

Dissertação de Mestrado

Avaliação da produção de biodiesel de microalga *Isochrysis galbana* via transesterificação *in situ*

Zaniel Souto Dantas Procópio

Natal, Abril de 2014

Zaniel Souto Dantas Procópio

Avaliação da produção de biodiesel de microalga *Isochrysis galbana* via transesterificação *in situ*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química - PPGEQ, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, sob a orientação do Prof. Dr. Osvaldo Chiavone-Filho e coorientação da Profa. Dra. Ofélia Queiroz Fernandes de Araújo.

Natal/RN

Abril/2014

Catálogo da Publicação na Fonte.
UFRN / CT / DEQ
Biblioteca Setorial "Professor Horácio Nicolás Sólino".

Procópio, Zaniel Souto Dantas.

Avaliação da produção de biodiesel de microalga *Isochrysis galbana* via transesterificação *in situ* / Zaniel Souto Dantas Procópio. - Natal, 2014.
80 f.: il.

Orientador: Osvaldo Chiavone Filho.

Co-orientador: Ofélia Queiroz Fernandes de Araújo.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química.

1. Biodiesel - Dissertação. 2. Biocombustíveis - Dissertação. 3. Cinemática - Dissertação. I. Chiavone Filho, Osvaldo. II. Araújo, Ofélia Queiroz Fernandes de. III. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. IV. Título.

RN/UF

CDU 662.756.3(043.3)

PROCÓPIO, Z. S. D. – Avaliação da produção de biodiesel de microalga *Isochrysis galbana* via transesterificação *in situ*. Dissertação de mestrado, UFRN, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Área de concentração: Engenharia Química, Natal, RN, Brasil, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Chiavone-Filho.

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Ofélia Queiroz Fernandes Araújo.

RESUMO

As microalgas são organismos microscópicos fotossintetizantes que crescem rapidamente e em diferentes condições ambientais devido a sua simples estrutura celular. O cultivo de microalgas é um sistema biológico capaz de armazenar energia solar, através da produção de compostos orgânicos via processo fotossintético, sendo que a maioria das espécies apresenta crescimento mais rápido que as plantas terrestres, possibilitando maior rendimento de biomassa. Assim, compreende-se que o cultivo desses mecanismos fotossintetizantes se insere numa proposta relevante, uma vez que, quando comparados a outras matérias primas produtoras de óleo, apresentam uma produtividade significativamente maior, sendo, portanto, uma matéria-prima capaz de completar a demanda atual de biodiesel. O objetivo geral da dissertação foi a obtenção do biocombustível via processo de transesterificação do bio-óleo obtido a partir da microalga *Isochrysis galbana*. O estudo ainda teve por objetivos específicos estimar o uso de um fotobiorreator em nível laboratorial, para realização de experimentos de crescimento de microalgas; avaliar as características do biodiesel produzido por processo de transesterificação *in situ* da microalga; estudar uma nova rota para desinfecção deste meio de cultura, por meio do uso do agente químico hipoclorito de sódio. Com a introdução deste novo método foi possível obter a cinética de crescimento do cultivo para o fotobiorreator, além de obter a biomassa necessária para transformação nos experimentos de análise e obtenção do biodiesel. A pesquisa apontou resultados aceitáveis para as características verificadas no bio-óleo obtido, o qual se enquadrou nos padrões da resolução ANP Nº14, de 11.5.2012 – DOU 18.5.2012. Além disso, demonstrou-se que o fotobiorreator projetado atendeu às expectativas no que concerne ao crescimento do cultivo estudado e contribuiu amplamente para o desenvolvimento da espécie de microalga escolhida. Dessa maneira, pode-se constatar que a microalga *Isochrysis galbana* se mostrou uma espécie com potencial para a produção de biodiesel.

Palavras-Chave: Microalgas, biocombustível, fotobiorreator, transesterificação.

Zaniel Souto Dantas Procópio

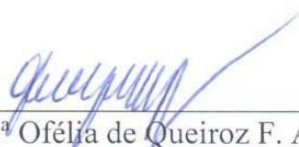
**Avaliação da produção de biodiesel de microalga *Isochrysis galbana* via
transesterificação *in situ***

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Química - PPGEQ, da Universidade Federal
do Rio Grande do Norte - UFRN, como
parte dos requisitos necessários para
obtenção do título de Mestre em Engenharia
Química.

Aprovado (a) em 04 / Abril / 2014



Prof. Dr. Osvaldo Chiavone-Filho
Orientador - UFRN



Prof.ª Dr.ª Ofélia de Queiroz F. Araújo
Coorientadora - UFRJ



Prof. Dr. Edson Luiz Foletto
Membro Externo - UFSM



Prof. Dr. Humberto Neves Maia de
Oliveira
Membro Interno - UFRN



Dr.ª Dannielle Janainne Silva
Membro Externo - USP

PROCÓPIO, Z. S. D. – Evaluation of biodiesel production from microalgae *Isochrysis galbana* via *in situ* transesterification. Dissertation, UFRN, PPGEQ, Natal, RN, Brazil, 2014.

Professor Advisor: Dr. Osvaldo Chivone-Filho

Professor Co-Advisor: Dr. Ofélia Queiroz Araújo Fernandes.

ABSTRACT

Microalgae are microscopic photosynthetic organisms that grow rapidly and in different environmental conditions due to their simple cellular structure. The cultivation of microalgae is a biological system capable of storing solar energy through the production of organic compounds via photosynthesis, and these species presents growth faster than land plants, enabling higher biomass yield. Thus, it is understood that the cultivation of these photosynthetic mechanisms is part of a relevant proposal, since, when compared to other oil producing raw materials, they have a significantly higher productivity, thus being a raw material able to complete the current demand by biodiesel . The overall aim of the thesis was to obtain biofuel via transesterification process of bio oil from the microalgae *Isochrysis galbana*. The specific objective was to estimate the use of a photobioreactor at the laboratory level, for the experiments of microalgae growth; evaluating the characteristics of biodiesel from microalgae produced by *in situ* transesterification process; studying a new route for disinfection of microalgae cultivation, through the use of the chemical agent sodium hypochlorite. The introduction of this new method allowed obtaining the kinetics of the photobioreactor for cultivation, besides getting the biomass needed for processing and analysis of experiments in obtaining biodiesel. The research showed acceptable results for the characteristics observed in the bio oil obtained, which fell within the standards of ANP Resolution No. 14, dated 11.5.2012 - 18.5.2012. Furthermore, it was demonstrated that the photobioreactor designed meet expectations about study culture growth and has contributed largely to the development of the chosen species of microalgae. Thus, it can be seen that the microalgae *Isochrysis galbana* showed a species with potential for biodiesel production.

Key-words: Microalgae, biofuel, photobioreactor, transesterification.

“Existe apenas um bem, o saber, e apenas um mal, a ignorância.”

SÓCRATES

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que consentiu que tudo ocorresse bem, ao longo de minha vida, e não somente nestes anos como universitário.

Ao maior mestre que alguém pode conhecer, Jesus Cristo, pela proteção, força e equilíbrio em todos os momentos.

A minha mãe, Eldimar, por tudo. Sem ela não teria chegado até aqui.

A minha esposa e confidente, Aline Rachel, obrigado pela paciência, pelo incentivo, pela força e principalmente por todo o seu carinho. Valeu a pena toda a distância, todos os momentos de ausência e por nossas renúncias. Hoje estamos alcançando, juntos, os louros do nosso empenho. Esta vitória é muito mais sua do que minha.

Ao Guardian pelo apoio e por ser sempre a minha válvula de escape.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Ofélia de Queiroz Fernandes de Araújo pela oportunidade, apoio e confiança.

Ao meu orientador Prof. Dr. Osvaldo Chiavone-Filho pelo ensino, paciência e pelo amor dado em forma de conselhos e cuidados.

Aos Professores da UFRN e da UFRJ que de uma forma ou de outra contribuíram com seus ensinamentos e com a utilização dos seus laboratórios para o desenvolvimento desta e muitas outras pesquisas.

Aos alunos de doutorado Saulo Henrique Gomes de Azevêdo, Bruna Maria Emerenciano das Chagas e Graciana Dantas pela grande ajuda fornecida.

Às minhas amigas Alejandra e Claudia pela amizade e carinho.

As funcionárias Mazinha e Maria pela amizade e apoio.

Aos Coordenadores da Pós-graduação pelo apoio e compreensão.

Ao Professor Dr. Humberto Neves Maia de Oliveira e a Dr^a. Dannielle Janaine Silva pelas contribuições na banca de qualificação de mestrado.

Aos companheiros de pesquisa do NUPEG por tantos dias juntos dentro do laboratório.

A Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da UFRN.

Ao Programa PRH-14 da ANP pelo suporte e apoio a pesquisa.

A PETROBRAS pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	2
1.1 - Objetivo geral.....	4
1.2 - Objetivos específicos.....	4
2. Revisão Bibliográfica.....	6
2.1 - Desenvolvimento sustentável.....	6
2.2 - Biodiesel: História e perspectiva mundial	7
2.3 - Biodiesel no Brasil	7
2.4 - Microalgas e suas particularidades.....	14
2.4.1 - <i>Isochrysis galbana</i>	16
2.4.2 - Biofixação de CO ₂	17
2.5 - Cultivos de Microalgas: Lagoas e Fotobiorreatores.....	18
2.5.1 - Principais Fotobiorreatores.....	21
2.5.1.1 - Fotobiorreator Tubular.....	21
2.5.1.2 - Fotobiorreator de coluna vertical	23
2.5.1.3 - Fotobiorreator de placa plana	24
2.6 - Tratamento do meio de cultivo	26
2.7 - Métodos de extração de óleo de microalga.....	27
2.7.1 - Transesterificação	28
2.7.1.1 - Transesterificação <i>in situ</i>	30
3. Metodologia.....	32
3.1 - Microrganismo	32
3.2 - Meio de Cultivo.....	32
3.2.1 - Aclimação prévia	34
3.3 - Condições de cultivo	34
3.3.1 - Cultivo em batelada	34
3.4 - Acompanhamento do crescimento celular	35
3.5 - Desinfecção da cultura microalgal	36
3.6 - Obtenção e preparação da biomassa para transesterificação	37
3.7 - Procedimentos de obtenção e quantificação de lipídios	39
3.7.1 - Análises e caracterizações	40
3.7.1.1 - Transesterificação da biomassa e análise de ésteres totais	40
3.7.1.2 - Umidade	41

3.7.1.3 - Índice de acidez	42
3.7.1.4 - Massa específica a 20° C.....	42
3.7.1.5 - Viscosidade cinemática a 40 °C	43
3.7.1.6 - Poder calorífico	43
4. Resultado e discussões	46
4.1 - Crescimento celular e modificação do processo de esterilização dos cultivos	46
4.1.1 - Teste de adição de hipoclorito	46
4.1.2 - Taxa de crescimento e rendimento celular	51
4.1.3 - Simulação e extrapolação da cinética do fotobiorreator	53
4.2 - Biomassa	54
4.3 - Caracterização do biocombustível	56
4.3.1 - Transesterificação <i>in situ</i> da biomassa	56
4.3.2 - Teor de éster	57
4.3.3 - Massa específica	59
4.3.4 - Viscosidade cinemática	59
4.3.5 - Teor de água	60
4.3.6 - Acidez total.....	60
4.3.7 - Poder calorífico.....	61
4.4 – Comparação dos parâmetros físico-químicos do biodiesel de microalga e a resolução ANP	61
5. Conclusões	64
6. Referências Bibliográficas	67
ANEXO A	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Intervalo de crescimento	2
Figura 2.1 - Evolução mensal da produção, da demanda compulsória e da capacidade nominal autorizada pela ANP (2011).	10
Figura 2.2 - Evolução anual da produção, da demanda compulsória e da capacidade nominal autorizada pela ANP	11
Figura 2.3 - Principais matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel (janeiro/2010 a outubro/2011)	11
Figura 2.4 - <i>Isochrysis galbana</i>	16
Figura 2.5 - Diagrama simplificado do processo fotossintético.	18
Figura 2.6 - Cultivo de algas crescendo em tanques abertos em Israel.	19
Figura 2.7 - Esquema simplificado de um fotobiorreator tubular;	22
Figura 2.8 - Fotobiorreator tubular com capacidade de 1000L na Universidade de Murdoch, Austrália.	22
Figura 2.9 - Fotobiorreator do tipo coluna	23
Figura 2.10 - Conjunto de fotobiorreatores do tipo placas planas	24
Figura 2.11 - a) Reação geral para uma reação de transesterificação; b) Reação geral da transesterificação de um triacilglicerídeo.....	29
Figura 3.1 - Fotobiorreator cultivo <i>indoor</i>	35
Figura 3.2 - Fotobiorreator.	37
Figura 3.3 - Fluxograma de obtenção do biodiesel.....	38
Figura 3.4 - Titulador Potenciométrico Metrohm 831	41
Figura 3.5 - Módulo de Medição da Densidade	43
Figura 3.6 - Reator e célula de explosão	44
Figura 4.1 - Curvas de crescimento de <i>Isochrysis galbana</i> para cultivos aditivados com hipoclorito de sódio a 5% e 10% em v/v. A curva representa a média de três experimentos independentes.	47
Figura 4.2 - Curvas de crescimento de <i>Isochrysis galbana</i> para cultivos aditivados com hipoclorito de sódio a 1% v/v. A curva representa a média de três experimentos independentes.	48
Figura 4.3 - Curvas de crescimento de <i>Isochrysis galbana</i> para cultivos aditivados com hipoclorito de sódio a 0,1% v/v. A curva representa a média de três experimentos independentes.	48

Figura 4.4 - Curvas de crescimento de <i>Isochrysis galbana</i> para cultivos aditivados com hipoclorito de sódio a 0,01% v/v. A curva representa a média de três experimentos independentes.	49
Figura 4.5 - Comparação de crescimento microalgal entre o meio com água autoclavada e com a adição de hipoclorito de sódio a 0,01% v/v.	50
Figura 4.6 - Modelo de cultivo usado para produção de biomassa.	51
Figura 4.7 - Taxa de crescimento da microalga <i>Isochrysis galbana</i> com cultivo padrão.	52
Figura 4.8 - Taxa de crescimento da microalga <i>Isochrysis galbana</i> com cultivo 0,01% v/v de hipoclorito.	52
Figura 4.9 - Correlação dos dados experimentais.	53
Figura 4.10 - Simulação e extrapolação utilizando equação para cultivos de 7 dias e comparação com dados de cultivos de 15 dias.	54
Figura 4.11 - Biomassa seca.	55
Figura 4.12 - Biomassa triturada.	55
Figura 4.13 - Separação dos produtos produzido por transesterificação <i>in situ</i>	56
Figura 4.14 - Biodiesel tratado.	57
Figura 4.15 - Cromatograma do biodiesel.	58

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 - Produtividade dos mais importantes cereais produtores de biocombustíveis	12
Tabela 2.2 - Concentração de lipídios e produtividade de algumas classes de microalgas	15
Tabela 2.3 - Comparação dos sistemas de cultivos de microalgas <i>raceways ponds</i> (lagoa) e fotobiorreator.....	20
Tabela 2.4 - Comparação entres os principais modelos de cultura de microalga.....	24
Tabela 3.1 - Composição do meio f/2 modificado de Guillard (1975), para culturas de microalgas marinhas.	33
Tabela 3.2 – Procedimento experimental para produção de Biodiesel.	38
Tabela 4.1 - Nomenclatura de ácidos graxos saturados e poliinsaturados.....	58
Tabela 4.2 - Comparação entre os parâmetros físico-químicos do biodiesel de microalga e a resolução ANP.	61
Tabela A1 - Especificações do Biodiesel.....	78

NOMENCLATURA

ANP: Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

AOCS: *American Oil Chemists' Society*

API: Área do padrão interno

At: Somatória das áreas dos componentes majoritários do biodiesel e do padrão interno

ATP: Adenosina Trifosfato

Camostra: Concentração da amostra injetada (mg/mL)

CMMAD: Comissão Mundial sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento

CPI: Concentração do padrão interno injetado (mg/mL)

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

FSI: Fotossistema I

FSII: Fotossistema II

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

H₂CIN: Laboratório de Hidrorrefino, Engenharia de Processos e Termodinâmica Aplicada

IUPAC: : International Union of Pure and Applied Chemistry

m: Massa (kg)

M: Molaridade (mol.L⁻¹)

MCT: Ministério da Ciência e Tecnologia

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

NUPEG: Núcleo de Pesquisa em Petróleo e Gás

ONU: Organização das Nações Unidas

Q: Calor da reação (J)

RPM: Rotações por minuto

t: Tempo (dia)

TAG: Triglicerídeos

UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro

UFRN: Universidade Federal do Rio Grande do Norte

V: Volume (mL)

X: Concentração celular (cel/mL)

ΔT: Variação de temperatura (K)

μ: Taxa específica de crescimento (dia⁻¹)

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1. Introdução

As atuais reflexões acerca da problemática ambiental convergem para medidas que promovam a conservação do planeta e de suas fontes naturais, de modo a compensar os resultados decorrentes do desenvolvimento industrial desenfreado, o qual gerou, como importante consequência, a degradação de biomas, os impactos climáticos e o desgaste das fontes energéticas mundiais. Conforme se apresenta na Figura 1.1, as descobertas globais de petróleo tiveram seu pico por volta dos anos 60; desta data em diante percebe-se o aumento no consumo do petróleo ao passo que a cada ano decorrido a quantidade de óleo descoberta decresce. Murphy (2011) discute que esta relação descoberta versus consumo não causa nenhum problema imediato, já que ainda tem-se um acúmulo de óleo a ser explorado. No entanto, a tendência gráfica informa que da mesma maneira que houve um pico de descoberta de óleo no passado, é inevitável que deva ocorrer um pico de consumo no futuro; todavia a disponibilidade do petróleo não irá acompanhar a demanda energética.

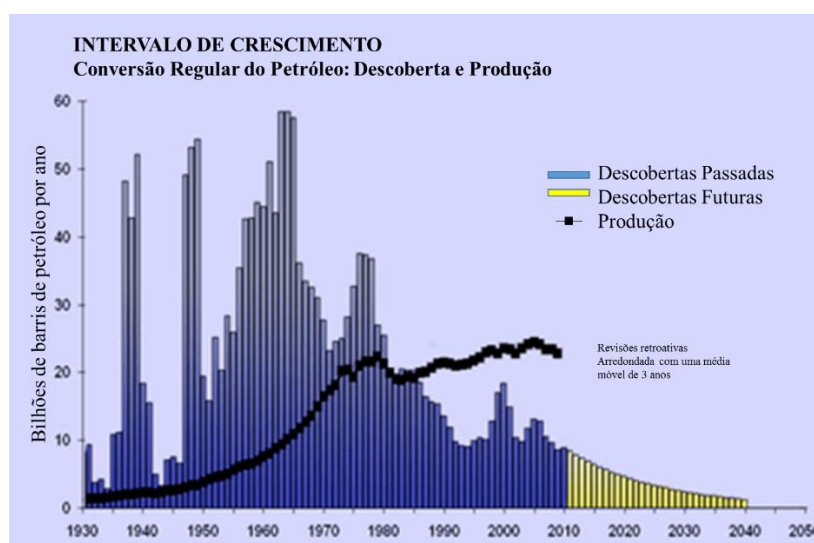


Figura 1.1 - Intervalo de crescimento

Fonte: Adaptado de *The Association for the Study of Peak Oil and Gas*, 2009

Diante disso, as necessidades de tornar os processos produtivos mais limpos criam a expectativa de incentivos em pesquisas que busquem matérias primas e processos sustentáveis.

Convém ressaltar que a criação e a difusão das tecnologias limpas – a nova vantagem competitiva no mercado – desenvolvimento e meio ambiente deixaram de ser considerados

como duas realidades antagônicas e passaram a ser compreendidos como eixos complementares.

Sendo assim, diante da necessidade de inovação da matriz energética mundial, trazem-se como alternativa os biocombustíveis, que segundo a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) (2012) são derivados de biomassa renovável que podem substituir, parcial ou totalmente, combustíveis derivados de petróleo e gás natural em motores a combustão ou em outro tipo de geração de energia. “Isso implica que as novas fontes de produção de combustíveis possuam um potencial de captação de dióxido de carbono (CO₂) atmosférico capaz de neutralizar as emissões resultantes da combustão dos mesmos” (TAVARES, 2009). Frente a essa perspectiva, tecnologias de processos de captura de CO₂ vêm sendo pesquisadas e as microalgas têm sido apontadas como um processo biológico alternativo, tendo em vista o seu significativo potencial de fixação de CO₂. Chagas (2010) corrobora com esta capacidade da microalga afirmando que através da realização da fotossíntese, a uma taxa de crescimento que duplica a biomassa a cada dia, este microrganismo torna-se uma matéria prima alternativa renovável para a produção de energia. A biomassa produzida pode ser aplicada na produção de biocombustíveis, tais como biodiesel, gás de síntese, biogás, dentre outros.

As microalgas são organismos microscópicos fotossintetizantes que crescem rapidamente e em diferentes condições ambientais devido a sua estrutura celular simples, unicelular ou multicelular. O cultivo de microalgas é um sistema biológico capaz de armazenar energia solar, através da produção de compostos orgânicos via processo fotossintético, sendo que a maioria das espécies apresenta crescimento mais rápido que as plantas terrestres, possibilitando maior rendimento de biomassa.

Ressalta-se que existem diversos benefícios associados ao cultivo de microalgas. Pode-se considerar as vantagens relacionadas à alta eficiência de conversão fotossintética, quando comparada com cultivo de plantas terrestres; ao fornecimento de uma produção mais alta por hectare, quando comparadas com outros tipos de culturas; à obtenção da alta taxa de sequestro de CO₂; à produção contínua durante o ano, em países tropicais, atingindo um alto rendimento na obtenção de óleo, com reduzido uso de água; além de uma variação da composição da biomassa e da quantidade de óleo produzido por alteração de parâmetros de cultivo.

Assim, compreende-se que o cultivo desses mecanismos fotossintetizantes apresenta uma importante proposta haja visto que, quando comparadas a outras matérias primas produtoras de óleo.

A capacidade de remoção de CO₂ do meio ambiente pelas microalgas durante a execução da fotossíntese pode ser considerada um eficiente processo de redução deste gás da atmosfera. Os nutrientes empregados no cultivo de microalgas, carbono e nitrogênio, representam também componentes importantes capazes de reduzir a quantidade utilizada de meio inorgânico, sem perda de produtividade, podendo ser usado como um artifício para tornar mínimos os custos de produção.

1.1 - Objetivo geral

O objetivo geral do trabalho foi a obtenção do biocombustível através da aplicação do processo de transesterificação do bio-óleo obtido a partir da microalga *Isochrysis galbana*.

1.2 - Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o uso de um fotobiorreator em nível laboratorial, para realização de experimentos de crescimento de microalgas.
- ✓ Extrair e caracterizar o óleo de microalgas.
- ✓ Propor uma rota de síntese para obtenção de metil esteres de ácidos graxos (FAME) proveniente da biomassa microalgal.
- ✓ Comparar as características do bio-óleo com os principais parâmetros preconizados pela resolução ANP N°14, de 11.5.2012 – DOU 18.5.2012 relacionado com as características do biodiesel.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. Revisão Bibliográfica

2.1 - Desenvolvimento sustentável

De acordo com Layrargues (1997), constata-se o uso indiscriminado do conceito desenvolvimento sustentável, termo definitivamente legitimado e absorvido pela comunidade ambientalista após a Conferência do Rio em 1992.

O conceito de ecodesenvolvimento nasceu em junho de 1973 e consistia na definição de um estilo de desenvolvimento adaptado às áreas rurais do Terceiro Mundo, baseado na utilização criteriosa dos recursos locais (BENTES, 2006). Com a Declaração de Cocoyoc no México em 1974, também as cidades do Terceiro Mundo passam a ser consideradas no ecodesenvolvimento (LAYRARGUES, 1997). O termo foi sugerido por Maurice Strong e, em seguida, ampliado pelo economista Ignacy Sachs, que, além da preocupação com o meio ambiente, incorporou as devidas atenções às questões sociais, econômicas, culturais, de gestão participativa e ética (BENTES, 2006).

Como uma derivação do conceito, surgiu a ideia de desenvolvimento sustentável. Segundo Layrargues (1997), em 1983, a Assembléia Geral da ONU criou a Comissão Mundial sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento (CMMAD), presidida pela então primeira-ministra da Noruega, Gro Harlem Brundtland, que adotou o conceito de Desenvolvimento Sustentável em seu relatório *Our Common Future* (Nosso Futuro Comum), também conhecido como Relatório Brundtland.

Na perspectiva de atender as demandas mundiais considerando o desenvolvimento sustentável, a renovação da matriz energética conhecida por meio da inserção de tecnologias renováveis se faz indispensável. A necessidade de inovação é percebida, inclusive, no tocante a produção de combustíveis limpos, cenário no qual se insere a presente pesquisa.

2.2 - Biodiesel: História e perspectiva mundial

A história do biodiesel data de 1895, quando Rudolf Diesel e Henry Ford descobriram que a partir dos óleos vegetais era possível se obter um combustível, e desta forma, um caminho para o desenvolvimento industrial. Pesquisaram diversos combustíveis que pudessem ser utilizados em motores, entre eles o álcool, produzido a partir de biomassa (BRASIL, 2006).

O primeiro registro do que hoje conhece-se como Biodiesel data de 31 de agosto de 1937, foi o registro da patente, visando a transformação de um óleo vegetal em monoésteres metílicos e etílicos de ácidos graxos, do pesquisador Charles George, sendo este dia então considerado como um marco na história dos biocombustíveis fósseis (SUAREZ & MENEGETTI, 2007).

Ao longo dos anos, os estudos passaram a mostrar interesse referente ao desenvolvimento de novos insumos básicos que se enquadrassem numa perspectiva renovável, ao passo que pudessem ser capazes de substituir os derivados de petróleo. Este aspecto ambiental, baseado nos benefícios da produção e utilização de biodiesel juntamente com a necessidade dos países desenvolvidos de reduzir suas taxas de emissões de CO₂, constituem a verdadeira força motriz para a produção e consumo de combustíveis mais limpos.

Muitos países estabeleceram quantidades mínimas obrigatórias de biodiesel misturadas ao óleo diesel, impulsionando a demanda por este biocombustível. No Brasil atualmente, esta quantidade é de 2%. A Europa regulamentou o uso de 2% desde 2005 e estipulou que até 2010 atinjam-se 5,75%; a Alemanha, inclusive, comercializa o B100, isto é, o biodiesel puro (BRASIL, 2008).

Percebe-se assim, que devido a atual circunstância de expansão de oferta e demanda de biodiesel, os projetos de pesquisa e desenvolvimento são extremamente relevantes para viabilizar métodos mais eficientes, que resultem na diminuição de custos de produção e em produtos com maior qualidade.

2.3 - Biodiesel no Brasil

É significativo destacar que o consumo de petróleo tem se intensificado nos últimos anos. O Anuário 2012 da ANP constatou que em 2011, o consumo mundial de petróleo foi 0,7%

superior a 2010, totalizando 88,03 milhões de barris/dia. Essa situação reflete um modelo cultural econômico baseado na exploração de combustíveis fósseis para suprir a matriz energética contemporânea.

Contudo, é imperativo ponderar que a combustão secundária a utilização dos derivados de petróleo gera diversos impactos negativos ao meio ambiente e sociedade incluindo a intensificação do aquecimento global devido a emissão de gases estufa; alteração da composição físico, química e biológica do ar; como também, promoção de diversos problemas de saúde, abrangendo complicações pulmonares e cardiovasculares (BARBOSA *et al.*, 2012; MENDES & RODRIGUES FILHO, 2012). Desta forma considerando as estimativas negativas acerca do uso petróleo, o Brasil vem desenvolvendo tecnologias voltadas para produção e uso de fontes renováveis de energia (KOHLHEPP, 2010).

O Programa Brasileiro de Biocombustíveis criou, através da Portaria MCT 702 de 30 de outubro de 2002, o Programa Probiodiesel que, juntamente com o Proálcool, firma-se como uma forte perspectiva na matriz energética brasileira (NASCIMENTO *et al.*, 2007).

A sociedade contemporânea se encontra, então, diante de um novo conjunto de fatores sociais, políticos, econômicos e tecnológicos capazes de transformar, com grande magnitude, a maneira com a qual o desenvolvimento é produzido, aperfeiçoado e compreendido em nosso meio.

Sendo assim, diante da necessidade de expansão da matriz energética mundial, trazem-se como alternativa, os biocombustíveis, definidos como derivados de biomassa renovável que podem substituir, parcial ou totalmente, combustíveis derivados de petróleo e gás natural em motores a combustão ou em outro tipo de geração de energia (AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS E BIOCOMBUSTÍVEL, 2012).

Consoante a ANP, no Brasil, cerca de 45% da energia e 18% dos combustíveis consumidos são renováveis. Nos outros países do mundo, 86% da energia vêm de fontes energéticas não-renováveis. Diante dessa realidade energética, o Brasil se enquadra como pioneiro mundial no uso de biocombustíveis (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA,, alcançando uma posição almejada por muitas nações que buscam fontes renováveis de energia como alternativas estratégicas ao petróleo.

A Lei nº 11.097, publicada em 13 de janeiro de 2005, introduziu o biodiesel na matriz energética brasileira e ampliou a competência administrativa da ANP, que passou desde então a denominar-se Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis e assumiu as atribuições de especificar e fiscalizar a qualidade dos biocombustíveis e garantir o abastecimento do mercado, em defesa do interesse dos consumidores. A Agência também

executa as diretrizes do Conselho Nacional de Política Energética para os biocombustíveis (AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS E BIOCOMBUSTÍVEL, 2012).

O *Life Cycle Analysis* (LCA) é uma ferramenta computacional utilizada com o intuito de avaliar a sustentabilidade da produção de um biocombustível. Este recurso é capaz de explorar fatores que analisam as peculiaridades relacionadas aos benefícios referentes às matérias-primas para produção de biodiesel e determinam a sua acurácia no tocante à geração de energia. Dessa maneira, o LCA fornece a base científica para avaliar a sustentabilidade ecológica e econômica de um biodiesel (DAVIS *et al.*, 2008).

Assim, considerando o LCA no que concerne ao biocombustível proveniente de microalga enquanto matéria prima, pode-se apontar o estudo executado por Parvatker (2013) assegura que a cultura de algas pode ser uma técnica de sequestro de CO₂ eficaz, não só porque é mais barata em comparação com as atuais tecnologias que estão sendo exploradas, mas também porque é capaz de gerar um combustível renovável.

Na comparação com o diesel de petróleo, o biodiesel também tem significativas vantagens ambientais. Estudos do *National Biodiesel Board* (associação que representa a indústria de biodiesel nos Estados Unidos) demonstraram que a queima de biodiesel pode emitir em média 48% menos monóxido de carbono; 47% menos material particulado; 67% menos hidrocarbonetos (AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS E BIOCOMBUSTÍVEL, 2012).

Ponderando as vantagens da produção do biodiesel, ressalta-se compreender a caracterização da produção deste insumo no Brasil. A Figura 2.1 representa a evolução mensal da produção em análise, a seguir:

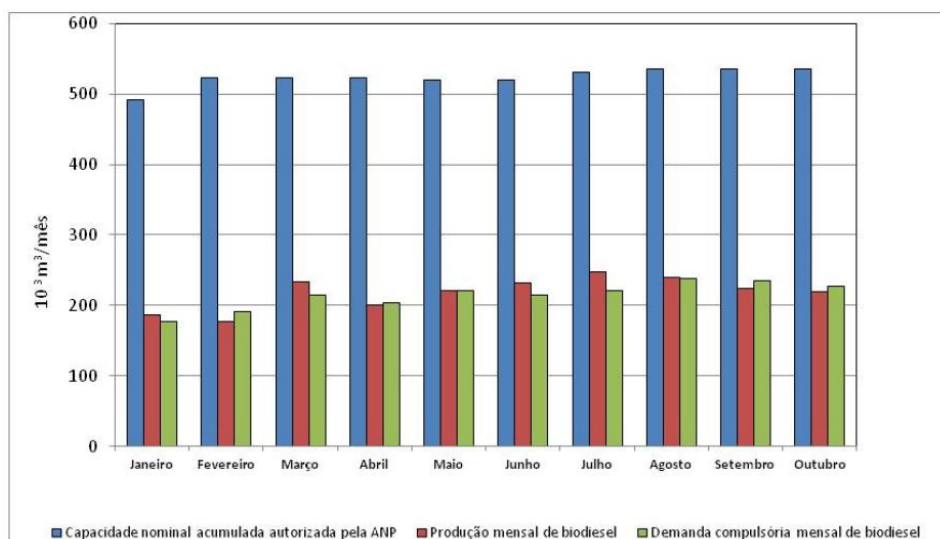


Figura 2.1 - Evolução mensal da produção, da demanda compulsória e da capacidade nominal autorizada pela ANP (2011).

Fonte: Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, 2011.

A Figura 2.1 ilustra que a ANP permite uma produção significativa de biocombustíveis no Brasil, considerando metas acima de 500.000 m³ desse produto por mês. Contudo, observa-se que a produção nacional ainda se encontra em quantidades inferiores àquelas preconizadas pela referida agência de regulação. Desse modo, é possível observar que as condições estabelecidas pela ANP são favoráveis às tecnologias produtoras de biocombustíveis, e que o cenário nacional apresenta demanda importante desse produto para o seu mercado.

A Figura 2.2 corrobora a realidade da produção dos biocombustíveis nacionais, quando traz as relações de capacidade, de produção e de demanda anual para o biodiesel.

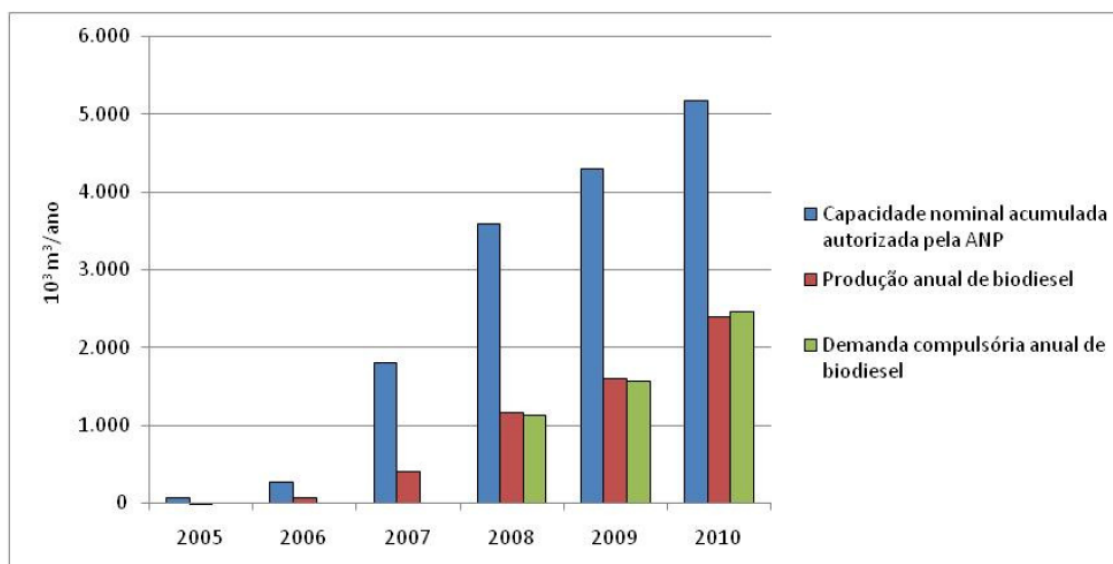


Figura 2.2 - Evolução anual da produção, da demanda compulsória e da capacidade nominal autorizada pela ANP

Fonte: Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, 2011.

Conforme interpretação do gráfico, constata-se que a demanda de biocombustíveis autorizada pela ANP assume evolução positiva a cada ano, o que se traduz no aumento da capacidade acumulada, da produção anual, assim como, na demanda compulsória de biodiesel. Contudo, é perceptível a necessidade de incrementar a produção de biocombustíveis.

As matérias primas mais utilizadas para a produção do biodiesel são retratadas na Figura 2.3.

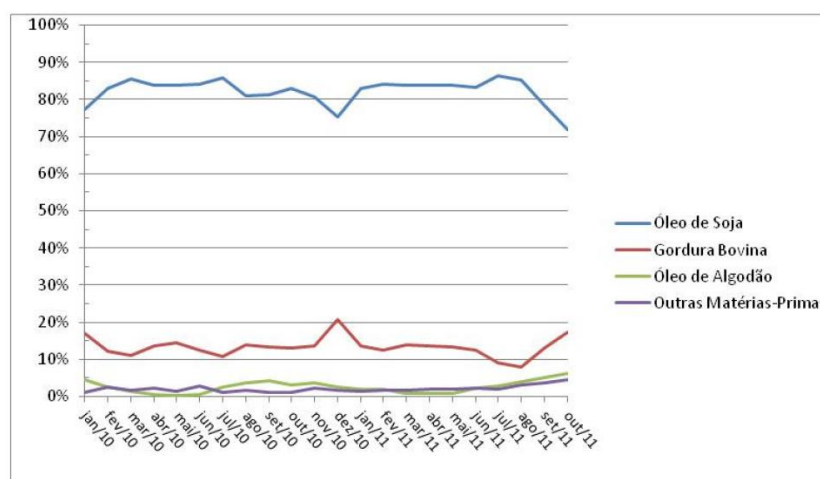


Figura 2.3 - Principais matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel (janeiro/2010 a outubro/2011)

Fonte: Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, 2011.

Consoante o gráfico em estudo, pode-se verificar as matérias primas que assumem posição de destaque em relação à indústria brasileira de biocombustíveis. Nota-se que o óleo de soja é responsável por índices que atingem as marcas de aproximadamente 80%, de modo que este cereal lidera a produção nacional de biodiesel. Em segundo lugar, aponta-se a gordura bovina (15%); e em seguida, o óleo de algodão, bem como “outras matérias primas”, os quais assumem índices semelhantes (em torno de 3%). Este cenário demonstra a necessidade de diversificação dos insumos que são empregados na aquisição do biodiesel nacional, e dessa maneira, a inserção da microalga, por exemplo, pode contribuir para incrementar a produção devido às suas vantagens ambientais e competitivas sobre as matérias primas supracitadas.

Conforme Nascimento *et al.* (2009), existem diversos benefícios associados ao cultivo de microalgas. Pode-se considerar as vantagens relacionadas à alta eficiência de conversão fotossintética; ao fornecimento de uma produção mais alta por hectare, quando comparadas com outros tipos de culturas; à obtenção da alta taxa de sequestro de CO₂; à produção contínua durante o ano, atingindo um alto rendimento na obtenção de óleo, com reduzido uso de água; além de uma variação da composição da biomassa e da quantidade de óleo produzido por alteração de parâmetros de cultivo.

A partir da comparação das microalgas com outras matérias primas produtoras de óleo, é possível perceber que este microrganismo possui uma significativa produtividade sendo, portanto, uma matéria prima capaz de se tornar a principal fonte produtora de biodiesel. Tal afirmação pode ser ponderada a partir da Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Produtividade dos mais importantes cereais produtores de biocombustíveis

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

Fonte: Mata *et al.* 2010

Estudos foram desenvolvidos no intuito de converter lipídios, extraídos das microalgas em biocombustíveis, substitutos ao combustível fóssil derivado do petróleo (BROWN & ZEILER, 1993).

A biomassa proveniente das microalgas possui três produtos metabólicos que mais se destacam, sendo eles os carboidratos, as proteínas e os lipídios.

Segundo Chisti (2007), a maior parte do óleo de microalgas está na forma de triacilgliceróis; os ácidos graxos presentes nas algas podem ser de cadeia curta e longa, sendo que os ácidos graxos de cadeia curta são ideais para a produção de biodiesel.

De acordo Gavrilesu & Chisti (2005), a ideia de usar microalgas como fonte de combustível não é nova. Contudo, para diferentes ambientes e espécies, a rentabilidade e eficiência no uso de microalgas como matéria-prima para o biodiesel, a possibilidade de utilizá-las com esta finalidade foi recentemente demonstrada (SANCHEZ MIRÓN et al, 2003 apud NASCIMENTO *et al.*, 2009).

Conforme a literatura, (SHEEHAN *et al.*, 1998; CHISTI, 2007; ROSENBERG *et al.*, 2008; RODOLFI *et al.*, 2009) a capacidade de produção de biodiesel a partir de microalgas em comparação com outras matérias primas disponíveis destaca-se por várias vantagens sendo as principais:

- A cultura de microalgas podem utilizar solo impróprio para o cultivo de plantas terrestres, desta forma não há competição de solo para a agricultura.
- O cultivo de microalgas consome menos água para o cultivo de oleaginosas, já que a água pode ser reaproveitada em um *start up* de um novo cultivo microalgal. Além desta vantagem existem espécies de microalgas marinhas que crescem em água do mar, que é inadequada para consumo humano;
- É possível combinar a produção de biomassa com a fixação de dióxido de carbono (CO₂) liberados nos processos industriais. Este sistema fornece um acréscimo da produtividade de biomassa microalgal e com o decréscimo de CO₂ na atmosfera;
- O espaço de tempo entre cultivo e colheita das microalgas é menor do que das plantas terrestres, e em determinadas regiões do planeta é possível produzir durante todo o ano;
- As microalgas são organismos mais simples quando comparado as oleaginosas, que podem ser divididas em diferentes partes (frutos, folhas, sementes e raízes) com composições variadas.

De acordo com a literatura (FRANCO *et al.*, 2013) percebe-se que o cultivo de microalgas tem sua relevância na área de produção de biocombustíveis devido seu significativo potencial energético, associado ao fato de ser uma fonte de energia limpa e por contribuir significativamente para áreas de pesquisas biotecnológicas intermediadas pela Engenharia Química. É visto que os estudos laboratoriais contribuem de forma significativa para uma tentativa de ampliação de escala dos projetos, de forma a minimizar os custos de produção desta fonte alternativa de energia.

2.4 - Microalgas e suas particularidades

As microalgas são organismos microscópicos fotossintetizantes que crescem rapidamente e em diferentes condições ambientais devido a sua estrutura celular simples, unicelular ou multicelular (MATA *et al.*, 2010). As microalgas são mais eficientes do que as plantas terrestres na conversão de luz solar em energia bioquímica, através da produção de compostos orgânicos via processo fotossintético, sendo que a maioria das espécies apresenta crescimento mais rápido que as plantas terrestres, possibilitando maior rendimento de biomassa (VONSHAK, 1990; STEPHENSON *et al.*, 2011; CHISTI, 2013).

As plantas apresentam composição química diferenciada para cada órgão, já as microalgas unicelulares apresentam a mesma composição química em toda a biomassa numa cultura (RAVEN *et al.*, 2001). Estes microrganismos são ainda fontes de macronutrientes, vitaminas e elementos-traço que influenciam o valor nutricional de herbívoros aquáticos, pois são ricas fontes de proteínas, carboidratos e especialmente ácidos graxos essenciais (HOFF & SNELL, 1987; WHYTE *et al.*, 1989; VALENZUELA-ESPINOZA *et al.*, 2002; ROCHA *et al.*, 2003).

A Tabela 2.2 apresenta o teor de lipídios e a produtividade de diferentes espécies de microalgas, esses dados estão em forma simplificada, já que a produtividade é função direta do tipo de reator escolhido para o cultivo, assim como é um item dependente das condições de cultivo para cada um dos microrganismos citados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Concentração de lipídios e produtividade de algumas classes de microalgas

Espécie de microalga marinha ou de água doce	Teor de lipídios (% biomassa seca)	Produtividade de lipídios (mg/L/dia)	Produtividade por área de biomassa (g/m ² /dia)
<i>Ankistrodesmus sp.</i>	24,0 – 31,0	-	11,5 - 17,4
<i>Botryococcus braunii</i>	25,0 – 75,0	-	3
<i>Chaetoceros muelleri</i>	33,6	21,8	-
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	14,6 - 16,4/39,8	17,6	-
<i>Chlorella emersonii</i>	25,0 – 63,0	10,3 – 50,0	0,91 - 0,97
<i>Chlorella protothecoides</i>	14,6 - 57,8	1214	-
<i>Chlorella sorokiniana</i>	19,0 – 22,0	44,7	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	5,0 – 58,0	11,2 - 40	0,57 - 0,95
<i>Chlorella sp.</i>	10,0 – 48,0	42,1	1,61 - 16,47/25,0
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	2	-	72,5/130,0
<i>Chlorella</i>	18,0 – 57,0	18,7	3,5 - 13,9
<i>Chlorococcum sp.</i>	19,3	53,7	-
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20,0 - 51,1	-	-
<i>Dunaliella salina</i>	6,0 – 25,0	116	1,6 - 3,5/20 - 38,0
<i>Dunaliella primolecta</i>	23,1	-	14
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	16,7 – 71,0	-	-
<i>Dunaliella sp.</i>	17,5 – 67,0	33,5	-
<i>Ellipsoidion sp.</i>	27,4	47,3	-
<i>Euglena gracilis</i>	14,0 – 20,0	-	-
<i>Haematococcus pluvialis</i>	25	-	10,2 - 36,4
<i>Isochrysis galbana</i>	7,0 – 40,0	-	-
<i>Isochrysis sp.</i>	7,1 – 33,0	37,8	-
<i>Monodus subterraneus</i>	16	30,4	-
<i>Monallanthus salina</i>	20,0 – 22,0	-	12
<i>Nannochloris sp.</i>	20,0 – 56,0	60,9 - 76,5	-
<i>Nannochloropsis oculata</i>	22,7 - 29,7	84,0 – 142,0	-
<i>Nannochloropsis sp.</i>	12,0 – 53,0	37,6 – 90	1,9 – 5,3
<i>Neochloris oleoabundans</i>	29,0 – 65,0	90,0 – 134,0	-
<i>Nitzschia sp.</i>	16,0 – 47,0	-	8,8 - 21,6
<i>Oocystis pusilla</i>	10,5	-	40,6 - 45,8
<i>Pavlova salina</i>	30,9	49,4	-
<i>Pavlova lutheri</i>	35,5	40,2	-
<i>Porphyridium cruentum</i>	9,0 - 18,8/60,7	34,8	25
<i>Scenedesmus sp.</i>	19,6 - 21,1	40,8 - 53,9	2,43 - 13,52
<i>Skeletonema sp.</i>	13,3 - 31,8	27,3	-
<i>Skeletonema costatum</i>	13,5 - 51,3	17,4	-

Fonte: Mata *et al.*, 2010

A composição das microalgas são fundamentalmente carboidratos, lipídeos e proteínas. As proporções de lipídeos presente nesses microrganismos varia normalmente de 5% a 75% em porcentagem de biomassa seca, dependendo da microalga em questão, sendo que, as espécies estudadas em sua maioria apresentam em torno de 20% a 50% de lipídeos. Os triglicerídeos das microalgas conhecidas apresentam composição em ácidos graxos (14 a 22 átomos de carbono) semelhante à dos óleos vegetais usados na produção de biodiesel (METTING, 1996; SPOLAORE *et al.*, 2006; MATA *et al.*, 2010).

2.4.1 - *Isochrysis galbana*

A microalga marinha *Isochrysis galbana* (Figura 2.4) foi escolhida em função do seu potencial de produção de biomassa, teor de carbono e produtividade de lipídios (Picardo, 2012). Falkowski & Raven (2007), classifica a *Isochrysis galbana* como uma microalga marinha, unicelular, fitoflagelada pertencente à ordem das *Chrysomonadales* e a divisão das *Primnesiofitas* (*Haptofitas*). Esta espécie é rica em ácidos graxos poliinsaturados, proporcionando boas características nutricionais e crescimento acelerado, sendo muito utilizada em aquicultura (LOURENÇO, 2006; WOOD, 1974).

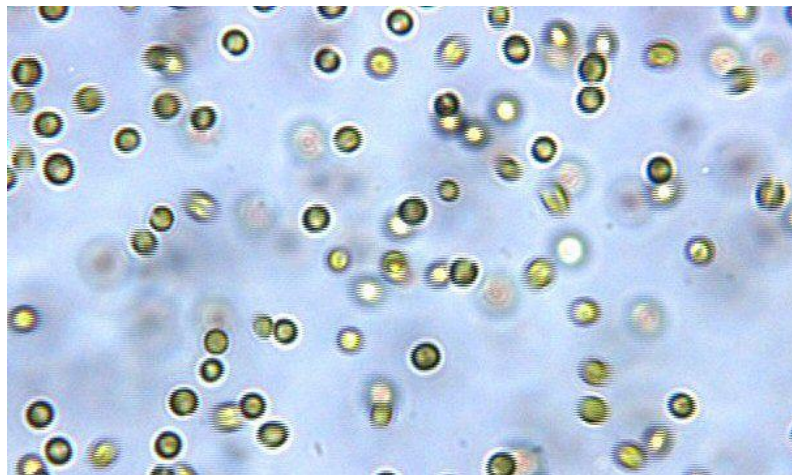


Figura 2.4 - *Isochrysis galbana*.

Com o intuito de relacionar a microalga com os biocombustíveis e doravante utilizar-se dessa relação com a produtividade, foi desenvolvida por Picardo (2012) inicialmente uma metodologia de *Screening* de microalgas com resultados experimentais apresentados na literatura. Segundo Picardo (2012), a metodologia de *Screening* baseia-se em informações da literatura para 45 espécies de microalgas, compreendendo os dados de taxas de crescimento e a da composição da biomassa. O método realiza uma análise de elementos quantitativos de processamento da biomassa, retornando ao fim os microrganismos mais aptos a serem utilizados no processo de obtenção do biocombustível.

2.4.2 - Biofixação de CO₂

Sabe-se através do ciclo do carbono que os oceanos são responsáveis pela maior absorção de CO₂. As plantas fotossintetizantes superiores do tipo C4, como a cana-de-açúcar, são as maiores sequestradoras de carbono atmosférico terrestre, porém, as microalgas fixam ainda mais carbono que esta classe de plantas (OHSE *et al.*, 2009). A biofixação do CO₂ por microalgas ocorre durante a fotossíntese, onde a energia solar é convertida em energia química via oxidação da água, reduzindo CO₂ e liberando oxigênio (O₂) (SCHENK *et al.*, 2008).

O processo fotossintético ocorre principalmente por duas fases, uma fase denominada fase clara ou fotoquímica e a outra conhecida por fase escura. As reações da fase luminosa envolvem a captura da energia luminosa e produção de compostos ricos em energia, tais como a Adenosina Trifosfato (ATP) e a Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (NADPH), sendo estes aproveitados na síntese de carboidratos nas reações de fixação de carbono. Esta síntese encontra-se organizada nas membranas dos cloroplastos, formando unidades funcionais chamadas fotossistemas I e II (FSI e FSII).

A interação do FSI e FSII conduz a transferência dos elétrons, provenientes da fotólise da água (H₂O) a NADPH, e concomitantemente, a geração do gradiente de prótons para a síntese de ATP. Sendo assim, quando a molécula de água for fragmentada, o oxigênio será liberado, dando origem ao O₂ presente na atmosfera (BARSANTI & GUALTIERI, 2006 apud. CHARGAS 2010).

A etapa química da fotossíntese, fase escura, acontece no estroma dos cloroplastos (algas eucarióticas) ou no citoplasma (algas procarióticas), sem necessitar de energia luminosa. Esta fase utiliza a energia que foi acumulada no ATP produzido durante a fase fotoquímica. A fixação do CO₂ e posterior transformação deste composto em glicose ocorre durante a fase independente da luz por meio da incorporação dos hidrogênios cedidos pelas moléculas de NADPH, formadas na fase clara. Percebe-se desta forma que a formação de carboidratos não está diretamente relacionado com a fase clara, mas precisa de dois produtos formados durante a etapa luminosa: o NADPH e o ATP (BARSANTI & GUALTIERI, 2008, STRYER, 1992 apud CHARGAS 2010). A Figura 2.5 demonstra de forma simplificada como ocorre o processo de fotossíntese.

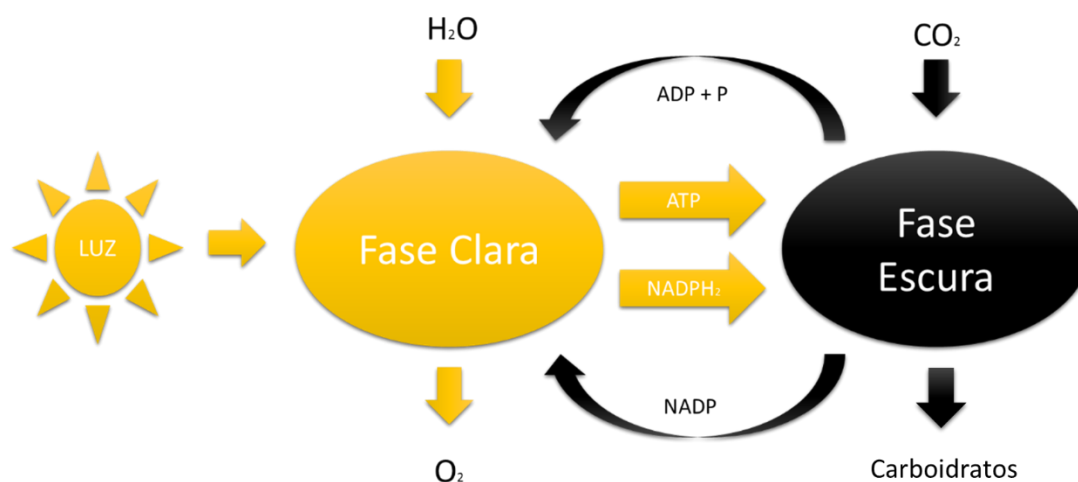


Figura 2.5 - Diagrama simplificado do processo fotossintético.

O armazenamento da energia química gerada durante a fotossíntese se dá nas moléculas como as de amido e os lipídios.

Segundo Becker (2004) a concentração dos lipídeos presentes na biomassa microalgal pode variar entre 1 a 40% do peso seco (BECKER, 2004). As composições dos lipídeos provenientes desta fonte são tipicamente compostas por glicerol, açúcares ou bases esterificadas e ácidos graxos contendo entre 12 e 22 carbonos, podendo ser tanto saturados quanto mono ou poliinsaturados. A fração dos lipídios com maior expressão é composta basicamente por ácidos graxos, em algumas espécies, representam entre 25 e 60% dos lipídios totais (BECKER, 1988; BROWN, 1991; BECKER, 2004; DERNER *et al*, 2006)

2.5 - Cultivos de Microalgas: Lagoas e Fotobiorreatores

Para o cultivo microalgal, alguns parâmetros são de extrema importância e precisam ser controlados a fim de favorecer o crescimento do microrganismo. Esses parâmetros são a luz, o tipo de água, podendo ser doce ou salgada, o volume injetado no meio de dióxido de carbono, a manutenção dos sais inorgânicos necessários para a cultura, e ainda, a temperatura que deverá permanecer, geralmente, entre os 20°C e os 30°C na maioria das espécies de microalgas (CHISTI, 2006).

Os principais sistemas utilizados para produção de microalgas são as lagoas e os fotobiorreatores. As lagoas mais empregadas são do tipo “*Raceways Ponds*”, conforme pode

ser observado na Figura 2.6, que consistem de um tanque em canais com recirculação, dotados de sistema de agitação com pá giratória (PICARDO, 2012). Porém este modelo de cultivo apresenta alguns problemas quando comparadas a fotobiorreatores (CHISTI, 2013), a contaminação por microrganismos heterotróficos, a contaminação por outras algas e a evaporação da água utilizada no meio de cultivo, além de ser um processo onde variáveis como o pH, a temperatura e a pressão parcial de oxigênio (pO_2) são difíceis de serem controladas (RECH, 2011).



Figura 2.6 - Cultivo de algas crescendo em tanques abertos em Israel.

Fonte: Jha, 2008.

Os fotobiorreatores fechados são sistemas mais flexíveis quando comparados aos sistemas de cultivos abertos, devido sua capacidade de ser otimizados para atender as características fisiológicas e biológicas do organismo que se pretende cultivar.

Normalmente os projetos de fotobiorreatores apresentam algumas vantagens relativamente significativas aos sistemas abertos, tais como: melhor economia de água; uso controlado de energia e produtos químicos; sustentação das condições ideais de cultivo, permitindo moldar as variáveis para a potencialização do crescimento e posterior acúmulo de biomassa; e a facilidade na manutenção do meio a fim de evitar contaminações (PULZ, 2001; TREDICI, 2004; CHISTI, 2007).

Ainda em comparação com *Raceways Ponds*, os fotobiorreatores são mais dispendiosos, principalmente se esse sistema for mantido com luz artificial, com maiores investimentos de capital e custos operacionais. O que torna esse sistema viável economicamente é a possibilidade de produção de insumos de elevado valor comercial pelas espécies cultivadas e pela captura de CO_2 (LOURENÇO, 2006).

Portanto, a seleção de espécies e de condições de cultivo para as espécies selecionadas, em função da quantidade e qualidade do óleo produzido, se constitui de etapas importantes para a inovação, que consiste na produção de biomassa algal como matéria prima para biocombustíveis (BANERGEE *et al.*, 2002; METZGER & LARGEAU 2005; GUSCHINA & HARWOOD, 2006).

Um comparativo do modelo de cultivo e custo para implementação, baseado no tipo de reator, pode ser analisado diretamente pela Tabela 2.3.

Tabela 2.3 - Comparação dos sistemas de cultivos de microalgas *raceways ponds* (lagoa) e fotobiorreator

Parâmetros	Lagoas (tanques abertos)	Fotobiorreatores (sistemas fechados)
Risco de contaminação	Extremamente alto	Baixo
Espaço requerido	Alto	Baixo
Perca de água	Extremamente alto	Insignificante
Perca de CO ₂	Alto	Insignificante
Qualidade da biomassa	Baixa	Alta
Variedade para o cultivo de espécies	Possibilidade de cultivo restrita para algumas poucas espécies de algas	Aproximadamente todas as espécies de microalgas podem ser cultivadas
Flexibilidade de produção	Mudança de produção entre as variedades possíveis	Mudança de produção sem problemas
Reprodutibilidade dos parâmetros de produção	Difícil, dependendo das condições exteriores	Possível com certa tolerância
Controle do Processo	Difícil	Fácil
Padronização	Muito difícil	Possível
Dependência do clima	Absoluta, produção impossível com chuvas	Insignificante
Período até que a produção líquida é atingida após o início ou interrupções	Longa, aproximadamente 6-8 semanas	Relativamente curta, aproximadamente 2-4 semanas
Concentração de biomassa durante a produção	Baixa, 0,1 – 0,2 g/L	Alta, 2 – 8 g/L

Parâmetros	Lagoas (tanques abertos)	Fotobiorreatores (sistemas fechados)
Eficiência de tratamento do processo	Baixo	Alto

Fonte: Pulz, 2001.

Os cultivos que estão sendo estudados em fotobiorreatores visam alcançar o máximo de produção tolerado por estes microrganismos. O cultivo ocorre em um sistema fechado, que pode ser na forma de placas planas ou em serpentinas, espirais ou cilindros, podendo ser também cultivado em tubos de plástico, vidro ou policarbonato. Os cultivos realizados em fotobiorreatores possuem melhores condições de controle já que é possível ajustar as condições de cultivo (concentração dos nutrientes, temperatura, iluminação, pH e outros.). Resultando em aumento de produtividade, viabilizando a produção comercial de uma série de compostos de elevado valor (TREDICI, 2004).

2.5.1 - Principais Fotobiorreatores

2.5.1.1 - Fotobiorreator Tubular

O fotobiorreator fechado tubular (Figuras 2.7 e 2.8) é um dos modelos mais promissores e é um dos mais usados para cultivos externos de microalgas. Normalmente, seu projeto pode ser desenvolvido considerando a construção de dois compartimentos: compartimento de cultivo e sistema de troca gasosa. O compartimento de cultivo, composto por tubos transparentes são construídos com tubos de vidro ou plástico e as culturas são recirculadas utilizando bombas ou preferencialmente com sistemas “*air lift*”. Nessa seção de cultivo do fotobiorreator há disponibilidade de luz possibilitando o crescimento. No sistema de troca gasosa é feita a remoção do O₂ gerado e o fornecimento de CO₂. A transferência gasosa pode ser feita passivamente, através de membranas permeáveis a gás, ou ativamente, através da injeção de ar utilizando tubos perfurados ou pedras porosas (CHAGAS, 2010; SUGAI, 2012).

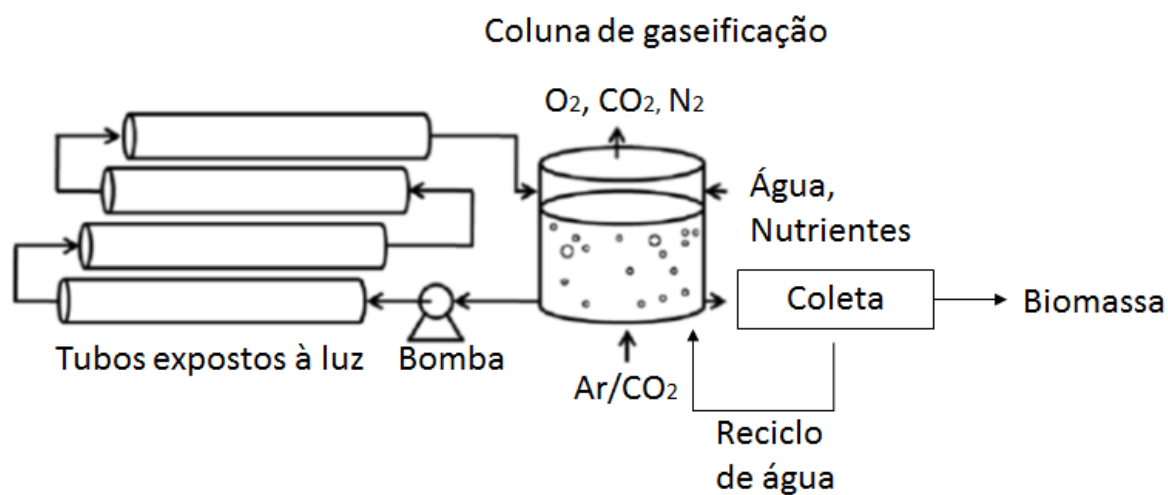


Figura 2.7 - Esquema simplificado de um fotobiorreator tubular;
Fonte: Adaptado de Satyanarayana *et al.* (2011).



Figura 2.8 - Fotobiorreator tubular com capacidade de 1000L na Universidade de Murdoch, Austrália.
Fonte: Chisti, 2007.

2.5.1.2 - Fotobiorreator de coluna vertical

Os fotobiorreatores de coluna vertical se apresentam na forma de sistemas mais compactos, de baixo custo e que se adequam a operações em larga escala (UGWU *et al.*, 2008), a Figura 2.9 apresenta o fotobiorreator. Segundo Sanchez *et al.* (2002) esse equipamento para cultivo utiliza-se de colunas com aeração através do borbulhamento. Nas colunas de borbulhamento, o ar é injetado na base provocando uma boa mistura e consequente aumento da transferência de massa gás-líquido, aumenta o suprimento de CO₂ e a remoção de O₂ pelo topo (PICARDO, 2012). Chagas (2010) afirma que esse modelo de fotobiorreator oferece altas taxas de transferência de massa, mistura eficiente com baixas tensões de cisalhamento, baixo consumo de energia, alto potencial para cultivos em larga escala, facilidade de esterilização e redução e fotoinibição da fotoxidação.

Apesar das colunas verticais de borbulhamento serem de baixo custo e de fácil operação, quando este fotobiorreator é projetado para escalas maiores há um déficit devido à diminuição da área iluminada, devido ao ângulo relativo a direção do sol. Consequentemente, a este aumento de escala, para que se tenha volume de cultura e alta taxa de transferência de gás, o diâmetro deve ser elevado, o que também diminui a área iluminada e, consequentemente, a eficiência fotossintética, a solução para este problema é o aumento da turbulência por sistemas de aeração (UGWU *et al.*, 2005).



Figura 2.9 - Fotobiorreator do tipo coluna

Fonte: Richard, 2008.

2.5.1.3 - Fotobiorreator de placa plana

Devido a necessidade de se aproveitar o máximo de luminosidade durante um cultivo de microalgas, esta cultura passou a ser conduzida em placas ou painéis. Quanto mais estreitos forem esses painéis maior será a razão área iluminada/volume. Este modelo de fotobiorreator pode ser observado na Figura 2.10. O proveito da mobilidade de inclinação desses tipos de fotobiorreatores na direção da fonte luminosa, garante a maior absorção de energia incidente sobre o cultivo (HU *et al.*, 2008; PICARDO, 2012).

O acúmulo de oxigênio dissolvido nos reatores em painel é relativamente menor comparado aos fotobiorreatores tubulares. Para o aumento de escala do fotobiorreator em placa, vários compartimentos são necessários, o que implica em uma maior área (CHAGAS, 2010; PICARDO, 2012).



Figura 2.10 - Conjunto de fotobiorreatores do tipo placas planas

Fonte: Guimarães, 2012.

A Tabela 2.4 apresenta comparativamente os principais modelos de fotobiorreatores discutidos neste trabalho.

Tabela 2.4 - Comparação entres os principais modelos de cultura de microalga

Sistema de Cultivo	Vantagens	Limitações
Lagoas	Projeto de instalação e operação relativamente econômico, fácil limpeza	Baixo controle das condições de cultivo, difícil crescimento de culturas algas

Sistema de Cultivo	Vantagens	Limitações
	após cultivo, bom para cultivo de biomassa algal.	por longos períodos, baixa produtividade ocupação de grandes áreas, limitado a poucas espécies de algas, fácil contaminação por outras espécies ou microrganismos.
Fotobiorreatores de coluna vertical	Alta transferência de massa, boa mistura com baixa tensão de cisalhamento, baixo consumo de energia, alto potencial de aumento de escala, fácil esterilização, redução da fotoinibição e fotoxidação.	Pouca área superficial iluminada, construção requer materiais sofisticados, e apresenta decréscimo de superfície iluminada em caso de aumento de escala.
Fotobiorreator de placas	Grande área superficial iluminada, possibilidade para culturas outdoor, boa produtividade de biomassa, fácil limpeza, baixo acúmulo de oxigênio.	O aumento de escala requer muitos compartimentos e material de suporte, dificuldade no controle da temperatura. Acúmulo de biomassa na parede.
Fotobiorreator tubular	Grande superfície iluminada, possibilidade para culturas outdoor, boa produtividade de biomassa.	Gradientes de pH, oxigênio dissolvido, CO ₂ não dissolvido ao longo dos tubos (baixa taxa de transferência), acúmulo de biomassa na parede, tubos na horizontal ocupam grandes áreas.

Fonte: Ugwu *et al.*, 2008.

Dentre os sistemas apresentados, o fotobiorreator com tubos verticais formando uma grade é o sistema mais promissor, pois ocupa menor área quando comparado com os tubos horizontais e as placas paralelas, que têm alta produtividade (PICARDO, 2010).

O modelo utilizado neste trabalho se aproxima em forma do fotobiorreator de coluna vertical com borbulhamento, já que suas características são ideais para o estudo laboratorial.

Entretanto, para que a microalga apresente um crescimento satisfatório, é de grande relevância que ela esteja inserida em um meio de cultivo estéril com condições físico-químicas controladas. Para tanto, geralmente realiza-se a desinfecção deste meio através da autoclavagem.

2.6 - Tratamento do meio de cultivo

Os métodos de desinfecção têm como finalidade a destruição ou inativação de organismos indesejáveis. Segundo Cubillos (1981), esses organismos podem sobreviver na água por várias semanas, em temperaturas próximas a 21°C e, em alguns casos, por vários meses, em baixas temperaturas. Entretanto, Rossin (1987) afirma que a temperatura não é o único fator que influencia a sobrevivência desses organismos na água, mas também outros aspectos ecológicos, fisiológicos e morfológicos, tais como: pH, turbidez, oxigênio, nutrientes, competição com outros organismos, resistência a substâncias tóxicas e habilidade na formação de esporos. Durante o processo de desinfecção necessariamente não ocorre a destruição completa de todas as formas vivas, apesar de que em alguns procedimentos essa prática seja levada até o ponto de esterilização.

Dentre os produtos usados para desinfecção, o mais amplamente utilizado para a purificação da água é o cloro devido a sua disponibilidade como gás, líquido ou sólido; por ser um componente pouco oneroso; possuir fácil aplicabilidade em detrimento à sua alta solubilidade; ter seu residual em solução de concentração facilmente determinável - o que protege o sistema de distribuição; e por ser capaz de destruir a maioria dos microrganismos patogênicos (SOUSA, 2009). É importante destacar que conforme afirma Antoniolli *et al.* (2005), as substâncias que possuem cloro em sua composição são germicidas de amplo espectro de ação, que reagem com as proteínas da membrana das células microbianas, interferindo na condução de nutrientes e originando a perda de elementos celulares. Meyer (1994) assegura ainda que inicialmente o cloro para desinfecção da água ocorreu por meio da aplicação do hipoclorito de sódio (NaOCl), adquirido pela decomposição eletrolítica do sal.

Os desinfetantes a base de cloro reagem rapidamente com a matéria orgânica, sendo que o grau de inativação será proporcional à quantidade de material presente. Desta forma, durante

o processo de desinfecção é crucial que a quantidade de cloro presente na solução seja alta o suficiente para satisfazer a demanda de inativação dos microrganismos (cloro consumido pela carga orgânica presente) (LENGERT, 2008).

O NaClO é um sal do ácido hipocloroso, e quando em solução, separa-se parcialmente nos íons Na^+ e nos íons OCl^- , conforme segue reação abaixo:



Enquanto uma porção substancial hidrolisa-se em hidróxido de sódio, a outra porção é convertida em ácido hipocloroso. Este último tem alto poder oxidante, assim como o ânion hipoclorito, e é o responsável pelo efeito alvejante. Sua carga negativa impede que haja difusão através da parede celular das bactérias e micróbios, fazendo com que este seja um desinfetante fraco. Entretanto, o ácido hipocloroso, que se encontra em equilíbrio com o íon hipoclorito, devido à carga neutra e ao pequeno tamanho molecular, difunde-se facilmente pela parede celular das bactérias. A mudança no potencial de oxidação-redução da célula originada pela presença do ácido hipocloroso desativa a enzima triose fosfato desidrogenase. Esta enzima (ou a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase/GAPDH) é essencial para a digestão da glicose e também é individualmente sensível à presença de agentes oxidantes. A inativação desta enzima destrói com eficácia a habilidade do organismo de funcionar (SILVA, 2007).

Desta forma, com o intuito de desonerar o processo produtivo de biocombustível obtido a partir da biomassa proveniente de microalgas, é possível substituir o processo comumente usado para desinfecção do meio de cultura pela utilização do hipoclorito de sódio como agente desinfetante.

2.7 - Métodos de extração de óleo de microalga

De acordo com Pereira *et al.* (2012), embora a extração lipídica nas microalgas seja relativamente fácil de ser executada, são usados vários processos para aumentar a eficiência e o rendimento. A fim de aumentar a extração desses lipídios, o óleo pode ser removido por processos químicos utilizando solventes como éter ou hexano. A aplicação de enzimas é mais um artifício de extração eficaz, que torna o fracionamento do óleo mais simples.

A conversão de biomassa residual da microalga em biocombustível é tão importante quanto a extração lipídica para gerar biodiesel. Fundamentalmente o processo extrativo é uma parte do processo de obtenção do biodiesel que possivelmente irá determinar a sustentabilidade em virtude do elevado custo financeiro. Em geral, os métodos de extração abrangem duas classificações: os métodos mecânicos e os métodos químicos (ARAÚJO *et al.*, 2012).

A extração mecânica é a operação de separação de líquidos de sólidos pela aplicação de forças de compressão e a premissa fundamental desta operação é o máximo isolamento de óleo, o que determina uma mínima quantidade de matéria graxa no resíduo e perdas mínimas posteriores na purificação (RITTNER, 1996).

Os processos de extração química são aqueles em que são empregados solventes químicos ou fluidos supercríticos para a retirada do óleo presente na biomassa microalgal. Em alguns casos, a combinação dos dois métodos acima descritos para o procedimento extrativo podem alcançar eficiências de até 95% de retirada do óleo presente na biomassa (KOWALSKI, 2010).

Após a obtenção do óleo proveniente de microalgas, a obtenção do biodiesel parte do processo de transesterificação do óleo, onde emprega-se um álcool e um catalisador com intuito de reagir os triacilglicerídeos presentes na amostra (CARVALHO JÚNIOR, 2010).

É importante ressaltar que a retirada de lipídios, acrescida da conversão de biomassa em outros combustíveis, torna o processo com um rendimento próximo a 100% e as microalgas como um dos organismos mais eficientes na geração de combustíveis não fósseis (PEREIRA *et al.*, 2012).

2.7.1 - Transesterificação

Biodiesel é uma mistura de alquil ésteres de ácidos graxos, obtidos pela transesterificação de óleos ou gorduras. Quando este produto é de origem vegetal ou animal, normalmente são compostos por 90-98% de triglicerídeos e por uma pequena quantidade de monoglicerídeos, diglicerídeos e ácidos graxos livres, além de quantidades residuais de fosfolipídios, fosfatídeos, carotenos, tocoferóis, compostos de enxofre e água (AMARO *et al.*, 2011).

A transesterificação é usado para descrever um grupo de reações orgânicas onde um éster é transformado em outro por meio da permuta do resíduo alcoxila, esta é uma reação

química em múltiplos passos - incluindo as etapas de hidrólise reversíveis em série, em que triglicéridos são convertidos para diglicéridos, em seguida, diglicéridos são convertidos para monoglicéridos e, finalmente, monoglicéridos são convertidos a ácidos graxos e glicerol (como subproduto) (SCHUCHARDT *et al.*, 1998; VOLLHARDT & SCHORE, 2004; AMARO *et al.*, 2011).

A reação de transesterificação pode ser realizada em meio ácido ou básico e tendo normalmente um álcool empregado como solvente, o que favorece a formação deste novo éster. Esse processo de transesterificação é denominado alcoólise. Contudo, a presença de um catalisador (ácido ou base) acelera consideravelmente esta conversão, como também contribui para aumentar o rendimento da mesma (SCHUCHARDT *et al.*, 1998; MEHER *et al.*, 2006).

Genericamente, a reação de transesterificação pode ser representada conforme mostra a Figura 2.11.

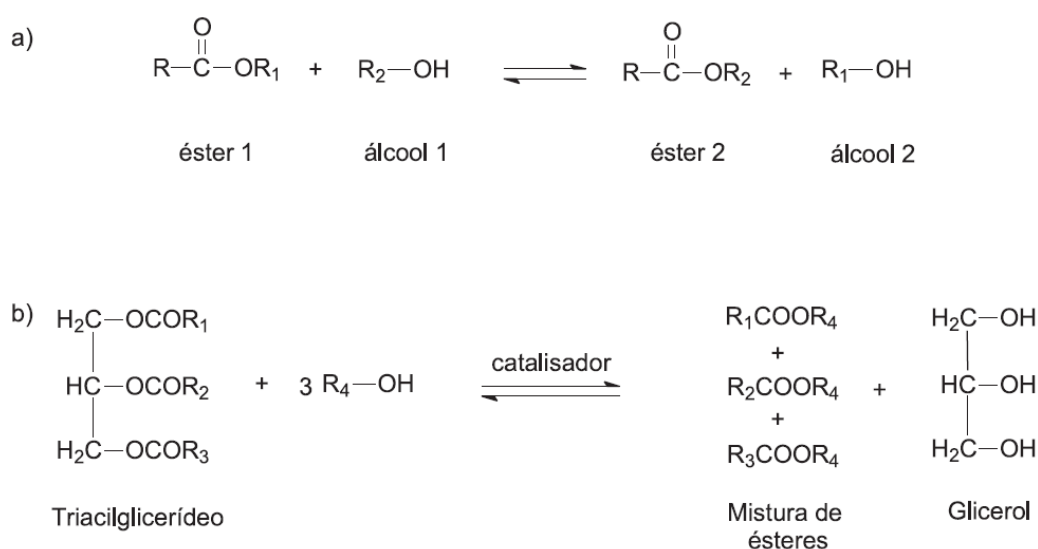


Figura 2.11 - a) Reação geral para uma reação de transesterificação; b) Reação geral da transesterificação de um triacilglicerídeo.

Fonte: Geris *et al.*, 2007.

Existem diversas rotas possíveis de catálise para a reação de alcoólise (CORDEIRO, 2008; SCHUCHARDT *et al.*, 1998), como por exemplo reações utilizando resina iônica (resinas catiônicas fortemente ácidas), argilominerais ativados, hidróxidos duplos lamelares, superácidos, superbases e enzimas lipolíticas (lipases). Sendo que este trabalho visará apenas o processo de transesterificação *in situ*.

2.7.1.1 - Transesterificação *in situ*

Uma alternativa ao processo de transesterificação convencional, que tem o potencial para reduzir os custos de processamento da etapa final na produção de biodiesel, é a transesterificação *in situ*, esta rota consiste na transesterificação direta da biomassa como fonte de triacilgliceróis. Este processo facilita a conversão de ácidos graxos para alquil ésteres diretamente no interior da biomassa, eliminando a etapa de extração com solvente. A alcóólise do óleo diretamente da biomassa conduz a um rendimento em biodiesel maior do que a extração convencional e a geração de resíduos é reduzida, tornando-se economicamente mais vantajosa (AMARO et al. 2011; GAMA et al., 2010).

Harrington & D'arcy-Evans (1985) demonstrou que a alcoólise direta do óleo da biomassa quando correlacionada à rota convencional apresenta valores maiores de rendimentos de biodiesel. Usando o método *in situ* Harrington & D'arcy-Evans (1985) alcançaram um aumento no rendimento em biodiesel de até 20 % em relação ao método convencional. Segundo estes autores essa melhoria foi possivelmente relacionada a melhor acessibilidade do ácido utilizado na reação ao óleo da biomassa.

Segundo Pereira et al. (2012), é possível encontrar na literatura efeito de importantes variáveis na reação para produção de biodiesel. Conforme este autor, a transesterificação *in situ* sob catálise ácida é efetuada a partir de ácidos graxos provenientes de biomassa algal, já que catálise básica não é recomendada para óleos provenientes de microalgas, devido a característica ácida do mesmo, onde os resultados descritos sugerem que um aumento na quantidade de álcool e um aumento da temperatura de reação levam a um melhoramento da conversão de ésteres metílicos oriundos de ácidos graxos.

O método de transesterificação *in situ* já é utilizado por empresas de grande porte, como a Petrobras, a qual produz biodiesel etílico a partir de sementes de mamona no polo de Guamaré-RN (GAMA et al., 2010).

CAPÍTULO 3

METODOLOGIA

3. Metodologia

Os experimentos realizados na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) tiveram o intuito de produzir biomassa a partir de microalga. O trabalho também abrangeu a análise de comportamento e desempenho da microalga *Isochrysis galbana* a fim de caracterizar este microrganismo como uma potencial fonte de biodiesel. O desempenho da microalga foi avaliado através de testes de qualificação das características do biodiesel obtido a partir da biomassa proveniente da cultura presente em um fotobiorreator.

Também foram realizados experimentos que visavam a quantificação da capacidade de produção de lipídios em relação a biomassa produzida, assim como a substituição da etapa de autoclavagem do meio, com intuito de minimizar os custos para o preparo inicial do cultivo da microalga *Isochrysis galbana*.

3.1 - Microrganismo

As culturas laboratoriais foram realizadas utilizando a microalga *Isochrysis Galbana* proveniente do laboratório de Hidrorrefino, Engenharia de Processos e Termodinâmica Aplicada (H₂CIN) da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

A classificação taxonômica desta microalga é dada por Falkowski & Raven (2007): Domínio: *Eukarya*, Império: *Eukaryota*, Reino: *Chromista*, Subreino: *Euchromista*, Divisão: *Haptophyta*, Classe: *Prymnesiophyceae*, Ordem: *Isochrysidales*, Gênero: *Isochrysis*, Espécie: *Isochrysis galbana*.

3.2 - Meio de Cultivo

O microrganismo foi cultivado em meio f/2 modificado (Guillard 1975), sem a solução de silicato, conforme discriminado na Tabela 3.1. Foi utilizada água de mar sintética (LOURENÇO, 2006) enriquecida com nutrientes inorgânicos. Tanto a água do mar sintética quanto as soluções estoque de meio foram previamente filtradas em membrana de celulose de

porosidade 0,22 μ m (exceto a solução de metais), dentro de câmara de fluxo laminar a fim de evitar contaminação por bactérias e fungos, e esterilizadas em autoclave a 121° C e 2 atm por 30 min (exceto a solução de vitaminas). Em seguida, foram adicionadas ao volume de água do mar sintética as soluções de nitrato (NaNO_3), fosfato (NaH_2PO_4), traço de metais (CoCl_2 , CuSO_4 , MnCl_2 , Na_2MoO_4 , ZnSO_4 , FeCl_3 e EDTA) e vitaminas (tiamina, biotina e cianocobalamina).

Tabela 3.1 - Composição do meio f/2 modificado de Guillard (1975), para culturas de microalgas marinhas.

1. Solução de Nitrato NaNO_3 (Adicionar 1 ml da solução para cada litro de água do mar)	75 mg L ⁻¹
2. Solução de Fosfato $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Adicionar 1 ml da solução para cada litro de água do mar)	5 mg L ⁻¹
3. Solução Traço de Metais Na_2EDTA $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Adicionar 1 ml da solução para cada litro de água do mar)	4,36 mg L ⁻¹ 3,15 mg L ⁻¹ 0,001 mg L ⁻¹ 0,002 mg L ⁻¹ 0,001 mg L ⁻¹ 0,18 mg L ⁻¹
4. Solução de Vitaminas Tiamina Biotina Vitamina B12 (Adicionar 0,1 ml da solução para cada litro de água do mar)	1 mg L ⁻¹ 0,005 mg L ⁻¹ 0,005 mg L ⁻¹

3.2.1 - Aclimação prévia

A microalga foi previamente aclimatada às condições de cultivo. Essa etapa durou em torno de 20 dias. Para aclimação, as células foram cultivadas em frascos erlenmeyer de 500 mL dentro do fotobiorreator, o volume preenchido de cada frasco era de 250 mL de meio de cultivo. Esta cultura foi utilizada na fase de crescimento exponencial tardia como cultura iniciadora para o cultivo.

3.3 - Condições de cultivo

Após período de aclimação às condições de cultivo, a suspensão de microalgas foi empregada como inóculo sempre na fase exponencial de crescimento para o desenvolvimento em erlenmeyer com capacidade de 3,0 L, sendo 6 erlenmeyers com volume de cultivo de 2 L, onde o volume total de trabalho foi de 12 L.

Os cultivos experimentais foram realizados no Laboratório do Núcleo de Pesquisa em Petróleo e Gás (NUPEG) da UFRN. As microalgas foram cultivadas em erlenmeyer de vidro com capacidade para 3,0 L, sendo empregados 2,0 L de meio de cultura, em batelada. As culturas foram mantidas com agitação (aeração) constante (bombas aeradoras de 6 W, capacidade de 4,5 L min⁻¹) e iluminação artificial (lâmpadas fluorescentes, correspondente a 100 µE/m²/seg), em sala climatizada a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 h. A concentração inicial de inóculo foi de 70000 células/mL.

3.3.1 - Cultivo em batelada

Com o objetivo de densificar a cultura para aumentar a produção de biomassa, os cultivos eram realizados em forma de batelada alimentada.

Os cultivos em batelada foram realizados em período de 15 dias. A adição de todos os nutrientes tornou-se necessária para que o crescimento não fosse limitado pela falta de algum

outro nutriente. Essa reposição de nutriente foi realizada diariamente com exceção dos finais de semana.

Ao final dos cultivos, a biomassa foi separada por centrifugação, onde o concentrado foi levado para secagem em estufa a 60° C por um período de 24 h. A biomassa seca foi então macerada para que fosse formado um pó fino, o qual foi o objeto de obtenção do nosso biodiesel. A obtenção do biocombustível só foi realizada experimentalmente após acúmulo de biomassa seca e trituração proveniente do fotobiorreator ilustrado na Figura 3.1.



Figura 3.1 - Fotobiorreator cultivo *indoor*.

3.4 - Acompanhamento do crescimento celular

O desenvolvimento da microalga foi acompanhado por contagem direta em microscópio óptico. Essa técnica quantifica o número de células por unidade de volume de cultivo (células/mL). As células foram contadas em microscópio fazendo uso de uma câmara de Neubauer para este procedimento (ROEHE, 2013). O procedimento de contagem constava em coletar 3,0 mL da cultura previamente homogeneizada e preservar com 25 µL de Lugol Acético.

Em cada contagem, pelo menos 400 células foram quantificadas, envolvendo margem de erro de 10%. A quantidade de células contada foi multiplicada pelo fator correspondente à área de contagem para obtenção do valor final dado em células/mL (ROEHE, 2013).

A análise de crescimento celular foi acompanhada em dois momentos: para o experimento de teste de concentração de hipoclorito, com o intuito de desinfecção do meio e retirada da etapa de autoclavagem; para o experimento de acúmulo de biomassa, com o intuito de produção de biocombustível.

3.5 - Desinfecção da cultura microalgal

O estudo foi esquematizado em relação ao tempo de cultivo versus o crescimento microalgal em interface à quantidade volumétrica de hipoclorito de sódio inserido em cada cultura. Os experimentos foram executados com três repetições.

Para a realização dos experimentos de desinfecção, o meio de cultivo utilizado foi o meio f/2 Guillard (1975) para as espécies marinhas (Tabela 3.1). As culturas foram mantidas com agitação (aeração) constante (bombas aeradoras de 6 W, capacidade de 4,5 L min⁻¹) e iluminação artificial (lâmpadas fluorescentes de 20 W) dentro de um fotobiorreator fechado. Foi utilizada água do mar sintética enriquecida com nutrientes inorgânicos, de modo que uma porção com 1000 g de água do mar contém em média 35 g de sais. O cloro é o íon com maior concentração em massa, seguido do sódio. Esses dois íons são os componentes básicos do principal sal inorgânico presente na água do mar (LOURENÇO, 2006). Para o preparo da água do mar sintética foram utilizados 35 g de sal marinho para cada 1 L de água destilada (CHAGAS, 2010).

O fotobiorreator possui uma área interna de 0,8 m² por 0,4 m de altura. Os meios de cultivos de dois litros foram inseridos em erlenmeyer de três litros, conforme ilustrado na Figura 3.2.



Figura 3.2 - Fotobiorreator.

Os experimentos foram realizados variando-se a concentração inicial de hipoclorito de sódio, com uma concentração de 2,5% de cloro ativo em água. Após o preparo da água do mar, na etapa de preparo do meio de cultivo, foram adicionadas soluções com concentrações variadas do hipoclorito de sódio em relação ao volume inicial da cultura de microalgas. O meio então foi deixado em repouso por um período de 48 h a fim de garantir a ação desinfetante do cloro, para que em seguida fosse realizado o inóculo inicial de microalgas, cuja concentração inicial foi de 7×10^4 células/mL.

As relações de volume de hipoclorito por volume de meio de cultivo (v/v) foram estudadas nas seguintes porcentagens: 10%, 5%, 1%, 0,1% e 0,01%. Um experimento em branco (sem adição de hipoclorito e com água deionizada e autoclavada) foi realizado para analisar comparativamente o crescimento dos meios. Os ensaios tiveram duração total de sete dias, onde diariamente eram coletadas amostras das culturas para contagem celular, fazendo uso de uma câmara de Neubauer para este procedimento (ROEHE, 2013).

3.6 - Obtenção e preparação da biomassa para transesterificação

Após 15 dias de cultivo, todo o volume do fotobiorreator foi centrifugado dentro de tubos de ensaio tipo *falcon* de 50 mL com velocidade de 2500 RPM durante 5 minutos. Essa etapa visa a separação da biomassa presente no meio de cultivo.

Após a centrifugação, todo o sobrenadante foi descartado e a biomassa presente nos tubos *falcons* foi recolhida em dois béquer de 100 mL e levados para secar em estufa, a 60 °C por 24 h. A biomassa seca foi então recolhida e triturada em um gral e pistilo, em seguida armazenada para posterior análise e transesterificação. O processo para obtenção e transesterificação da biomassa foi realizado conforme demonstra a Figura 3.3.



Figura 3.3 - Fluxograma de obtenção do biodiesel.

Fonte: Adaptado de Albuquerque, 2006.

A Tabela 3.2 demonstra em ordem sequencial, os procedimentos de obtenção de biodiesel.

Tabela 3.2 – Procedimento experimental para produção de Biodiesel.

1ª Etapa	Foi aplicado fotoperíodo de 12 horas, onde a fonte luminosa foi acionada as 8:00 horas e desligada as 20:00 horas, diariamente;
2ª Etapa	O meio foi coletado no último dia de cultivo e posteriormente centrifugado;
3ª Etapa	A porção sobrenadante foi separada da biomassa;
4ª Etapa	Após separação, a biomassa foi encaminhada para estufa para secagem;
5ª Etapa	A biomassa seca passou por processo de transesterificação para obtenção do biocombustível;

6ª Etapa	O combustível foi levado para análise de suas propriedades para futura comparação.
----------	--

3.7 - Procedimentos de obtenção e quantificação de lipídios

O teor de lipídios totais foi determinado pelo método de Folch et al. (1957). Foi preparado inicialmente duas amostras, uma contendo apenas metanol e outra contendo apenas clorofórmio, em um volume total de 15 mL para a soma dos volumes das duas amostras separadas, na proporção de 2:1 clorofórmio-metanol (v/v).

Foram coletadas das amostras secas em torno de 100-120 mg, e submetidas a homogeneização em vortex, em um tubo de ensaio contendo pérolas de vidro. Em seguida, adicionou-se 4,0 mL de água deionizada aos tubos. A mistura biomassa mais água foi agitada em vortex por 10 min. Adicionou-se, então, 5 mL de metanol, agitando-se por 2 min. A seguir, 10 mL de clorofórmio foi acrescentado à mistura seguindo-se de agitação por 5 min. A amostra com os solventes foi filtrada em papel de filtro e o filtrado, recolhido em proveta com tampa. O resíduo foi lavado com 5 mL de metanol e 10 mL de clorofórmio. O volume da proveta foi medido e foi adicionado $\frac{1}{4}$ deste volume de cloreto de potássio (KCl) 0,88%. Após a separação das fases, a fase superior foi descartada por aspiração. Ao volume restante, foi adicionado $\frac{1}{4}$ do volume da mistura metanol/água (2:1), novamente a fase superior foi descartada. A fase clorofórmio foi filtrada em papel de filtro contendo sulfato de sódio anidro; o filtrado foi recolhido em frasco de vidro e evaporado em estufa a 40 °C. Após a evaporação do solvente, os lipídios extraídos foram ressuspensos em 5 mL de clorofórmio e a massa de lipídios foi determinada por gravimetria (LOURENÇO, 2006)

Para maior precisão do processo foi introduzido cuidadosamente clorofórmio ($\leq 5,0$ mL) no balão com amostra seca. Uma alíquota de 1 mL da solução do passo anterior foi transferida para um vidro de relógio pré-pesado para determinação dos lipídios totais por gravimetria, após evaporação total do solvente em estufa. Como a pesagem foi feita à temperatura ambiente, os vidros de relógio foram esfriados dentro de um dessecador contendo gel de sílica. A quantidade real de lipídeos da amostra corresponde à multiplicação da massa obtida por 5 e pela divisão do volume retirado da amostra para quantificação dos lipídios.

O restante da amostra de lipídeos foi guardado em frascos pequenos, recebendo antes um jato de nitrogênio para eliminar o oxigênio do ar contido no frasco e evitar oxidação das amostras. Os frascos foram hermeticamente fechados e mantidos em freezer a 18 °C.

3.7.1 - Análises e caracterizações

3.7.1.1 - Transesterificação da biomassa e análise de ésteres totais

Para o processo de transesterificação da biomassa, foi utilizado o protocolo de Lewis *et al.* (2000). As amostras de biomassa secas e trituradas foram transesterificadas adicionando-se 6 mL da mistura metanol/ácido clorídrico/clorofórmio (10:1:1, v/v) e levando a banho termostático a 90 °C por uma hora. A amostra foi mantida a -20 °C até injeção no cromatógrafo. A identificação dos ésteres metílicos foi feita mediante comparação do tempo de retenção com padrões previamente injetados, seguindo procedimento laboratorial do Laboratório de Tecnologia Supercrítica e Biodiesel da UFRN, conforme Azevêdo (2013).

O equipamento utilizado nesta análise foi um cromatógrafo gasoso da marca SHIMADZU modelo GC - 2010 Plus AF, que apresenta um detector de ionização por chama e coluna capilar 5% *diphenyl* / 95% *dimethyl polysiloxane* (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm) modelo RTX. A programação para análise seguiu as seguintes configurações: temperatura da coluna de 110 °C-220 °C (variação de 8 °C por minuto); volume de injeção: 1 µL; razão de *split*: 1:50; o gás de arraste utilizado foi o nitrogênio; temperatura do injetor: 220 °C; temperatura do detector: 240°C; tempo de corrida: 25,5 min e velocidade linear: 22,9 cm/s.

Para a identificação dos picos de ésteres nos cromatogramas obtidos, foi utilizada uma mistura de padrão dos ésteres. A comparação foi feita pelos tempos de retenção dos ésteres do biodiesel e dos tempos de retenção da mistura de padrões. Esta primeira etapa refere-se a análise qualitativa do biodiesel.

Seguindo a norma STANDARD UNE-EM 14103, foi necessária a injeção do padrão interno heptadecanoato de metila para quantificar os ésteres. Para a injeção, foi realizada a seguinte metodologia: 100 mg do biodiesel foram colocados em um balão de 10 mL e completado com n-hexano. Foi transferido uma alíquota de 200 µL para um balão de 1 mL e adicionado 50 µL do padrão interno heptadecanoato de metila na concentração de 5000 mg/L e

então foi completado com n-hexano. Após esta preparação, a amostra foi injetada no cromatógrafo.

O rendimento em ésteres, na produção de biodiesel, foi determinado pela Equação (3.1).

$$\% \text{Ésteres} = \left(\frac{At - API}{API} * \frac{CPI}{C_{amostra}} \right) * 100 \quad (3.1)$$

Sendo:

At: Somatória das áreas dos componentes majoritários do biodiesel e do padrão interno;

API: Área do padrão interno;

CPI: Concentração do padrão interno injetado (250 mg/L);

C_{amostra}: Concentração da amostra injetada (2000 mg/L).

3.7.1.2 - Umidade

O conteúdo de água existente nos óleos foi determinada baseando-se no método de Karl Fischer, utilizando um Titulador Potenciométrico Metrohm 831 (Figura 3.4). A determinação foi feita em triplicata. Essa metodologia é baseada na *American Oil Chemists' Society* (AOCS) Ca 2e-84 conforme Silva (2005).

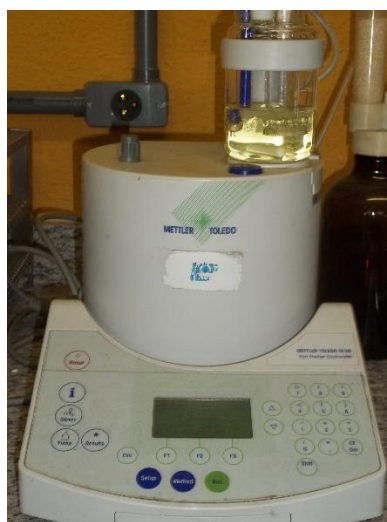


Figura 3.4 - Titulador Potenciométrico Metrohm 831

3.7.1.3 - Índice de acidez

Índice de acidez é definido como a quantidade de hidróxido de potássio (KOH), em mg, necessária para neutralizar os ácidos livres de 1 grama da amostra de óleo.

Para determinação do índice de acidez, primeiramente neutralizou-se a solução de solventes titulando-a com hidróxido de potássio usando fenolftaleína como indicador. Em seguida, uma amostra de óleo foi dissolvida em 125 mL da mistura de solventes neutralizada. Acrescentou-se gotas de fenolftaleína e titulou-se a solução com hidróxido de potássio 0,1 mol.L⁻¹, sob agitação magnética. O ponto final da titulação correspondeu ao começo de aparição de uma coloração levemente rosa que persistiu por mais de 30 segundos. O mesmo procedimento foi adotado para uma amostra em branco sob as mesmas condições (SILVA, 2005).

Desta forma, o índice de acidez pode ser calculado pela Equação 3.2.

$$\text{Índice de acidez} = \frac{56,1 \times M \times V}{\text{Massa de óleo (g)}} \quad (3.2)$$

Onde:

M: Molaridade da solução de hidróxido de sódio (0,1 mol.L⁻¹);

V: Volume da solução de hidróxido de potássio gasto na titulação da amostra de óleo (mL).

A porcentagem de acidez foi obtida através da Equação 3.3 (COCKS & VAN REDE, 1966).

$$\% \text{ Acidez} = 0,503 \times \text{Índice de acidez} \quad (3.3)$$

3.7.1.4 - Massa específica a 20° C

Para determinação da massa específica do biodiesel, foi utilizado módulo de medição da densidade DMA 4500 ME (Figura 3.5). A medição é baseada no princípio comprovado de tubo em U oscilante assegurando valores de densidade altamente exatos. Com o uso de uma seringa de 5 mL, uma amostra do biocombustível foi introduzida dentro do densímetro limpo e seco, tendo o cuidado para não haver formação de bolhas de ar dentro do equipamento.

Aguardou-se alguns minutos para que o conjunto alcançasse a estabilidade térmica e a condição de equilíbrio dentro do densímetro. Em seguida, os valores foram anotados.



Figura 3.5 - Módulo de Medição da Densidade

3.7.1.5 - Viscosidade cinemática a 40 °C

A viscosidade cinemática foi analisada em um Reômetro Brookfield RS2000, no intervalo de temperatura de 40 °C, conforme metodologia adotada por Santos (2010).

3.7.1.6 - Poder calorífico

Para a obtenção do poder calorífico para os combustíveis industriais, costuma-se determinar, experimentalmente, a quantidade de calor liberada (poder calorífico) por uma amostra mediante a realização de ensaio em laboratório, sob condições padronizadas.

Para obtenção do poder calorífico o experimento foi realizado em triplicata dentro de uma célula de explosão (Figura 3.6).



Figura 3.6 - Reator e célula de explosão

Inicialmente, pesou-se uma amostra do biodiesel em um cadinho metálico. Um fio fusível de níquel-cromo medindo 10 cm de fio fusível, cada cm do fio equivale 2,3 cal. Este foi inserido nos orifícios do eletrodo em contato com a amostra. Dentro da célula de explosão, foi adicionado 1 mL de água destilada e posteriormente pressurizada com 30 atm de O₂. A célula foi então mergulhada em 2 L de água destilada e os fios foram conectados ao sistema de ignição. A bomba foi fechada e aguardou-se a temperatura de equilíbrio do sistema para que fosse acionado o sistema de ignição da bomba. Após a reação, os valores de temperaturas e comprimento do fio fusível foram anotados e o poder calorífico do biocombustível foi calculado de acordo com as equações 3.4 e 3.5.

$$Q = C \times \Delta T \quad (3.4)$$

$$c = \frac{C}{m} \quad (3.5)$$

Onde:

Q: Calor da reação (J);

ΔT : Variação de temperatura (K);

m: Massa (kg).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

4. Resultado e discussões

4.1 - Crescimento celular e modificação do processo de esterilização dos cultivos

O crescimento satisfatório da microalga, tão imprescindível para a produção da biomassa utilizada para geração do biodiesel, está atrelado à diversas variáveis físico-químicas e biológicas. Dessa maneira, o estudo do comportamento celular destes micro-organismos é realizado por meio de análises que refletem a quantificação da cultura, parâmetro responsável pela aquisição da massa microalgal.

Tendo em vista que para o desenvolvimento desses micro-organismos fotossintetizantes, é necessária uma fonte luminosa relevante, foi desenvolvido um fotobiorreator de bancada. A partir do estudo da aplicação da luz e da sua intensidade sobre a cultura, avaliou-se o crescimento da *Isochrysis galbana* dentro deste equipamento.

Visando desonerar o processo produtivo de biocombustível obtido a partir da biomassa, durante a etapa de preparo do meio de cultivo foram realizados testes substituindo o processo comumente aplicado para esterilização do meio, autoclavagem, pela adição de volumes controlados de hipoclorito de sódio.

4.1.1 - Teste de adição de hipoclorito

As relações de volume de hipoclorito por volume de meio de cultivo (v/v) foram estudadas nas seguintes porcentagens: 10%, 5%, 1%, 0,1% e 0,01%. Um experimento em branco (sem adição de hipoclorito e com água autoclavada) foi realizado para analisar comparativamente o crescimento dos meios. Os ensaios tiveram duração total de sete dias, nos quais diariamente eram coletadas amostras das culturas para contagem celular fazendo uso de uma câmara de Neubauer para este procedimento (ROEHE, 2013).

A Figura 4.1 representa o crescimento autotrófico em batelada das células de *Isochrysis galbana* em meio de cultivo f/2 (Guillard, 1975), a 25°C ± 2. A curva ilustrada nesta figura

representa os meios aditivados de hipoclorito (10%, 5% v/v) que não apresentaram crescimento celular durante todo o período de análise.

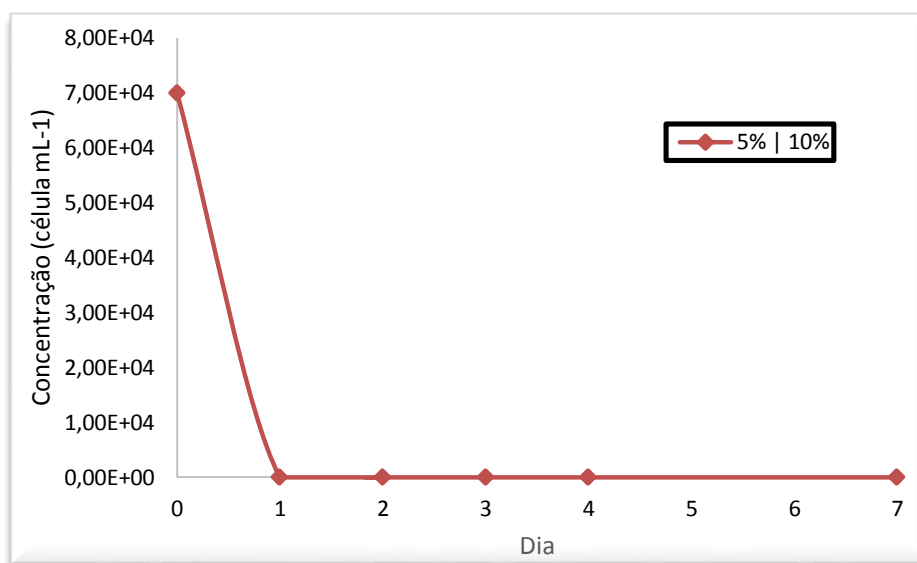


Figura 4.1 - Curvas de crescimento de *Isochrysis galbana* para cultivos aditivados com hipoclorito de sódio a 5% e 10% em v/v. A curva representa a média de três experimentos independentes.

A desativação completa da microalga era algo esperado como resposta à inserção de uma grande quantidade de cloro ativo ao meio de cultivo, mesmo deixando o cultivo em repouso por um período de 48 h e a carga de hipoclorito foi suficiente para tornar o meio completamente estéril.

Para o experimento que teve a adição de 1% v/v de hipoclorito de sódio, o comportamento da curva de crescimento apresentou uma característica peculiar, pois durante os 3 primeiros dias de contagem, foi possível perceber a presença de células no meio, sendo que a concentração inicial não apresentou nenhuma variação; e nas amostras vivas, as células aparentemente não apresentavam movimentação, algo característico de amostras em que há crescimento celular. O esquema pode ser observado na Figura 4.2.

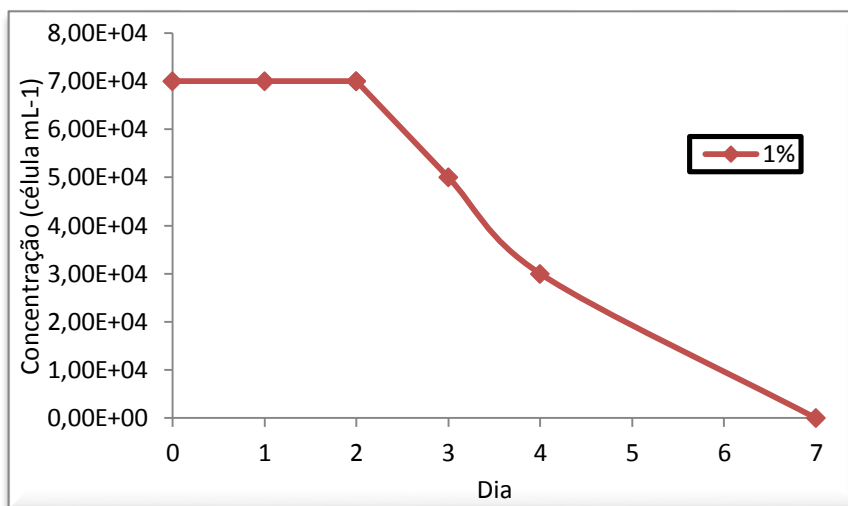


Figura 4.2 - Curvas de crescimento de *Isochrysis galbana* para cultivos aditivados com hipoclorito de sódio a 1% v/v. A curva representa a média de três experimentos independentes.

Já nos ensaios realizados para 0,1% v/v de hipoclorito de sódio, a microalga apresentou uma taxa de crescimento inicial, porém apesar de atingir um pico de 12×10^4 cel.mL⁻¹ no 3º dia, esse crescimento não persiste para os dias seguintes, apresentando decréscimo já no 4º dia. E, por fim, no 7º dia já não é mais possível perceber a presença do microrganismo através da observação microscópica (Figura. 4.3).

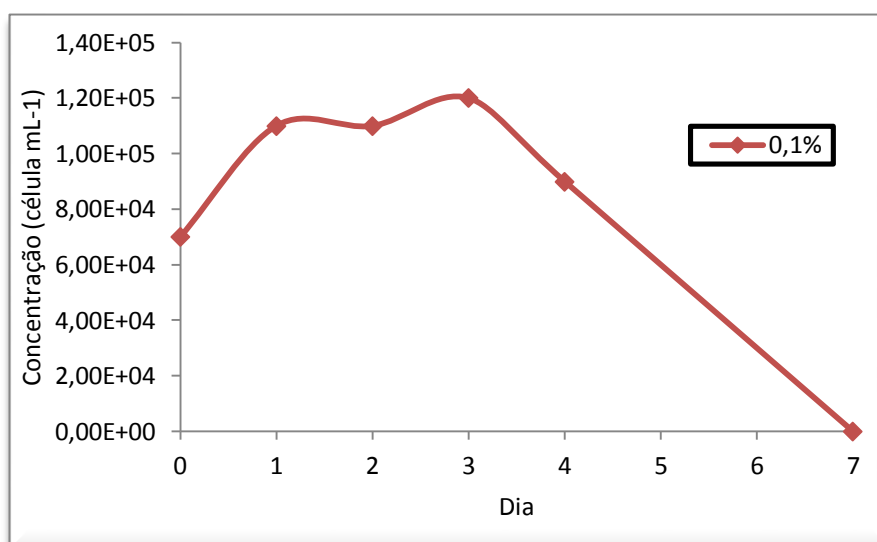


Figura 4.3 - Curvas de crescimento de *Isochrysis galbana* para cultivos aditivados com hipoclorito de sódio a 0,1% v/v. A curva representa a média de três experimentos independentes.

Por fim, o cultivo com 0,01% v/v de hipoclorito apresentou resultados bastantes satisfatórios durante as análises realizadas em laboratório, exibindo uma curva de crescimento característico dos cultivos padrões esterilizados por autoclave, de acordo com a Figura 4.4.

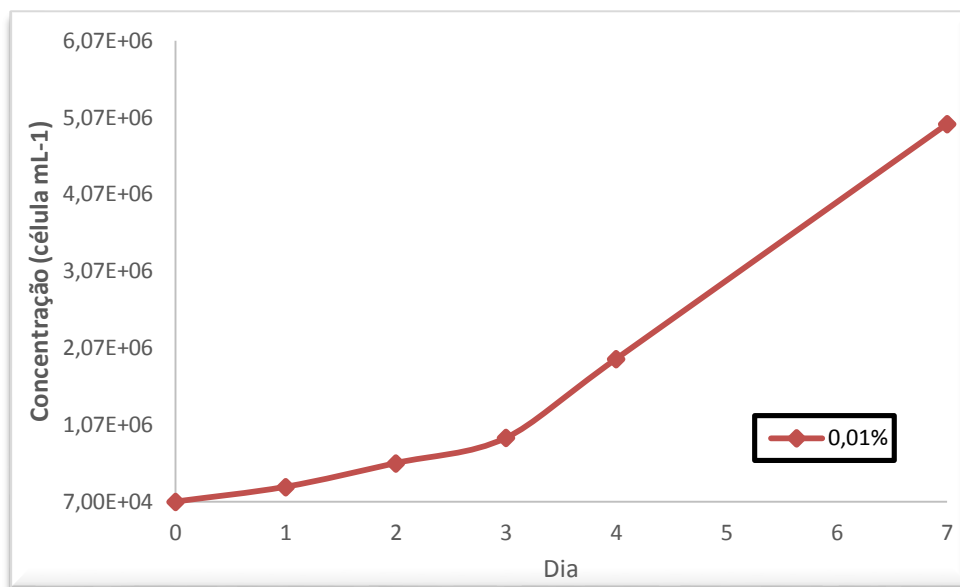


Figura 4.4 - Curvas de crescimento de *Isochrysis galbana* para cultivos aditivados com hipoclorito de sódio a 0,01% v/v. A curva representa a média de três experimentos independentes.

Sendo assim, a partir da análise do crescimento celular é possível perceber que apenas o cultivo com concentração de hipoclorito a 0,01% v/v apresentou desenvolvimento característico. Esta afirmativa pode ser percebida pela sobreposição dos gráficos de água autoclavada, método praticado comumente para esterilização do meio de cultivo, e pelo respectivo gráfico que apresenta a relação de 0,01% v/v de hipoclorito, como é possível perceber na Figura 4.5.

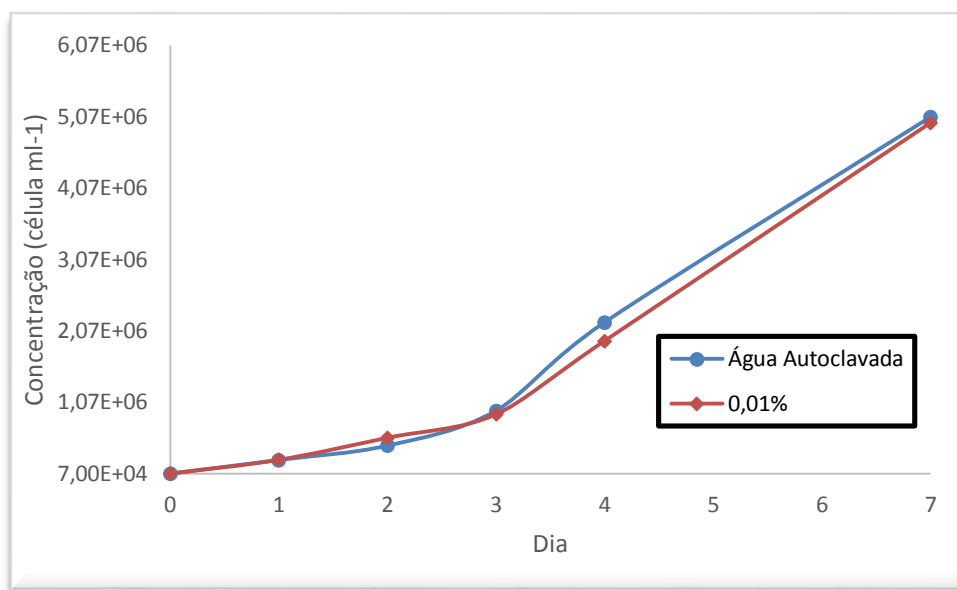


Figura 4.5 - Comparação de crescimento microalgal entre o meio com água autoclavada e com a adição de hipoclorito de sódio a 0,01% v/v.

Em termos de crescimento da matéria orgânica celular, foi mostrado que o tratamento da água pela utilização do hipoclorito de sódio apresentou resultados bastante satisfatórios em certas condições experimentais, chegando a igualar o desenvolvimento celular quando comparado com o método de esterilização comumente empregado.

Sendo assim, pode-se concluir que o emprego do hipoclorito de sódio na concentração de 0,01% v/v se mostrou eficiente para prevenir o desenvolvimento de microrganismos contaminantes na cultura da microalga, e por isso, pode ser considerado eficaz na substituição do processo de autoclavagem. O uso do hipoclorito representa uma redução significativa nos custos de produção da biomassa microalgal, já que suprime, do processo produtivo, a utilização de energia elétrica para desinfecção do meio.

Salienta-se que todos os experimentos foram então realizados utilizando o hipoclorito como agente desinfetante na etapa de preparo do cultivo da microalga *Isochrysis galbana*, a Figura 4.6 apresenta a disposição do cultivo dentro do fotobioreator.



Figura 4.6 - Modelo de cultivo usado para produção de biomassa.

4.1.2 - Taxa de crescimento e rendimento celular

A partir dos dados de crescimento obtidos durante o tratamento com hipoclorito foi possível estimar taxa de crescimento máxima (μ), para o cultivo a 0,01% v/v e para o cultivo padrão, na fase exponencial do crescimento de acordo com a Equação 4.1 (Monod, 1942).

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (4.1)$$

onde X representa a concentração celular (cel/mL), t é a variável de tempo (dias) e μ (dia^{-1}) corresponde a taxa específica de crescimento.

Integrando da Equação 4.1, de t_0 (tempo inicial) até t_f (tempo final), é possível obter a Equação 4.2.

$$\ln(X) = \mu(t_f - t_0) + \ln(X_{t=t_0}) \quad (4.2)$$

Sendo assim, o gráfico na fase exponencial de $\ln(X/X_0)$ x $(t_f - t_0)$, será uma reta com coeficiente angular μ (dia^{-1}), correspondente a cinética de primeira ordem. As Figuras 4.7 e 4.8

apresentam os valores de μ obtidos por regressão linear para os dois cultivos, assim como os respectivos coeficientes de correlação (R^2).

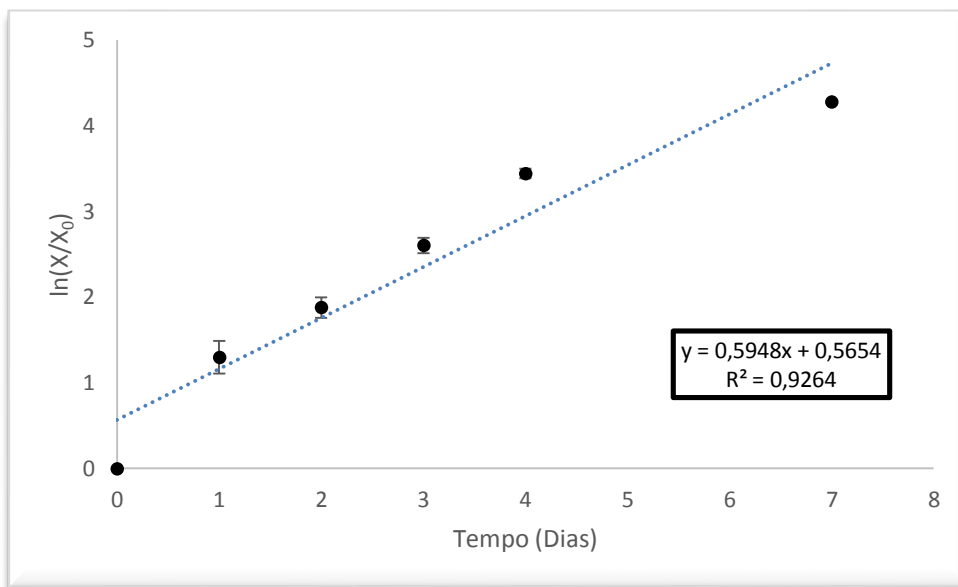


Figura 4.7 - Taxa de crescimento da microalga *Isochrysis galbana* com cultivo padrão.

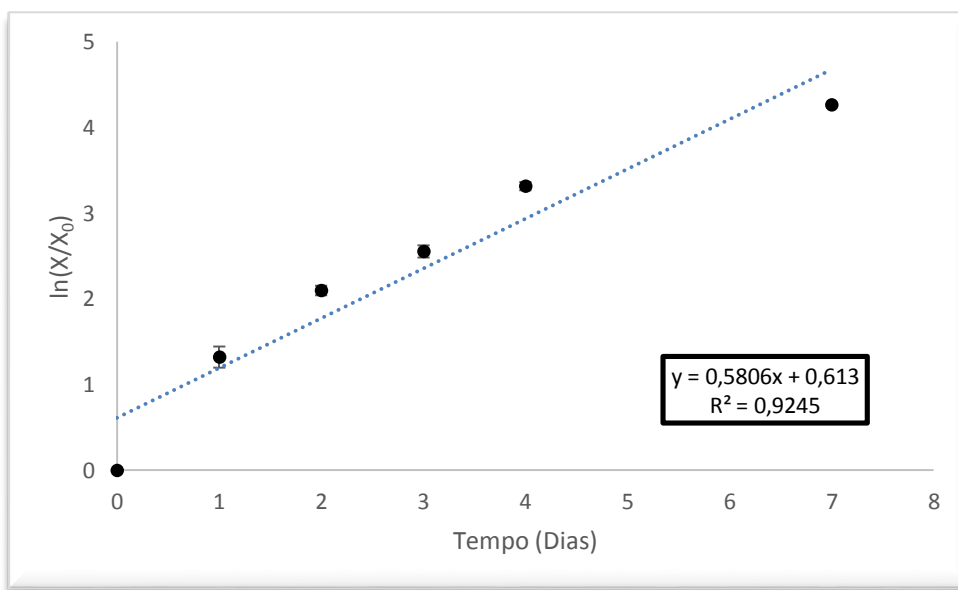


Figura 4.8 - Taxa de crescimento da microalga *Isochrysis galbana* com cultivo 0,01% v/v de hipoclorito.

As taxas de crescimento das culturas foram $\mu = 0,5948 \text{ dia}^{-1}$ e $\mu = 0,5806 \text{ dia}^{-1}$ para o cultivo padrão e o cultivo utilizando 0,01% v/v de hipoclorito, respectivamente. A diferença no cálculo da taxa de crescimento são mínimas nas condições estudadas, demonstrando que os

valores de cel/mL não são significativamente diferentes. Além de que essa diferença pode estar associada ao erro próprio do procedimento de contagem de células, o qual consiste na análise estatística de amostragem, partindo de amostras que são uma pequena parte do todo, do meio de cultura.

4.1.3 - Simulação e extrapolação da cinética do fotobiorreator

Utilizando as informações cinéticas obtidas para os experimentos de 7 dias, foi possível extrapolar esses dados e compará-los com os valores experimentais obtidos para os experimentos de acúmulo de biomassa, que possuía a duração de 15 dias. A Figura 4.9 apresenta a correlação dos dados experimentais para os cultivos de 7 dias.

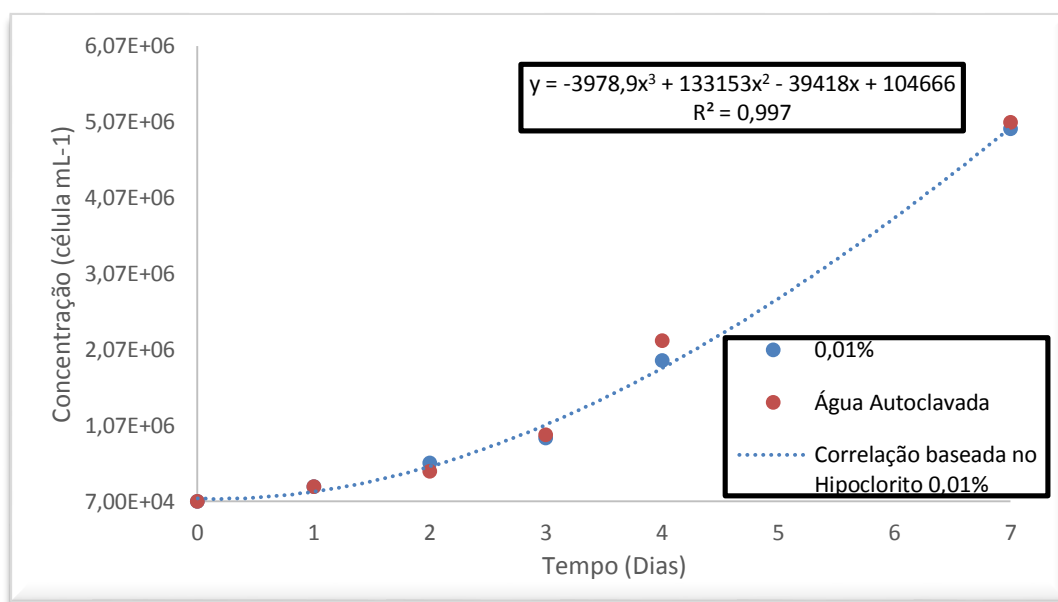


Figura 4.9 - Correlação dos dados experimentais

A partir desta correlação, foi possível extrapolar os dados para um cultivo teórico de 15 dias e comparar com os valores experimentais de um cultivo real. A Figura 4.10 apresenta o comportamento desta relação.

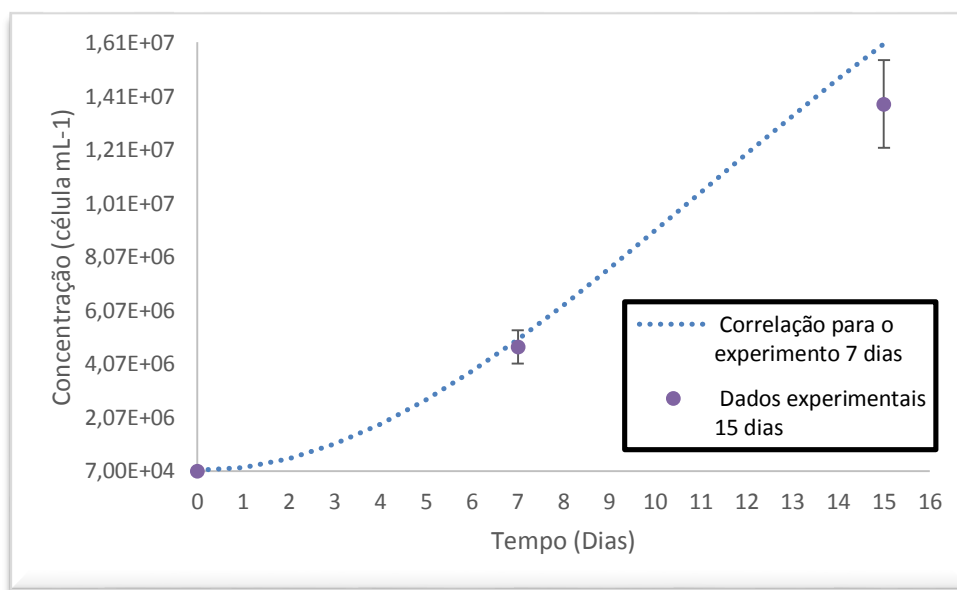


Figura 4.10 - Simulação e extrapolação utilizando equação para cultivos de 7 dias e comparação com dados de cultivos de 15 dias.

Os dados obtidos para a correlação se ajustaram bem com os alcançados nos experimentos para acúmulo de biomassa. Esses experimentos foram analisados sempre nos dias 0, 7 e 15, a fim de ter um controle do crescimento celular da cultura.

O erro percentual entre o valor calculado e o experimental foi de aproximadamente 2%, 1% e 10% para os dias 0, 7 e 15, respectivamente, estando assim dentro da margem de erro esperada que é de 10%.

4.2 - Biomassa

A capacidade de produção de biomassa foi medida em relação a quantidade de biomassa obtida a partir de cultivos de 15 dias utilizando o fotobiorreator. A biomassa é proveniente da etapa de secagem (Figura 4.11) obtida na centrifugação total da cultura, o volume de cultivo foi de 16 L, a biomassa obtida ao longo deste projeto foi de 0,35625 g de biomassa/L.



Figura 4.11 - Biomassa seca

A biomassa obtida, Figura 4.12, foi então acumulada e acondicionada em dessecador para evitar a degradação, a fim de se obter uma quantidade significativa para produção do biocombustível. Com relação a capacidade de testes com a biomassa voltada para a área de biocombustíveis, também analisou-se a capacidade de produção de lipídeos a partir da biomassa seca.



Figura 4.12 - Biomassa triturada

Os testes realizados em triplicatas apresentaram o valor médio de 0,173 g de lipídeos/g de biomassa seca. Já o processo de transesterificação em triplicata obteve um rendimento médio de 0,118 g de óleo/g de biomassa seca, o que representa um total de 67,63% de transesterificação dos lipídios presentes na biomassa.

4.3 - Caracterização do biocombustível

As características que devem ser apresentadas pelos biocombustíveis antes da sua utilização pelo consumidor final são determinadas pela ANP, conforme aponta a Tabela A1 (em anexo). Por meio da consulta a esse padrão nacional foram selecionados, para este trabalho, os parâmetros físico-químicos de maior relevância referentes ao biodiesel adquirido com base nas microalgas, objetivando a comparação entre o produto final pesquisado e as especificações da ANP.

4.3.1 - Transesterificação *in situ* da biomassa

O biocombustível foi obtido através da transesterificação *in situ*, utilizando-se metanol, como álcool, e HCl, como catalisador ácido. Observou-se uma boa separação de fases com uma parte escura rica em glicerina, álcool e resíduo de biomassa e um aspecto mais claro na região pertencente ao biodiesel, conforme está demonstrado na Figura 4.13.



Figura 4.13 - Separação dos produtos produzido por transesterificação *in situ*.

Após a decantação, o biodiesel é lavado e neutralizado e apresentou um aspecto límpido e transparente conforme mostrado na Figura 4.14.



Figura 4.14 - Biodiesel tratado

Em seguida a obtenção do biodiesel proveniente da microalga, o biocombustível foi levado para análises conforme aborda a metodologia do Capítulo 3 desse trabalho.

4.3.2 - Teor de éster

Dentre os aspectos mais importantes analisados, destaca-se o teor de ésteres graxos, que representa a pureza do biodiesel (MARQUES *et al.*, 2010). A análise desse fator é relevante pois a presença de impurezas altera algumas propriedades do combustível, de forma que pode causar problemas no motor como corrosão, abrasão e entupimentos.

O cromatograma dos ácidos graxos da microalga *Isochrysis Galbana* é apresentado na Figura 4.15.

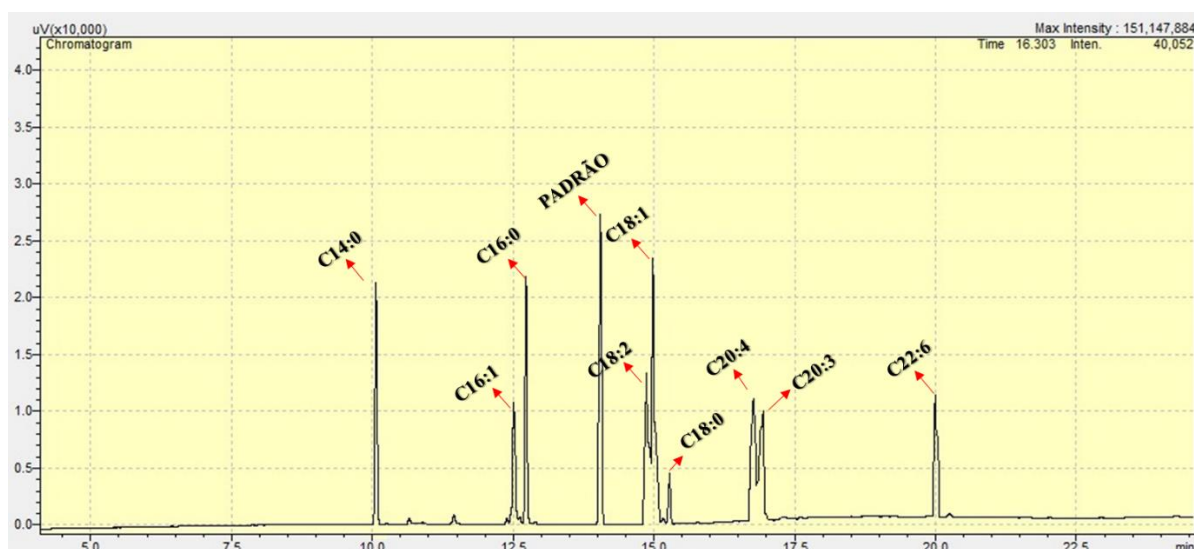


Figura 4.15 - Cromatograma do biodiesel

Pode-se notar a partir do cromatograma do biodiesel que os ésteres presentes na amostra do biodiesel estão de acordo como os dados encontrados na literatura (SÁNCHEZ *et al.*, 2012). A partir do cromatograma é ainda possível identificar a porcentagem de ésteres presentes na amostra de biodiesel, conforme item 3.7.1.1. Os ácidos graxos referentes ao cromatograma estão descritos na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Nomenclatura de ácidos graxos saturados e poliinsaturados

Simbologia	Nomenclatura IUPAC	Nomenclatura usual
C14:0	Ácido tetradecanóico	Ácido mirístico
C16:0	Ácido hexadecanóico	Ácido palmítico
C18:0	Ácido octadecanóico	Ácido esteárico
C16:1n-7	Ácido 9-hexadecenóico	Ácido palmitoléico
C18:1n-12	Ácido-6-octadecenóico	Ácido petroselinico
C18:1n-9	Ácido-9-octadecenóico	Ácido oléico
C18:1n-7	Ácido-11-octadecenóico	Ácido cis-vacênico
C18:2n-6	Ácido linoléico	Ácido-9,12-octadecadienóico
20:3(8,11,14)-6	Ácido 8,11,14-eicosatrienóico	Ácido di-homo- γ -linolênico
20:3(11,14,17)-3	Ácido 11,14,17-eicosatrienóico	Ácido di-homo-(α)-linolênico
20:4n-6	Ácido-5,8,11,14-eicosatetraenóico	Ácido Araquidônico

Simbologia	Nomenclatura IUPAC	Nomenclatura usual
22:6n-3	Ácido-4,7,10,13,16,19-docosaheptaenóico	Ácido cervônico

Fonte: IUPAC-IUB (1977).

A ANP determina que o biodiesel comercializado no país deva apresentar uma pureza mínima de 96,5%. A pureza do biodiesel adquirido neste trabalho foi ainda superior, 98%, àquela previamente estabelecida e reflete um maior rendimento enquanto produto da reação de transesterificação – já que quando há impurezas no biocombustível. Um bom grau de pureza reduz ainda as possibilidades de oxidação do óleo e, conseqüentemente, aumenta a sua eficiência enquanto combustível.

4.3.3 - Massa específica

A densidade do biodiesel está diretamente associada à estrutura das suas moléculas. É possível observar que quanto maior o comprimento da cadeia carbônica do alquiléster, maior será a densidade desse fluido. Contudo, este valor se mostrará reduzido à medida que o número de insaturações presentes na molécula for maior. Consoante com Lobo *et al.* (2009), a presença de impurezas também poderá influenciar na densidade do biodiesel e na estabilidade como, por exemplo, o álcool ou substâncias adulterantes. Assim, a massa específica encontrada no bio-óleo alcançado atingiu o valor 879,47 kg/m³, um valor aceitável para os mercados produtor e consumidor e reflete a síntese de um combustível de qualidade, com uma densidade aplicável à utilização em motores, por apresentar massa e pureza adequadas.

4.3.4 - Viscosidade cinemática

Prosseguindo o estudo, foi analisado o parâmetro de viscosidade cinemática a 40 °C a importância de avaliar esse padrão reside no fato de que os sabões residuais, bem como os glicerídeos não reagidos e os produtos da degradação oxidativa do biodiesel, aumentam a viscosidade do biodiesel (LOBO *et al.*, 2009). Estes contaminantes podem, portanto, serem

monitorados indiretamente através da determinação da viscosidade cinemática a 40 °C. Sendo assim, o valor atingido foi 5,4 mm²/s demonstrando, portanto, um nível de viscosidade adequado para utilização associado a um índice reduzido de produtos residuais observados no bio-óleo. Essas propriedades refletem um combustível limpo e com um alto padrão de qualidade, que tem a capacidade de reduzir ou evitar, inclusive, a deposição de resíduos nas partes internas do motor, prolongando a sua vida útil.

4.3.5 - Teor de água

O teor de água também foi avaliado na composição do um combustível, uma vez que esse composto promove hidrólise do biodiesel, reação que gera como produtos ácidos graxos livres. Além disso, a presença de água num combustível está relacionada ao desenvolvimento de micro-organismos contaminantes, assim como deposição de sedimentos durante o seu armazenamento. Os valores desta propriedade foram obtidos por meio de análises realizadas em dois momentos: pré e pós lavagem do biocombustível. Este experimento foi realizado desta maneira devido o valor alcançado estar acima daquele permitido pela ANP no pós-lavagem do biodiesel. Esta etapa de lavagem é procedimento padrão para a remoção do álcool remanescente, resíduos de biomassa, remoção da glicerina e para permitir que o biocombustível seja inserido dentro dos equipamentos para análises. O valor pré-lavagem foi de 27,56 mg/kg e de 450,91 mg/kg para o pós-lavagem. Este aumento do valor do teor de água presente no biocombustível pode ser justificado pela etapa rigorosa de lavagem, que usa uma grande quantidade de água de maneira repetida.

4.3.6 - Acidez total

O monitoramento da acidez em um biodiesel é de grande relevância sobretudo para o momento da sua estocagem, pois serve tanto para fornecer dados que avaliam o estado de conservação do óleo, quanto para informar sobre a qualidade do produto; assim, deve obedecer os parâmetros fixos pelos órgãos reguladores haja vista que altos índices de acidez danificam as estruturas metálicas. Durante o desenvolvimento do presente estudo, o biocombustível obtido

demonstrou acidez de 0,392 mg KOH g⁻¹ ilustrando, pois, uma acidez perfeitamente aceitável já que tal característica não provocará distúrbios associados a corrosão de tanques de armazenamento ou de motores.

4.3.7 - Poder calorífico

O poder calorífico representa a quantidade de energia térmica que pode ser liberada por determinada quantidade de massa. Isso significa que, para desprender a mesma quantidade de energia liberada pelo diesel, o biodiesel necessita de maior quantidade de massa, aumentando o consumo específico do combustível (PUQUEVICZ *et al*, 2008). Esse parâmetro alcançou o valor 42 J kg⁻¹ no combustível obtido em laboratório. Essa característica não é abordada pela resolução de biocombustível da ANP, mas por demonstrar o potencial satisfatório de liberação de energia associada à combustão deste óleo, a comparação foi feita com o poder calorífico do diesel.

4.4 – Comparação dos parâmetros físico-químicos do biodiesel de microalga e a resolução ANP

Os parâmetros físico-químicos observados na biomassa da microalga *Isochrysis galbana* foram alcançados a partir da metodologia já descrita, com os valores demonstrados na Tabela 4.2, os quais estão sendo comparados com a resolução ANP N°14, de 11.5.2012.

Tabela 4.2 - Comparação entre os parâmetros físico-químicos do biodiesel de microalga e a resolução ANP.

Propriedade	Biodiesel Microalga	Resolução ANP
Teor de éster (% massa)	98	96,5 (mín.)
Massa Específica 20°C (kg/m ³)	879,47	850 a 900

Propriedade	Biodiesel Microalga	Resolução ANP
Viscosidade Cinemática a 40° C (mm ² /s)	5,4	3,0 a 6,0
Teor de água (mg/kg) (pós lavagem)	450,91	350 (max)
Teor de água (mg/kg) (pré lavagem)	27,56	350 (max)
Acidez (mg KOH g ⁻¹)	0,392	0,5 (max)
Poder Calorífico (J kg ⁻¹)	42	40-45 (Diesel)

Dessa maneira, a caracterização do biodiesel proveniente da biomassa da microalga *Isochrysis galbana* sugere que o alcance dos padrões definidos pela ANP é amplamente possível de serem obtidos através do processo de transesterificação *in situ* da biomassa microalgal.

Além disso, pode-se constatar que o biocombustível encontrado se insere nos padrões de controle e monitoramento preconizados pela ANP, de forma que possui enorme capacidade de enquadramento na regulação.

Por sua qualidade e praticidade observadas no processo produtivo, o biocombustível decorrente da *Isochrysis galbana* mostra-se como uma alternativa inteligente, ecológica e adaptável ao aceite e utilização no mercado de combustíveis, bem como ilustra grande possibilidade de receptividade pela indústria deste setor.

Porém, para o emprego do biodiesel como fonte de energia alternativa ainda será necessária uma estimativa dos metais que fazem parte de sua composição ou que foram acrescentados na fase de transesterificação. Segundo Pereira (2012), o monitoramento de metais é indispensável, já que estes são adicionados na forma de hidróxidos e agem como catalisadores no processo de síntese do biodiesel. Esses elementos podem estar presentes na forma de sólidos abrasivos ou de sabões insolúveis, que podem contribuir para danos e corrosão nas peças do motor, afetando seu desempenho e, conseqüentemente, causando danos ambientais.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

5. Conclusões

Diante do exposto, o processo de transesterificação *in situ* aplicado à massa resultante do cultivo da *Isochrysis galbana* produziu resultados amplamente satisfatórios no tocante à qualidade do biocombustível alcançado, considerando aspectos como viscosidade, acidez, teor de água, densidade, teor de éster e poder calorífico.

Os resultados obtidos neste trabalho comprovam que o biodiesel pode ser produzido com êxito a partir de microalgas e que este produto cumpre suficientemente as especificações para combustíveis preconizadas pela ANP.

Além disso, ponderando o potencial fotossintético da *Isochrysis galbana*, as praticidades referentes à sua forma de cultivo, as características físico-químicas de qualidade reconhecidas do biocombustível estudado, e ainda atrelando a novos estudos de análise econômica e um a conhecimento mais amplo sobre a rota de obtenção do biodiesel de microalgas será possível comprovar que as microalgas podem ser utilizadas como fontes renováveis de energia e podem contribuir para a variação da matriz energética que hoje se fundamenta no uso de combustíveis fósseis, tão prejudiciais ao planeta.

A pesquisa sobre o processo de obtenção do combustível, assim como a sua caracterização, permitiu a edificação de conclusões as quais consideraram os objetivos propostos e análise dos resultados obtidos nas condições experimentais avaliadas, tais como:

- O fotobiorreator de bancada desenvolvido se mostrou um equipamento aplicável a pesquisa em questão, uma vez que foi viável realizar o cultivo da microalga *Isochrysis galbana* atingindo os padrões relatados na literatura.
- Em termos de crescimento da matéria orgânica celular, foi mostrado que o tratamento da água pela utilização do hipoclorito de sódio apresentou resultados bastante satisfatórios em determinadas condições experimentais, chegando a reduzir e, a praticamente, igualar, o desenvolvimento celular quando comparado ao uso da autoclave, método de esterilização comumente empregado.

- O uso do hipoclorito representa uma redução nos custos de produção da biomassa microalgal, já que suprime, do processo produtivo, a utilização de energia elétrica para desinfecção do meio.
- Os testes de caracterização dos lipídeos também se mostraram satisfatórios, obtendo um total de aproximadamente 17% em biomassa seca.
- A análise do biocombustível adquirido apresentou resultados satisfatórios, no qual os parâmetros analisados se enquadraram dentro da resolução da ANP, com exceção do teor de água que se mostrou acima do permitido, o que foi ocasionado pelo próprio processo de lavagem do biodiesel ou até mesmo o seu armazenamento. Entretanto, esse aspecto não se caracteriza como um problema, já que é possível obter valores mais baixos para o mesmo a partir de tratamento específicos.

Por fim, este projeto demonstra a capacidade competitiva de produção de bio-óleo da microalga *Isochrysis galbana* em relação a outras fontes produtoras de biodiesel no que concerne a viabilidade energética. Esta avaliação se deu na forma do processo de transesterificação da biomassa obtida a partir do cultivo da microalga, levando em consideração todo o rendimento do processo desde o cultivo até a obtenção final, onde também foi realizado um estudo das características deste combustível.

Apesar da literatura apresentar resultados demonstrando que a energia liberada neste processo é maior do que a energia consumida, tornando o processo energeticamente viável, ainda é necessário que sejam feitos estudos analíticos referentes à viabilidade econômica.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. Referências Bibliográficas

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEL (Brasil). Biocombustíveis: O que são os biocombustíveis. 2012. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?id=470>>. Acesso em: 11 novembro 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEL (Brasil). Boletim Mensal de Biodiesel. 2011. Disponível em: <www.anp.gov.br/?dw=58779>. Acesso em: 11 dezembro 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEL (Brasil). Resolução anp nº 14, de 11.5.2012 - dou 18.5.2012. Disponível em: <http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2012/maio/ranp%2014%20-%202012.xml>. Acesso em: 02 abril 2013.

ALBUQUERQUE, G. A. *Obtenção e caracterização físico-química do biodiesel de canola (Brassica napus)*. 2006. 100 f. *Dissertação* (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2006.

AMARO H. M.; GUEDES A. C.; MALCATA F. X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy* v.88, p.3402–3410, 2011.

ANTONIOLLI, L. R.; BENEDETTI, B. C.; SOUZA FILHO, M. S. M.; BORGES, M. F. Efeito do hipoclorito de sódio sobre a microbiota de abacaxi 'Pérola' minimamente processado. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal, v.27, n.1, 2005.

ARAÚJO, F. P.; PAZ, G. M.; OLIVEIRA, Y. L.; LEITE, C. H. P. Estudo da viabilidade de microalgas para produção de biodiesel. In: CONGRESSO NORTE NORDESTE DE PESQUISA E INOVAÇÃO, 7, 2012, Palmas. **Anais ...** Palmas: IFTO, 2012. Disponível em: <<http://propi.ifto.edu.br/ocs/index.php/connepi/vii/paper/viewFile/3289/1216>>. Acesso em: 05 outubro 2013. ISBN 978-85-62830-10-5

AZEVÊDO, S. H. G. *Extração enzimática de óleo e produção in situ de biodiesel a partir da moringa oleífera Lam.* 2013. 87 f. *Dissertação* (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande de Norte, Natal, 2013.

BANERGEE, A.; SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERGEE, U. C. Bothryococcus braunii: a renewable source of hydrocarbons and others chemicals. *Crit. Rev. Biotechnol.* v.22, p.245-279, 2002.

BARBOSA, E.; BARATA, M. M. L.; HACON, S. S. A saúde no licenciamento ambiental: uma proposta metodológica para a avaliação dos impactos da indústria de petróleo e gás. *Ciênc. saúde coletiva*, Rio de Janeiro, v. 17, n. 2, 2012 .

BECKER, E. W. Micro-algae for human and animal consumption. In: BOROWITZKA, M.A.; BOROWITZKA, L.J. (Eds). *Micro-algal biotechnology*. Cambridge: Cambridge University, p.222-256, 1988.

BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. In: RICHMOND, A. (Ed). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. London: Blackwell Science. p.312-351, 2004.

BENTES, G. M. *Reserva de desenvolvimento sustentável: da realidade à legislação no estado do Amazonas.* 2006. 130 f. *Dissertação* (Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2006.

BRASIL. Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica. Ministério da Educação. *Biodiesel*. Brasília: Ideal, 2006.

BRASIL. Instituto Nacional da Propriedade Industrial. *Mapeamento tecnológico do biodiesel e tecnologias correlatas sob o enfoque dos pedidos de patentes*. Rio de Janeiro, 2008.

BROWN, L. M.; ZEILER, K. G. Aquatic biomass and carbon dioxide trapping. *Energy Convers. Mgmt.* v.34, n.9-11, p.1005-1013, 1993.

BROWN, M. R. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v.145, p.79-99, 1991.

CARVALHO JÚNIOR, R. M. Desenvolvimento e análise energética do processo de obtenção do biodiesel de microalga por metanólise *in situ*. 2010. 99 f. *Dissertação (Mestrado)* - Curso de Engenharia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

CHAGAS, B. M. E. *Influência do estresse nutricional programado na composição da Microalga Marinha Isochrysis galbana*. 2010. 128 f. *Dissertação (Mestrado)* - Curso de Engenharia Química, UFRN, Natal, 2010.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*; v.25, n.3, p.294–306, 2007.

CHISTI, Y. Constraints to commercialization of algal fuels. *Journal of Biotechnology*; v.167, p.201-214, 2013.

CHISTI, Y. Microalgae as sustainable cell factories. *Environmental Engineering and Management Journal*. v.5, n.3, p.261-274, 2006.

COCKS, L. V.; VAN REDE, C.; *Laboratory Handbook for Oil and Fat Analysts*, Academic Press: London, 1966.

CORDEIRO, C. S. *Compostos lamelares como catalisadores heterogêneos em reações de (trans)esterificação (m) etílica*. 2008. 168 f. *Tese (Doutorado)* - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

CUBILLOS, A.; *Calidad y Control de La Polucion del Agua*. Mérida, CIDIAT/Centro Interamericano de Desarrollo Integral de Águas y Tierras, (Mimeo) Série Ambiente y Recursos Naturales Renovables, AR 14, 1981.

DAVIS, S.C.; ANDERSON-TEXEIRA, K. J.; DELUCIA, E. H.; Life-cycle analysis and the ecology of biofuels. *Trends in Plant Science*, 14, 2008.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M. Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.36, n. 6, 2006.

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

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANEY STANLEY, G. H. Simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, v.226, n.1, p. 497, 1957.

FRANCO, A. L. C.; LÔBO, I. P.; CRUZ, R. S.; TEXEIRA, C. M. L. L.; ALMEIDA NETO, J. A.; MENEZES, R. S. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 36, n. 3, 2013.

GAVRILESCU, M.; CHISTI, Y. Biotechnology- a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol. Adv.*, v.23, p.471-499, 2005.

GAMA, P. E.; GIL, R. A.S. S.; LACHTER, E. R. Produção de biodiesel através de transesterificação in situ de sementes de girassol via catálise homogênea e heterogênea. *Quím. Nova*, São Paulo, v.33, n.9, 2010.

GERIS, R.; SANTOS, N. A. C.; AMARAL, B. A.; MAIA, I. S.; CASTRO, V. D.; CARVALHO, J. R. M. Biodiesel de soja: Reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. *Química Nova*, São Paulo, v.30, n.5, p.1369-1373, 2007.

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, WL & MH CHANLEY (Eds.) Culture of Marine Invertebrate Animals. New York. Plenum, p. 29-60, 1975.

GUIMARÃES, L. P. C. *Projeto e construção de um fotobiorreator para crescimento acelerado de microalgas*. 2012. 118 f. *Dissertação (Mestrado)* - Curso de Engenharia Mecânica, Universidade do Minho, Braga, 2012.

GUSCHINA, I. A., HARWOOD, J. L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog.Lipid.Res.* n.45, p.160-186, 2006.

HARRINGTON, K. J.; D'ARCY-EVANS, C. A comparison of conventional and in situ methods of transesterification of seed oil from a series of sunflower cultivars. ***Journal American Oil Chemical Society***; v.62, 1009–1013, 1985.

HOFF, F. H.; SNELL, T. W. Plankton Culture Manual. Published by Florida Aqua Farms, Inc. Florida, p.126, 1987.

HU, D. W.; LIU, H.; YANG, C. L.; HU, E. Z. The design and optimization for light-algae bioreactor controller based on Artificial Neural Network-Model Predictive Control. *Acta Astronaut.*, v.63, p.1067–1075, 2008.

IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN). The nomenclature of lipids (Recommendations 1976). (1977). *Eur J Biochem.*79: 11-21; 1977 Hoppe-Seylers *Z Physiol Chem.* 358: 617-631, 1977. Disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/lipid>. Acesso em 20 Abril 2014.

JHA, A. UK announces world's largest algal biofuel project: Carbon Trust launches £26m project to develop transport fuels made from algae by 2020. *The Guardian*. Londres, 2008.

KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. *Estud. av.*, São Paulo, v. 24, n. 68, 2010.

KOWALSKI, S. C. *Análise da viabilidade técnica econômica do cultivo de microalgas para produção de biodiesel estudo de caso Paranaguá*. 2010. *Dissertação* (Mestrado em Tecnologia). Universidade Federal do Paraná, Instituto de Engenharia do Paraná, Curitiba, 2010.

LAYRARGUES, P. P. Do eco-desenvolvimento ao desenvolvimento sustentável: Evolução de um conceito? *Proposta*, Rio de Janeiro, n.71, p.5-10, 1997.

LENGERT, H. P. *Desinfecção e esterilização*. 2008. 38 f. *Trabalho de Conclusão de Curso* (Especialização) - Escola de Saúde do Exército, Rio de Janeiro, 2008.

LEWIS, T.; NICHOLS, P. D.; MCMEEKIN, T. A. Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid producing microheterotrophs. *Journal of Microbiological Methods*, v. 43, n. 2, p. 107-116, 2000. ISSN 0167-7012.

LOBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. *Quím. Nova*, São Paulo, v.32, n.6, 2009.

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

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

MARQUES, M. V.; NACIUK, F. F.; MELLO, A. M. S.; SEIBEL, N. M.; FONTOURA, L. A. M. Determinação do teor de ésteres graxos em biodiesel metílico de soja por cromatografia gasosa utilizando oleato de etila como padrão interno. *Quím. Nova*, São Paulo, v.33, n.4, 2010.

MEHER, L. C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification – a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 10, n.3, p. 248-268, 2006.

MENDES, T. A.; RODRIGUES FILHO, S. Antes do pré-sal: emissões de gases de efeito estufa do setor de petróleo e gás no Brasil. *Estud. av.*, São Paulo, v. 26, n. 74, 2012.

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

METZGER, P.; LARGEAU, C. *Brotryococcus braunii* a rich source for hydrocarbons and related Esther lipids. *Appl. Microbial.Biotechnol*, n.66, p.486-496, 2005.

MEYER, S. T. Chlorine Use in Water Disinfection, Trihalomethane Formation, and Potential Risks to Public Health. *Cad. Saúde Pública*, v.10, n.1, p.99-110, 1994.

MONOD, J. Recherches sur La Croissance des Cultures Bacteriennes, 1942, *Hermann & Cie*, Paris, 210 p, 1942.

MURPHY, T. Peak Oil Perspective. Disponível em: <<http://physics.ucsd.edu/do-the-math/2011/11/peak-oil-perspective/>>. Acesso em: 02 abril 2013.

NASCIMENTO, I. A.; PEREIRA, S. A.; LEITE, M. B. N. L.; SANTOS, J. N., NASCIMENTO, T. P.; NASCIMENTO, M. A. et al. Microalgas como matéria-prima para biocombustíveis: Importância no cenário atual, principais entraves e resultados promissores na Bahia. *Diálogos & Ciência: Revista da rede de ensino FTC*, Bahia, p.11-29, 2009.

NASCIMENTO, I. A.; SANTOS, I. D.; ALVAREZ, H. M.; SANTOS, R. E. A.; CARVALHO, D. A. Sustentabilidade do Programa Brasileiro e Biocombustíveis: Formação de Pessoal Com um Novo Perfil Profissional como Premissa. *Diálogos & Ciência: Revista da Rede de Ensino FTC*, Salvador, v.12, n.5, p.1-9, dez. 2007.

OHSE, S.; DERNER, R. B.; OZÓRIO, R. A.; BRAGA, M. V. C.; CUNHA, P.; LAMARCA, C. P. et al. Produção de biomassa e teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e proteína em microalgas. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 39, n. 6, 2009.

PARVATKER, A. G. Biodiesel from microalgae – A sustainability analysis using life cycle assessment. *International Journal of Chemical and Physical Sciences*, v.2, p. 159-159, 2013.

PEREIRA, C. M. P.; HOBUSS, C. B.; MACIEL, J. V.; FERREIRA, L. R.; PINO, F. B. D.; MESKO, M. F. et al. Biodiesel renovável derivado de microalgas: avanços e perspectivas tecnológicas. *Quím. Nova*, São Paulo, v.35, n.10, 2012.

PICARDO, M. C. *Desempenho de Isochrysis galbana na Produção de Óleo e Sequestro de CO2 com Fotobiorreator Piloto*. 2012. 201 f. Tese (Doutorado) - Curso de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

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

PUQUEVICZ, A. L.; DYCK, B.; MENEGOTTO, G. F.; PIRES, L. M. Análise comparativa da utilização de diesel e biodiesel no funcionamento de um grupo gerador. *da Vinci*, Curitiba, v. 5, n. 1, p.179-195, 2008.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. 6ª ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, 2001.

RECH, R. Fotobiorreatores para biofixação de CO₂. Rio Grande do Sul: Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos, 2011.

RICHARD, M. G. Algae biofuels startups to watch, 2008.

Disponível em: <<http://www.treehugger.com/files/2008/03/15-algae-biofuelsenergy.php>>. Acesso em: 26 de abril de 2011.

RITTNER, H. *Óleo de mamona e derivados*. São Paulo: H. Rittner, 1996. 559 p.

ROCHA, J. M. S.; GARCIA, J. E. C.; HENRIQUES M. H. F. Growth aspects of the marine microalgae *Nannochloropsis gaditana*. *Biomolecular Engineering*, n.20, p.237-24, 2003.

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

ROEHE, P. M. BMM 5777: Culturas celulares e suas aplicações em Microbiologia. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/labvir/material/contagem_celulas.pdf>. Acesso em: 13 abril 2013.

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

ROSSIN, A. C. Desinfecção. In: Técnica de Abastecimento e Tratamento de Água (Tratamento de Água), Vol. 2, São Paulo: CETESB/ASCETESB, 1987.

SÁNCHEZ, Á.; MACEIRAS, R.; CANCELA, Á.; PÉRES, A. Culture aspects of *Isochrysis galbana* for biodiesel production. *Applied Energy*, v. 101, p.192-197, 2012.

SANCHEZ, M. A.; GARCÍA, M. C.; CAMACHO, F. G.; GRIMA, E. M.; CHISTI, Y. Growth and biochemical characterization of microalgal biomass produced in bubble column and airlift photobioreactors: studies in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, p.1015–1023, 2002.

SANTOS, J. S. C. *Aplicação de ultrassons no deslocamento de petróleo em meio poroso*. 2010. 77 f. *Dissertação* (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

SATYANARAYANA, K. G.; MARIANO, A. B.; VARGAS, J. V. C. A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. *International Journal of Energy Research*, v.35, p. 291-311, 2011.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of vegetable oils: a review. *J. Braz. Chem. Soc.*, São Paulo, v. 9, n. 3, Maio 1998.

SHEEHAN, J.; DUNAHA, Y. T.; BENEMANN, J.; ROESSLER, P. A look back at the U. S. Department of Energy' s Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae. U.S. Report NREL/TP-580-24190. Golden CO: National Renewable Energy Laboratory, 323 p. Colorado, 1998.

SCHENK P. M.; THOMAS-HALL S. R.; STEPHENS E.; MARX U. C.; MUSSGNUG J. H.; POSTEN C.; KRUSE O.; HANKAMER B. Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *Bioenerg. Res.* 1, 20-43, 2008.

SILVA, C. L. M. *Obtenção de ésteres etílicos a partir da transesterificação do óleo de andiroba com etanol*. 2005. 78 f. *Dissertação (Mestrado)* - Curso de Química, Universidade de Campinas, Campinas, 2005.

SILVA, J. I. C. *Aplicação do hipoclorito de sódio na nutrição da soja e do feijão*. 2007. 52 f. *Dissertação (Mestrado)* - Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”, Botucatu, 2007.

SOUSA, M. R. *Estudo do lodo gerado na estação de tratamento de água de Buíque – PE: Caracterização, quantificação e identificação de oportunidades de minimização dos resíduos*. 2009. 145 f. *Dissertação (Mestrado)* - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2009.

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

STEPHENSON, P. G., MOORE, C. M., TERRY, M. J., ZUBKOV, M. V., BIBBY, T. S. Improving photosynthesis for algal biofuels: toward a green revolution. *Trends in Biotechnology*, n.29, 615–623, 2011.

SUGAI, M. H. *Modelagem matemática de coluna de gaseificação de fotobiorreatores tubulares para cultivo de microalgas*. 2012. 222 f. *Dissertação (Mestrado)* - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P. 70º Aniversário do biodiesel em 2007: Evolução histórica e situação atual no Brasil. *Química Nova*, São Paulo, v. 30, n. 8, p.2068-2071, 2007.

TAVARES, J. E. B. *Cultivo de microalgas do género Botryococcus visando a produção de biodiesel*. 2009. 68 f. *Dissertação (Mestrado)* - Universidade De Lisboa, Lisboa, 2009.

THE ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PEAK OIL AND GAS. Newsletter nº. 100. 2009. Disponível em: <http://aspoireland.files.wordpress.com/2009/12/newsletter100_200904.pdf>. Acesso em: 29 maio 2012.

TREDICI, M. R. Mass Production of Microalgae: Photobioreactors. *In: Handbook of microalgal culture: **Biotechnology and Applied Phycology***. Richmond, A., 178-214, Blackwell Publishing, Oxford, 2004.

UGWU, C.U.; H. AOYAGI, H.; UCHIYAMA, H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, v.99, p.4021–4028, 2008.

UGWU C. U.; OGBONNA J. C.; TANAKA H. Light/Dark cyclic movement of algal cells in inclined tubular photobioreactors with internal static mixers for efficient production of biomass. *Biotechnology Letters*. v.27, p.75-78, 2005.

VALENZUELA-ESPINOZA, E.; MILLÁN-NUÑEZ R.; NÚÑEZ-CEBRERO, F. Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll a content in *Isochrysis* aff. *Galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. *Aquacultural Engineering*, n.25, p.207-216, 2002.

VOLLHARDT, K. P. C.; SCHORE, N. E.; *Química Orgânica: Estrutura e Função*, Bookman: Porto Alegre, 2004.

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

WOOD, J. M. Biological cycles for toxic elements in the environment. *Science*, v.183, p.1049-1052, 1974.

WHYTE, J. N. C.; BOURNE, N.; HODGSON, C. A. Influence of algal diets on biochemical composition and energy reserves in *Patinopecten yessoensis* (Jay) larvae. *Aquaculture*, v.78, p.333-347, 1989.

ANEXO A

Tabela A1 - Especificações do Biodiesel

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	LIMITE	ABNT NBR	MÉTODO ASTM D	EN/ISO
Aspecto	-	LII (1)	-	-	-
			7148	1298	EN ISO 3675
Massa específica a 20° C	kg/m³	850 a 900	14065	4052	-
Viscosidade Cinemática a 40°C	mm²/s	3,0 a 6,0	10441	445	EN ISO 12185 EN ISO 3104
Teor de água, máx.	mg/kg	-2	-	6304	EN ISO 12937 EN ISO 12662
Contaminação Total, máx.	mg/kg	24	-	-	NBR 15995
Ponto de fulgor, mín. (3)	°C	100	14598	93	EN ISO 3679
Teor de éster, mín	% massa	96,5	15764	-	EN 14103
Resíduo de carbono, máx. (4)	% massa	0,05	15586	4530	-
Cinzas sulfatadas, máx.	% massa	0,02	6294	874	EN ISO 3987
				5453	EN ISO 20846
Enxofre total, máx.	mg/kg	10	15867		EN ISO 20884
			15554		EN 14108
			15555	-	EN 14109
Sódio + Potássio, máx.	mg/kg	5	15553		EN 14538
			15556		
			15553		
Cálcio + Magnésio, máx.	mg/kg	5		-	EN 14538
			15556		
Fósforo, máx.	mg/kg	10	15553	4951	EN 14107
Corrosividade ao cobre, 3h a 50 °C, máx.	-	1	14359	130	EN ISO 2160
Número Cetano (5)	-	Anotar	-	613	

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	LIMITE	ABNT NBR	MÉTODO ASTM D	EN/ISO
Aspecto	-	LII (1)	-	-	-
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	°C	-7	14747	6890 (6) 6371	EN ISO 5165 EN 116
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,5	14448 -	664 -	EN 14104 (8)
Glicerol livre, máx.	% massa	0,02	15341 (8)	6584 (8)	EN 14105 (8)
Glicerol total, máx. (9)	% massa	0,25	15771 15344	- 6584 (8)	EN 14106 (8) EN 14105 (8)
Monoacilglicerol, máx.	% massa	0,8	15908 15342 (8)	-	
Diacilglicerol, max.	% massa	0,2	15344	6584 (8)	EN 14105 (8)
Triacilglicerol, máx.	% massa	0,2	15344	6584 (8)	EN 14105 (8)
Metanol e/ou Etanol, máx.	% massa	0,2	15343	-	EN 14110 (8)
Índice de Iodo	g/100g	Anotar	-	-	EN 14111 (8)
Estabilidade à oxidação a 110°C, mín. (10)	h	6	-	-	EN 14112 EN 15751 (8)

Fonte: Agência Nacional do Petróleo e, Gás Natural e Biocombustíveis, 2012.