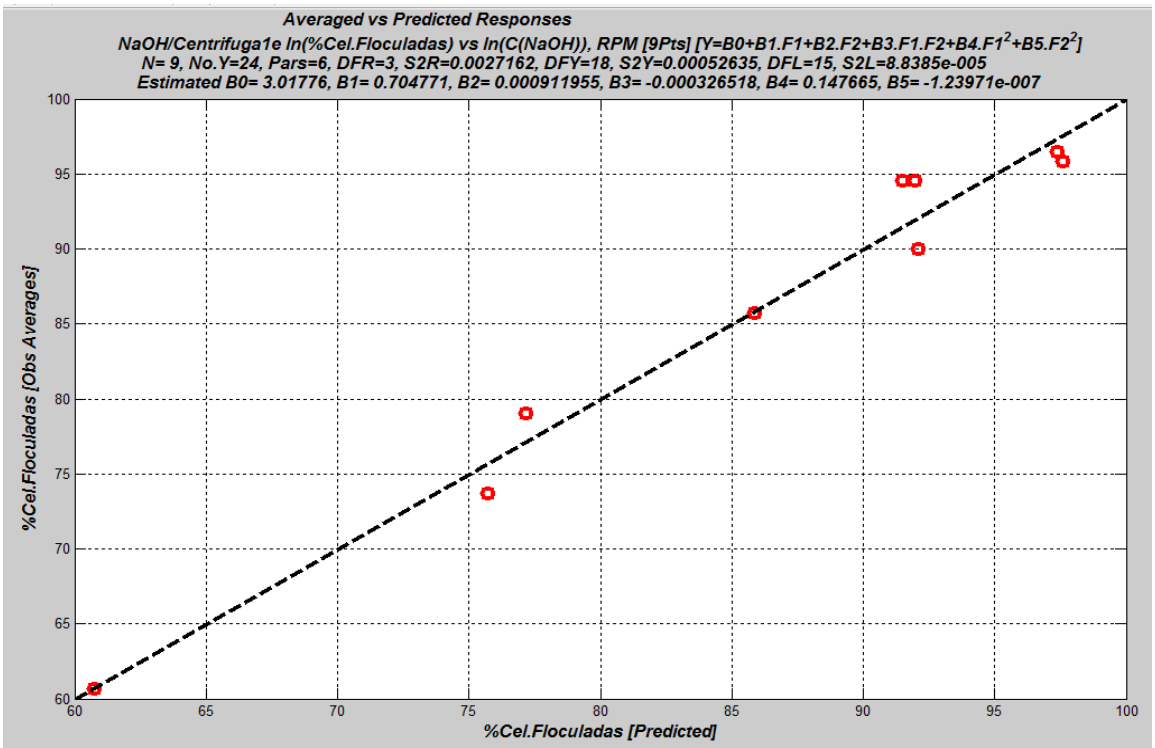

Figura 4.34 – Médias de Observações versus Respostas Preditas [Superfície de Resposta da Eq. (4.5)].

```
<<<<< F Test of Model >>>>>
NaOH/Centrifuga1e ln(%Cel.Floculadas) vs ln(C(NaOH)), RPM [9Pts]
Y=B0+B1.F1+B2.F2+B3.F1.F2+B4.F1^2+B5.F2^2
N= 9, No.Y=24, Pars=6, DFR=3, S2R=0.0027162, DFY=18, S2Y=0.00052635, DFL=15, S2L=8.8385e-005
Estimated B0= 3.01776, B1= 0.704771, B2= 0.000911955, B3= -0.000326518, B4= 0.147665, B5= -1.23971e-007

S2R/S2L= 30.7, FI95%(df=3,df=15)= 3.29 --> <<<<< Model Rejected >>>>>
```

Exp. Point	No. Repl.	Factor F1 r C(NaOH)(M)	Factor F2 RPMrpm	Average %Cel.Floculadas	Predicted %Cel.Floculadas	Lower 95%Confidence	Upper 95%Confidence	Std.Deviation %Cel.Floculadas
1	2	1	3	1500	94.53	91.944	89.278	94.69	1.29
2	2	1	3	2000	95.835	97.597	95.273	99.978	1.12
3	2	1	3	2500	96.45	97.372	94.548	100.28	1.36
4	2	1	2	2500	94.534	91.513	89.318	93.762	1.06
5	2	1	1	2500	90.004	92.096	89.279	95.002	1.36
6	2	1	1	2000	79.04	77.153	75.316	79.035	0.885
7	2	1	1	1500	60.678	60.75	58.892	62.666	0.898
8	2	1	2	1500	73.713	75.696	73.881	77.557	0.875
9	8	1	2	2000	85.722	85.85	84.524	87.195	0.636

Figura 4.35 –Teste F do Modelo com S^2_R , S^2_L e Abscissa Fisher a 95% Probabilidade (3.29): *Modelo Rejeitado.* Quadro de Fatores (F_1, F_2), Médias de Observações, Respostas Preditas (%Cel.Floculadas), Limites de Confiança a 95% de Prob. Inferior (*Lower*) e Superior (*Upper*) para Respostas Corretas e Desvio Padrão de Respostas Estimadas (% Cel.Floculadas) [Superfície de Resposta da Eq. (4.5)]

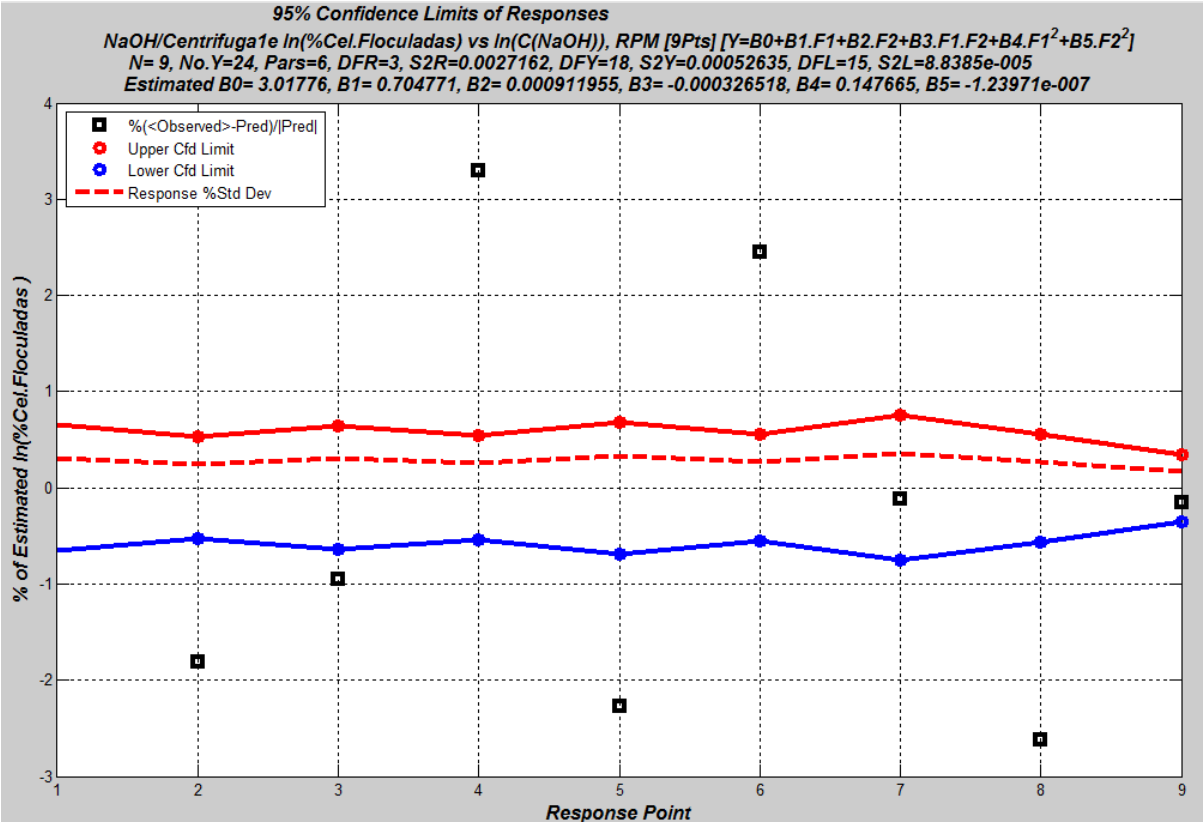

Figura 4.36 – Análise de Respostas da Superfície de Resposta na Eq. (4.5). Desvios % de Médias de Observações (<*Observed*>) relativos a Respostas de % Células Floculadas Estimadas (*Predicted*) versus Ponto; Desvios % de Limites de Confiança Inferior (*Lower Cfd*) e Superior (*Upper Cfd*) com 95% Probabilidade relativo a Respostas Estimadas de %Cel.Floculadas; Desvio Padrão % (% *Standard Deviation*) de Respostas Estimadas.

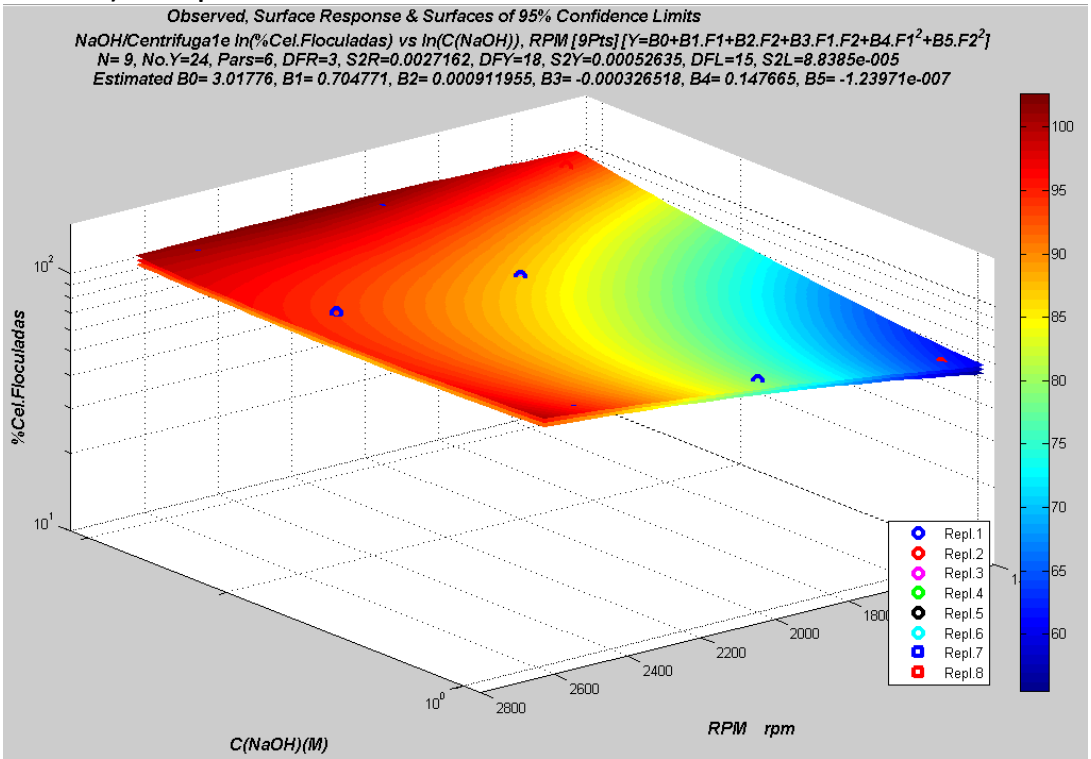

Figura 4.37 – Superfície de Resposta de Percentagem de Células Separadas e Superfícies Limites de Confiança (95%) [Superfície de Resposta da Eq. (4.5)]

CAPÍTULO V – CONCLUSÕES

V.I – CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Mediante o que foi exposto, observa-se que a utilização de microalgas como fonte de biomassa e produtos para a produção energética (substituindo ou complementando o petróleo) é bastante viável em termos econômico, social e ambiental. Porém, para que um biocombustível seja considerado ambientalmente adequado e economicamente' viável são necessários mais estudos relacionando-se o que é feito em bancada com a aplicação de cultivos em fotobiorreatores em escala industrial e simulação de processos.

Todas as fases, desde a escolha da espécie, meio de cultivo e esterilização; passando pelo fotobiorreator de produção industrial; até a extração da biomassa/produto e a geração de energia devem ser muito bem avaliadas de forma a gerar um produto de alto valor agregado. Dentre todas as fases de geração de biomassa em fotobiorreatores, a última, *downstream process*, é encarada como o gargalo da produção industrial, sendo assim há a necessidade de se buscarem técnicas de separação de biomassa do meio de cultivo. O presente estudo conclui e aponta importantes pontos na busca pela melhores soluções nesta última etapa do processo industrial de produção de biomassa:

- a injeção de mistura de ar comprimido e CO_2 no crescimento algal de *I. galbana* mostrou ser importante na busca pelo aumento da produtividade (concentração celular) em meio de cultivo salino, saindo de concentrações de 8-10 mi céls/mL se o CO_2 chegando até a 70-100 mi céls/mL;
- quanto mais concentrado foi o meio celular maior influencia deverá ter a técnica de separação (célula-meio de cultivo);
- não ter as fases separadas (concentrado celular x (*vesus*) sem concentrado celular) dificulta a continuidade do processo de produção de biomassa em fotobiorreatores já que a busca aqui é pela separação quase que por completa do meio e da biomassa;

- irradiância e temperatura não mostraram ser boas técnicas para se buscar a separação célula-meio de cultivo, apresentando valores aproximados de 60% de células separadas, mas sem separação de fase (concentrado celular x (*vesus*) sem concentrado celular);
- a utilização de NaOH com agente floculante apresentou valores percentuais significativos, podendo ser alcançada uma eficiência de mais de 90% (3M), porém em concentrações maiores há o rompimento celular, o que não é interessante ao sistema;
- para se utilizar o NaOH com floculante é necessário saber o grau de saturação limite que o próprio sistema irá suportar, e dispor de grandes volumes pode ser um problema para todo o sistema, além de poder gerar um passivo final;
- tentar re-inocular as células oriundas de separação a base de NaOH e um meio de cultivo (com nutrientes) novo sem injeção de CO_2 pareceu ser impossível e inviável devido ao fato do NaOH impossibilitar o desenvolvimento e crescimento da biomassa algal;
- em baixas rotações (1500/2000 RPM) e em pouco tempo (1/2/3 minutos) foi possível separar, de forma eficiente, mais que 80% das células do meio de cultivo;
- em rotações de 1500 até 3500 RPM (em até 3 minutos) não foi observado o rompimento da célula o que é importante para que se evite a perda da qualidade da biomassa e que, em caso de um sistema fechado como o fotobiorreator, o material não separado possa voltar ao sistema dando continuidade ao crescimento algal;
- utilizar duas técnicas juntas pode fazer com que os resultados razoáveis (60%-80% de separação da biomassa celular do meio de cultivo) sejam otimizados e melhorados, sendo o ocorrido quando foram realizados testes com NaOH e RPM em conjunto;
- os resultados analisados pela separação celular utilizando NaOH e RPM de forma conjunta fez com que os valores saíssem de valores médios de 50% de separação celular (1M e 1500RPM separadamente) e chegassem aos 60%, e

valores medianos de 60%-75% (2M e 2000RPM) fossem para quase 90% de eficiência.

- o Software SURFACE_RESPO (desenvolvido em MATLAB R2007a pela Equipe do Lab. H2CIN) foi a ferramenta utilizada para ajudar a apurar os resultados obtidos nos experimentos realizados e criar modelos para uma possível utilização em escala industrial;
- o Software SURFACE_RESPO apontou que o Modelo de natureza cúbica – abaixo – foi considerado muito bom e responde muito bem às respostas experimentais de Percentagem de Células Separadas sobre o Plano Experimental em questão $\hat{Y}_i = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1.F_{1i} + \hat{\beta}_2.F_{2i} + \hat{\beta}_3.F_{1i}.F_{2i} + \hat{\beta}_4.F_{1i}^2 + \hat{\beta}_5.F_{2i}^2 + \hat{\beta}_6.F_{1i}^2.F_{2i} + \hat{\beta}_7 F_{2i}^2.F_{1i}$
- o valor de S_R^2 (4.407e-007) demonstrou que o Modelo responde bem às respostas experimentais de Percentagem de Células Separadas sobre o Plano Experimental;
- o valor de S_Y^2 (8.2888e-005) foi muito baixo e muito próximo ao valor de S_L^2 (8.8385e-005) o que aponta que o Modelo está com bom desempenho para os dados em questão;
- o valor de S_L^2 (menor do que 0,001) indica dados experimentais consistentes e de boa qualidade, com plausível distribuição Normal ao redor de Médias Experimentais com variância S_L^2;
- alterar, mesmo que levemente, o modelo de Superfície de Resposta da Eq. (4.1) é possível verificar que o desempenho estatístico em diversos pontos deteriora-se enormemente apresentando dados de baixa qualidade;
- a utilização do Software SURFACE_RESPO ajuda a planejar e desenvolver um melhor modelo para que todo o processo estudado (separação biomassa-meio de cultivo) seja aplicado em escala industrial em processos de obtenção de biomassa algal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD A. L., Mat Yasin N. H., Derek C.J.C., Lim J.K. 2011. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 15, 584–593.

AMER L., Adhikari B., Pellegrino J. 2011. Technoeconomic analysis of five microalgae-to-biofuels processesof varying complexity. Bioresource Technology. 102, 9350–9359.

ANDERSEN R. A. 2005. Algal Culturing Techniques. Editora Elsevier Academic Press. 1ª ed. 596 p.

ANDERSON D. M., Stolzenbach K. D. 1985. Selective retention of two dinoflagellates in a well-mixed estuarine embayment: the importance of diel vertical migration and surface avoidance. Marine Ecology - Progress Series. Vol. 25, 39-50.

ANUÁRIO ESTATÍSTICO BRASILEIRO DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. 2012. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Brasília, Brasil. Disponível em: http://www.anp.gov.br/?pg=60983.

BLANCHEMAIN A, Grizeau D, Guary JC. 1999. Increased production of eicosapentaenoic acid by Skeletonema costatum cells after decantation at low temperature. J. Plank. Res. Vol. 13, 7, 497-501.

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

COLLOS Y., Mornet F., Sciandra A., Waser N., Larson A., Harrison P. J. 1999. An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures. Journal of Applied Phycology. 11, 179–184.

DEMIRBAS A. 2011. Biodiesel from oilgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: A solution to pollution problems. Applied Energy. 88, 3541–3547.

EISMANN, A. I. 2011. Electroestimulación de la microalga Isochrysis galbana. Projeto Final de Curso. Escuela de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de General San Martín. Buenos Aires, Argentina. 66 p.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 2011. Biofuels and the environment: first triennial report to congress. Environmental Protection Agency. Estados Unidos Office of Research and Development, National Center for Environmental Assessment, Washington, DC; EPA/600/R-10/183F. 220 p. Disponível em: http://epa.gov/ncea.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 2006. Life cycle assessment: principles and practice. Publicado pela National Risk Management Research Laboratory, Office Of Research And Development e U.S. Environmental Protection Agency (SAIC). 88 p.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. 2011. Balanço Energético Nacional 2011: Ano base 2010. Empresa de Pesquisa Energética. Brasil: Rio de Janeiro. 267 p. Disponível em: https://ben.epe.gov.br/downloads/Resultados_Pre_BEN_2011.pdf.

FALKOWSKI P.G., Raven J.A. 2007. Aquatic Photosynthesis: Second Edition published by Princeton University Press and copyrighted.

FLYNN K. J., Fashamz M. J. R. 2002. A Modelling Exploration of Vertical Migration by Phytoplankton. J. theor. Biol. 218, 471–484.

GUILLARD R. R. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith W. L.; Chanley M. H. [eds.], Culture of Marine Invertebrate Animals. New York plenum, 29-60.

HARITH Z. T., Yusoff F. M., Mohamed M. S., Din S. M. M., Ariff A. B. 2009. Effect of different flocculants on the flocculation performance of microalgae, Chaetoceros calcitrans, cells. African Journal of Biotechnology. Vol. 8 (21), 5971-5978.

HARUN R., Singh M., Forde G.M., Danquah M.K. 2010. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 14, 1037–1047.

HEANEY S.I., Eppley R. W. 1981. Light, temperature and nitrogen as interacting factors affecting diel vertical migrations of dinoflagellates in culture. J. Plankton. 331-344.

HORIUCHI J., Ohba I., Tada K., Kobayashi M., Kanno T., Kishimoto M. 2003. Effective cell harvesting of the halotolerant microalgae Dunaliella tertiolecta with pH control. Journal of Bioscience and Bioengineering. 95, 412–415.

HOUSE OF COMMONS ENVIRONMENTAL AUDIT COMMITTEE. 2008. Are biofuels sustainable? Publicado pela The Stationery Office. Reino Unido. Volume I. 45 p. Disponível em: www.parliament.uk/parliamentary_committees/environmental_audit_committee.cfm.

HUANGA Y.F., Huanga G. H., Hua Z. Y., Maqsooda I., Chakmad A. 2005. Development of an expert system for tackling the public's perception to climate-change impacts on petroleum industry. Expert Systems with Applications. 29, 817–829.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. 2007. Climate Change 2007: Synthesis Report. Sessão Plenária do IPCC XXVII. Valência, Espanha, 12-17 de Novembro de 2007.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. 2010. Sustainable Production of Second-Generation Biofuels Potential and perspectives in major economies and developing countries. OECD/IEA. 221 p.

KNUCKEY R. M., Brown M. R., Robert R., Frampton D. M. F. 2006. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. Aquacultural Engineering. 35,300–313

LAM M. K., LEE K. T. 2012. Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. Biotechnology Advances. 30, 673–690.

LIOR N. 2012a. Sustainable energy development (May 2011) with some game-changers. Energy. 40, 3-18.

LIOR N. 2012b. Sustainable energy development: The present (2011) situation and possible paths to the future. Energy. 43, 174-191.

MITBAVKAR S., Anil A. C. 2004. Vertical migratory rhythms of benthic diatoms in a tropical intertidal sand flat: influence of irradiance and tides. Marine Biology. 145, 9–20.

PARMAR A., Singh N. K., Pandey A., Gnansounou E., Madamwar D. 2011. Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. Bioresource Technology. 102, 10163–10172.

PICARDO M. C. 2012. Desempenho de *Isochrysis galbana* na produção de óleo e sequestro de CO_2 com fotobiorreator piloto. Tese de Doutorado. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 216 p.

PRICE C. A., Mendiola-Morgenthaler, L. R., Goldstein, M., Breden, E. N., Guillard, R. R. L. 1974. Harvest of planktonic marine algae by centrifugation into gradientes of sílica inthe CF-6 continuous-flow zonal rotor. Biol. Bull. 147, 136-145.

RIBEIRO S. C. P. 2012. Reuso de CO2 e Vinhoto Emitidos na Indústria de Bioetanol para Produção de Biocombustíveis e PUFA. Projeto Final de Curso. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 82 p.

RICHTER P. R., Hader D. P., Gonçalves R. J., Marcoval M. A., Villafane V. E., Helbling E. W. 2007. Vertical Migration and Motility Responses in Three Marine Phytoplankton Species Exposed to Solar Radiation. Photochemistry and Photobiology. 83, 810–817.

SAINI R., Kapoor R., Kumar R., Siddiqi T.O., Kumar A. 2011. CO_2 utilizing microbes — A comprehensive review. Biotechnology Advances. 29, 949–960.

SÁNCHEZ A., Maceiras R., Cancela A., Pérez A. 2012. Culture aspects of *Isochrysis galbana* for biodiesel production. Appl Energy. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.03.027

SALIM S., Vermuë M. H., Wijffels R.H. 2012. Ratio between autoflocculating and target microalgae affects the energy-efficient harvesting by bio-flocculation. Bioresource Technology. 118, 49–55.

SCHENK P. M.; Thomas-Hall S. R.; Stephens E.; Marx U. C.; Mussgnug J. H.; Posten C.; Kruse O.; Hankamer B. 2008. Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. Bioenerg. Res. 1, 20-43.

SCOTT S. A., Matthew P. D., John S. D., Irmtraud H., Christopher J. H., David J. L., Alison G. S. 2010. Biodiesel from algae: challenges and prospects. Current Opinion in Biotechnology. Vol 21. 3, 277-286.

SERIZAWAA H., Amemiyab T., Itoha K. 2010. Effects of buoyancy, transparency and zooplankton feeding on surface maxima and deep maxima: Comprehensive mathematical model for vertical distribution in cyanobacterial biomass. Ecological Modelling. 221, 2028–2037.

SINGH J., Gu S. 2010. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 14, 2596–2610.

SOUSA E. L. L., Macedo I. C. 2010. Etanol e bioeletricidade : a cana-de-açúcar no futuro da matriz energética. União da Indústria de Cana-de-Açúcar. São Paulo: Editora Luc Projetos de Comunicação, 315 p.

STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. 11th. ed. New York : American Public Health Association, 1960. xxi, 626 p.

SUALI E., Sarbatly, R. 2012. Conversion of microalgae to biofuel. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 16, 4316– 4342.

TOMAS C. R. 1997. Identifying Marine Phytoplankton. Editora Elsevier Academic Press. 1ª Ed. 857 p.

YANG J., Xu M., Zhang X., Hu Q., Sommerfeld M., Chen Y. 2011. Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: Water footprint and nutrients balance. Bioresource Technology. 102, 159–165

ZHAOA B., Zhanga Y., Xionga K., Zhanga Z., Haoa X., Liub T. 2011. Effect of cultivation mode on microalgal growth and CO2 fixation. Chemical Engineering Research and Design. 89, 1758–1762.