

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO CEARÁ
CAMPUS MARACANAÚ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENERGIAS RENOVÁVEIS

REULLYANNE FREITAS DE AGUIAR

LEVANTAMENTO DA FAUNA MICROALGAL DA LAGOA DE MARACANAÚ - CE,
VISANDO O CULTIVO EM MICROESCALA E A PRODUÇÃO DE BODIESEL A
PARTIR DA ESPÉCIE *Chlorella sp.*

MARACANAÚ – CE

2016

REULLYANNE FREITAS DE AGUIAR

LEVANTAMENTO DA FAUNA MICROALGAL DA LAGOA DE MARACANAÚ – CE,
VISANDO O CULTIVO EM MICROESCALA E A PRODUÇÃO DE BIODIESEL A
PARTIR DA ESPÉCIE *Chlorella sp.*

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Energias Renováveis, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Energias Renováveis.

Orientador: Prof^a. Dra. Erika da Justa Teixeira Rocha

MARACANAÚ – CE

2016

Catálogo na Fonte

A2821 Aguiar, Reullyanne Freitas de.
Levantamento da fauna microalgal da lagoa de Maracanaú - CE, visando o cultivo em microescala e a produção de biodiesel a partir da espécie *Chlorella SP* / Reullyanne Freitas de Aguiar -- 2016.
82f.

Dissertação (Mestrado em Energias Renováveis) - - Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Ceará, Campus Maracanaú, 2016.
Orientadora: Prof^a. Dr. Erika da Justa Teixeira Rocha.

1. MICROALGAS. 2. BIOMASSA. 3. BIODIESEL - PRODUÇÃO. 4. MATRIZ ENERGÉTICA. I.Título. 579.8

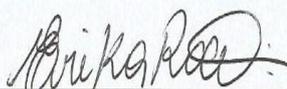
REULLYANNE FREITAS DE AGUIAR

LEVANTAMENTO DA FAUNA MICROALGAL DA LAGOA DE MARACANAÚ - CE,
VISANDO O CULTIVO EM MICROESCALA E A PRODUÇÃO DE BIODIESEL A
PARTIR DA ESPÉCIE *Chlorella sp*

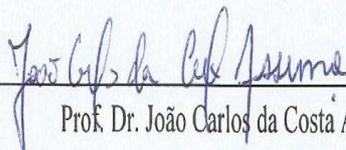
Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Energias Renováveis do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Energias Renováveis, área de concentração Energias Renováveis.

Aprovada em 08/07/2016.

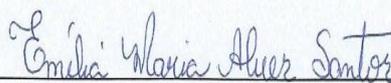
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Erika da Justa Teixeira Rocha (Orientador)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará - IFCE



Prof. Dr. João Carlos da Costa Assunção
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará - IFCE



Profa. Dra. Emília Maria Alves Santos
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará - IFCE

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que sempre esteve ao meu lado e foi meu apoio em todos os momentos.

Minha família, pela coragem com que sempre encararam a vida, dando-me exemplo de persistência e determinação, e, ao longo desta trajetória, pela confiança, preocupação, apoio e incentivos dispensados a mim, imprescindíveis para esta conquista;

Ao meu namorado, pelo carinho, dedicação e companheirismo, mas principalmente pela compreensão por eu ter estado ausente em determinados momentos, mesmo assim, jamais negando apoio, e ciente de que esta realização era um sonho pessoal;

À Prof^ª. Dra. Erika da Justa Teixeira Rocha, pela orientação, incentivo e confiança depositada desde o início deste projeto;

Ao Prof^º. Dr. Raimundo Bemvindo Gomes, responsável pelo Laboratório Integrado de Águas Mananciais e Residuárias, pela doação da cepa de microalga da espécie *Chlorella sp.*;

Ao André Ferreira Porfírio, pela imensa ajuda e confiança;

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – IFCE, Campus Maracanaú, pela oportunidade nos oferecida ao estudo da pós-graduação;

À todos que fazem parte do Laboratório de Microbiologia e Química Ambiental – LAQAMB, bolsistas e professores, pela troca de conhecimentos, e concessão dos equipamentos fundamentais à realização do projeto;

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – IFCE, Campus Tianguá, na pessoa do professor Dr. Cley Anderson Silva de Freitas, pela oportunidade em utilizar o laboratório e os equipamentos necessários para análise de pH e condutividade elétrica;

À Secretaria de Educação do Ceará (SEDUC), por ter concedido o meu afastamento das atividades de ensino, para que pudesse dedicar-me às atividades da pós-graduação;

À banca de professores avaliadores da qualificação, pela atenção nas correções;

A todos os professores do programa de pós-graduação, e todos que fazem parte deste projeto, por todos os conhecimentos transmitidos;

A todos os amigos do programa pela descontração nos momentos de almoço e intervalos, e que de alguma forma tenham contribuído com esse trabalho;

Às amigas queridas Reurilane, Mayara e Marcilene, pelos palpites durante a execução do trabalho;

À Escola Estadual de Ensino Profissional Professor José Victor Fontenelle, na pessoa do Prof. Décio Sabi, pela oportunidade em utilizar o laboratório de química, para o cultivo de microalgas e experimentos necessários no decorrer desta pesquisa;

Ao Prof. Ricardo Dias de Araújo, pela imensa ajuda no laboratório de Química e nos experimentos realizados no IFCE – Tianguá.

Ao Prof. Jair Siqueira da Silva, pelas valorosas considerações no que concerne à escrita deste trabalho;

E a todos que, de alguma forma, direta e/ou indiretamente contribuíram ao desenvolvimento deste projeto.

“O que somos é o presente de Deus para nós.
O que nos tornamos é o nosso presente para
Deus” (ELEANOR POWELL).

RESUMO

Dentre as numerosas aplicações que já se conhece sobre as microalgas, a mais importante, atualmente, é seu potencial biotecnológico. As diferenças existentes entre as microalgas e outras matérias-primas são muitas, dentre estas podendo-se destacar: a alta eficiência na conversão da luz solar em biomassa, o sequestro de gases causadores do efeito estufa, e o fato de não necessitarem de terras e água com qualidade, pois suas exigências nutricionais são simples. Sendo assim, as microalgas podem ser utilizadas como fonte para suprir a crescente demanda de energia que está prevista para as próximas décadas. Desse modo, este trabalho objetivou fazer um levantamento das microalgas existentes na lagoa de Maracanaú, situada no município de Maracanaú–Ceará, Brasil, identificando-as através de chaves especializadas, e cultivando em microescala as espécies com potencial biotecnológico para o uso na produção de biodiesel, extraindo a biomassa seca da microalga escolhida, obtendo o óleo e a partir dela, produzir o biodiesel. As espécies selecionadas foram: *Chlorella sp*, *Nitzschia sp*, *Pediastrum simplex*, e *Scenedesmus obliquus*, contudo o isolamento das mesmas não foi concretizado devido a fatores como parasitas naturais (zooplâncton) e fungos. Com isso, optou-se por utilizar uma cepa já isolada doada pelo professor Dr. Raimundo Bemvindo Gomes, do Instituto Federal do Ceará – campus Fortaleza. A espécie escolhida foi a *Chlorella sp*, devido estar presente em todas as amostras das coletas realizadas na lagoa de Maracanaú, e pelo potencial biotecnológico que tal espécie possui. Para a obtenção da biomassa seca foi realizado os procedimento de centrifugação, congelamento e liofilização, a fim de retirar toda umidade. Para a extração do conteúdo lipídico, foi macerada a biomassa e utilizado um aparelho de ultrassom para romper a parede celular das microalgas, e finalizando o experimento, a produção do biodiesel foi realizada através do processo de transesterificação, alcançando um rendimento de 7,52% obtido através dos óleos extraídos da biomassa seca das microalgas. Com isso, verificou-se que o estudo utilizando microalgas é bastante promissor, que é possível realizar o cultivo em escala laboratorial, porém, ainda faz-se necessário um estudo para aperfeiçoa-lo, visando melhorar os rendimentos com a biomassa, visto que o resultado obtido apresenta-se inferior ao que foi comparado em outras literaturas.

Palavras-chave: Microalgas; Energia; e Biodiesel.

ABSTRACT

Among the many applications that is already known about microalgae, the most importante, nowadays, is its biotechnological potential. The differences between microalgae and other raw-material are many, among them can be highlighted: the high efficiency on sunlight converting into biomass, the sequestration of greenhouse gases, and the fact that they do not require land and water quality, because their nutritional requirements are simple. Therefore, microalgas can be used as source to supply the growing energy demand, which is expected for the next decades. This way, this study aimed to do a survey of microalgae in Maracanau Lake, located at Maracanau City, of Ceara – Brazil, identifying them through specialized keys, and cultivating in microscale the species with biotechnological potential for the use in biodiesel production, extracting dry biomass of the chosen microalgae, getting the oil and from it produce biodiesel. The selected species werer: *Chlorella* sp, *Nitzschia* sp, *Pediastrum simplex* and *Scenedesmus obliquus*, however, their isolation was not achieved due to factors such as natural parasites (zooplankton) and fungi. Thereby, it was decided to use an already isolated strain, donated by professor doctor Raimundo Bemvindo Gomes, from Federal Institute of Ceara – Fortaleza campus. The chosen specie was *Chlorella* sp, due it be present in all samples taken at Maracanau lake, and its biotechnological potential. To obtain the dry biomass was performed following the centrifugation, freezing and lyophilization, in order to remove all moisture. For the extraction of lipid content, the biomass was made through transesterification process, reaching a yield of 7,52% obtained from oils extracted by the dry biomass of microalgae. Therewith, it was found that the study using microalgae is very promising, that is possible to perform the cultivation in laboratorial scale, still it makes necessary a study to improve it, to get better the incomes with biomass, since the obtained presented results was lower than that compared to other literatures.

Keywords: Microalgae; Energy; Biodiesel.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Matriz Energética Mundial - 2010.....	16
Figura 2 - Matriz Energética Brasileira - 2014.....	17
Figura 3 - Tipos de energias quanto à origem e renovabilidade.....	18
Figura 4 - Principais grupos de algas	24
Figura 5 - Sistemas de cultivos aberto e fechado	30
Figura 6 - Representação esquemática da curva de crescimento de microalgas	30
Figura 7 - Câmara de Newbauer.....	31
Figura 8 - Microalgas <i>Chlorella</i>	33
Figura 9 - Lagoa de Maracanaú – CE, Brasil	41
Figura 10 - Coleta dos microrganismos.....	42
Figura 11 - Esquema do método de diluição seriada.....	44
Figura 12 - Inoculação em placa de Petri, esgotamento em estrias.....	44
Figura 13 - Cultivo em microescala	45
Figura 14 - Reação de Transesterificação.....	50
Figura 15 – Microalgas abundantes na lagoa de Maracanaú – CE, Brasil	54
Figura 16 - Isolamento em meios sólidos.....	56
Figura 17 - <i>Chlorella sp</i> aumentada em lente objetiva de 40x.....	57
Figura 18 - Comparação entre os tratamentos	58
Figura 19 - Curvas de crescimento dos tratamentos.....	61
Figura 20 - Cultivo da espécie selecionada	62
Figura 21 - Esquema ilustrativo do aumento de volume no cultivo.....	62
Figura 22 - Curva de crescimento das microalgas.....	63
Figura 23 - Biomassa seca da microalga <i>Chlorella sp</i>	64
Figura 24 - Maceração da biomassa	65
Figura 25 - Conteúdo lipídico da microalga <i>Chlorella sp</i>	66
Figura 26 - Produção de biodiesel	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação de diferentes matérias-primas para a produção de biodiesel.....	27
Tabela 2 - Diferentes fontes de óleo para produção de biodiesel.....	34
Tabela 3 - Percentual de lipídeos em microalgas em relação à massa seca	38
Tabela 4 - Localização Geográfica dos pontos coletados.....	41
Tabela 5 – Experimento com concentração diferente de Fosfato.....	46
Tabela 6 - Temperatura da lagoa durante as coletas.....	52
Tabela 7 - Espécies de microalgas predominantes em cada coleta	54
Tabela 8 - Espécies escolhidas de acordo com a porcentagem de lipídeos.....	55
Tabela 9 – Resultados para os diferentes tratamentos.....	58
Tabela 10 - Rendimento do teor lipídico de várias espécies	66

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	Matriz Energética.....	15
2.1.1	Matriz Energética Mundial.....	15
2.1.2	Matriz Energética Brasileira.....	16
2.1.3	Matriz Energética Renovável e Não Renovável.....	17
2.2	Energia de Biomassa.....	20
2.3	Microalgas	22
2.3.1	Conhecimentos Gerais.....	23
2.3.2	Biodiversidade das Algas	25
2.3.3	Potencial Biotecnológico e Energético.....	26
2.3.4	Influência dos Fatores Ambientais Sobre o Cultivo de Microalgas	27
2.3.5	Modos de Cultivos de Microalgas.....	29
2.3.6	Curva de Crescimento	30
2.3.7	<i>Chlorella sp</i>	33
2.4	Biodiesel	34
2.4.1	Biodiesel no Mundo	35
2.4.2	Biodiesel no Brasil	35
2.4.3	Legislação e Normas para Biodiesel no Brasil.....	36
3	FUNDAMENTAÇÃO OU QUADRO TEÓRICO: VISÃO DE MUNDO SUBJACENTE À FORMULAÇÃO DO PROBLEMA E SELEÇÃO DO MÉTODO DE PESQUISA.....	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1	Área de estudo	40
4.2	Caracterização do Experimento	41
4.2.1	Coleta das Amostras.....	41

4.2.2	Identificação das Espécies.....	43
4.2.3	Escolha e Isolamento da Espécie para Cultivo.....	43
4.2.4	Meios de Cultivo	45
4.2.5	Experimento com diferentes proporções de nutrientes (nitrato e fosfato)	46
4.2.6	Cultivo em Microescala.....	46
4.2.7	Curva de Crescimento.	47
4.2.8	Obtenção da Biomassa Seca.....	49
4.2.9	Extração do Conteúdo Lipídico.....	49
4.2.10	Produção do Biodiesel de Microalga.....	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1	Coleta dos Microrganismos	52
5.2	Identificação das Microalgas	52
5.3	Escolha da Espécie Para Cultivo	55
5.4	Isolamento das Espécies Escolhidas	55
5.5	Experimento com diferentes proporções de nutrientes (fosfato)	57
5.6	Curva de Crescimento e Cultivo em Microescala	61
5.7	Obtenção da biomassa seca.....	63
5.8	Extração do conteúdo lipídico	65
5.9	Produção do biodiesel da microalga <i>Chlorella sp</i>	66
6	CONCLUSÃO.....	69
	REFERÊNCIAS	71
	ANEXOS.....	82

1 INTRODUÇÃO

A busca pelo desenvolvimento e crescimento econômico bem como a introdução de novas tecnologias fizeram com que as nações procurassem obter dos seus principais setores produtivos um crescimento a qualquer preço. Conforme os dados apresentados pelo Relatório do Desenvolvimento do Banco Mundial em 2014, mais de 80% do atendimento das necessidades energéticas provêm da hidroeletricidade, dessa forma a escassez de água, significa que muitas empresas irão necessitar comprar petróleo e outras fontes de energias, expondo o país e os consumidores aos altos custos da geração de eletricidade.

Para ter sustentabilidade ambiental e ser economicamente viável, o processo de produção de combustíveis não só requer a utilização de fontes renováveis, mas também que seja capaz de contribuir para a melhoria do meio ambiente. Assim, a busca por combustíveis alternativos vem ganhando destaque nas últimas décadas, e com isso, os biocombustíveis estão sendo apresentados como alternativa para a geração de energia renovável com menor grau de poluição (MELO, 2012).

Os principais biocombustíveis utilizados no Brasil, o etanol e o biodiesel, são produzidos a partir de fontes renováveis, e contribuem positivamente para redução da poluição atmosférica, além de minimizar as emissões de gases de efeito estufa. O biodiesel pode ser produzido a partir do óleo de diferentes espécies de oleaginosas, como mamona, dendê, girassol, amendoim, soja, além de matérias-primas de origem animal como sebo bovino e gordura suína (MASIERO e LOPES, 2008).

Uma nova matéria-prima para a geração de biocombustíveis tem chamado atenção de institutos e centros de pesquisas, bem como de órgãos governamentais. Trata-se das microalgas. Elas são uma fonte de energia que não competem com as culturas alimentares, além de sequestrar maior quantidade de gás carbônico (CO₂) durante o seu crescimento em comparação com outras oleaginosas (AZEREDO, 2012).

As microalgas dispõem de um bom potencial energético, mas apesar dessa característica, muitos autores ressaltam a necessidade de serem realizadas mais pesquisas nessa área para que a produção de biocombustível se torne mais viável economicamente (FRANCO, 2013).

Tendo ciência que as microalgas possuem grande potencialidade em âmbito biotecnológico, este trabalho objetivou identificar a fauna de microalgas típicos da lagoa de Maracanaú-CE, Brasil, e fazer uma produção de biodiesel a partir de espécies nativas, sendo necessário para isso, isolar as espécies que contenham maior conteúdo lipídico, cultivar as microalgas em escala laboratorial, obter a biomassa seca da espécie selecionada, realizar a extração do óleo de microalgas e produzir biodiesel utilizando o óleo da espécie.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Matriz Energética

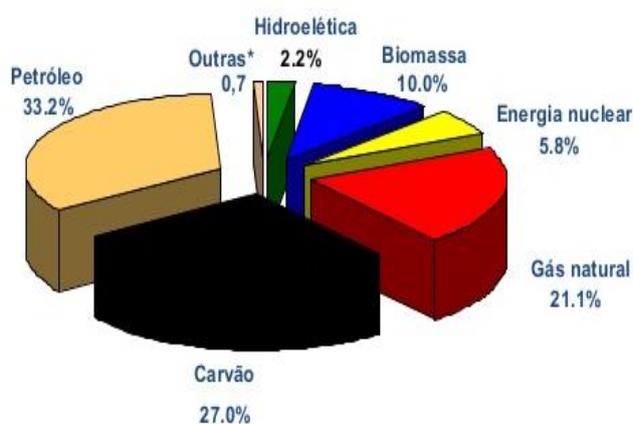
A matriz energética é definida como o conjunto de todos os recursos energéticos disponíveis em um determinado território. Essa matriz é uma representação quantitativa, servindo de orientação para que o setor energético possa planejar suas atividades ligadas à produção, transporte, inovação e venda de energia (TOLMASQUIM, GUERREIRO e GORINI, 2007).

Para Goldemberg e Lucon (2007), energia, ar e água são ingredientes essenciais à vida humana. A energia era obtida, na sociedade primitiva, através da queima de lenha das florestas. Já na idade média foram acrescentadas as energias provenientes da água e do vento, e atualmente, a matriz energética “limpa” vem sendo constituída através dos raios solares, das forças dos ventos e da água. Silva (2009) afirma que além dessas fontes ainda são utilizados os derivados do petróleo e o gás natural.

2.1.1 Matriz Energética Mundial

A matriz energética mundial vem crescendo de forma bastante acelerada e mudou muito nos últimos anos. As causas dessa mudança são as mais diversas, entre elas, Tolmasquim, Guerreiro e Gorini (2007) relatam o aumento populacional, e com isso, o aumento da demanda energética.

Dentre os tipos de energias mais utilizados mundialmente, estão as fontes energéticas não renováveis, como os combustíveis fósseis (petróleo, gás natural e carvão mineral), como mostra a Figura 1 (p. 16). Estes somam 81,3% da energia disponibilizada, estimada em 11.435 milhões de toneladas equivalentes de petróleo (IEA, 2010). Esse valor causa uma grande preocupação mundial, devido ao possível esgotamento desses recursos e também às mudanças climáticas decorrentes da emissão dos gases de efeito estufa, que apontam para uma crise ambiental (BERMAN, 2008).



* Inclui geotérmica, solar, eólica, térmica, tec.

Figura 1 - Matriz Energética Mundial - 2010
Fonte: Internacional Energy Agency (2010).

Um aumento da oferta de bioenergia na matriz energética global poderia reduzir o uso de combustíveis fósseis. Isso contribuiria para a segurança energética dos países durante o período de transição do atual modelo energético para modelos mais eficientes, limpos, socialmente aceitáveis e de menor impacto sobre a emissão dos gases do efeito estufa (MIURA, 2012).

2.1.2 Matriz Energética Brasileira

A matriz energética brasileira é uma das mais “limpas” do planeta, sendo o Brasil o país que mais utiliza energia renovável. Para Mariuzzo (2007), 44% da oferta interna de energia provêm de fontes renováveis, enquanto que no âmbito mundial esse índice é de aproximadamente 18%, sendo que a energia elétrica vem principalmente das usinas hidrelétricas. Assim, afirmam Goldemberg e Lucon (2007), que apesar das dificuldades enfrentadas com os abastecimentos e com o clima característico de cada região, o país utiliza mais recursos renováveis provenientes de fontes hídricas e biomassas.

Anjos, Rocha e Andrade (2014) relatam que o Brasil ocupa uma posição singular, pois tem como principal forma de produção de energia elétrica as usinas hidrelétricas, as quais utilizam a força das águas para a movimentação de turbinas na geração de energia. Porém, no setor de transportes, desde a crise do petróleo de 1970, o país desenvolveu sua matriz

energética por meio de uma importante taxa de contribuição do etanol e mais recentemente, com o uso de biodiesel.

Segundo a Confederação Nacional da Indústria (2010), a participação de fontes renováveis no Brasil é três vezes maior que a média mundial. Além disso, o modelo brasileiro de energia apresenta potenciais para expansão, o que irá resultar em oportunidades e investimentos a longo prazo.

Para Rodrigues (2008), a energia eólica e solar devem gerar quase 500 TW.h em 2030. Isso deixará o Brasil na frente de outros países, visto que o clima tropical e a captação dessas fontes de energias irão possibilitar a exploração de diversas fontes de energia.

De acordo com o Ministério de Minas e Energia (2014), observou-se que a utilização de fontes renováveis foi de 39,4%, como está apresentado na Figura 2, ocasionando um pequeno decréscimo na participação dessas fontes na matriz energética, quando comparados aos anos anteriores. Segundo o Ministério, isso ocorreu, principalmente, devido a uma diminuição da geração hidráulica e do baixo desempenho do consumo de lenha.

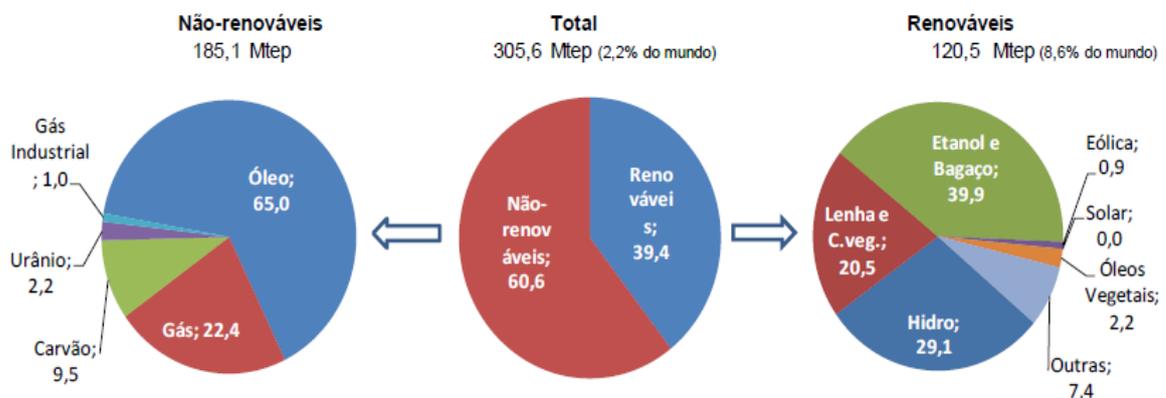


Figura 2 - Matriz Energética Brasileira - 2014
Fonte: Ministério de Minas e Energia (2014)

2.1.3 Matriz Energética Renovável e Não Renovável

Existem inúmeras fontes de energia disponíveis no planeta. Silva (2004) considera como fonte energética toda substância (petróleo, carvão, urânio, biomassa) capaz de produzir tal força em processos de transformação (combustão e fissão nuclear) e também as formas de energia (solar e gravitacional), associadas ou não, ao movimento dos corpos fluidos (ondas e hidráulica) e gases (eólica), ou à temperatura das substâncias (geotérmica).

Essas fontes podem ser classificadas, segundo Goldemberg (1979) como:

- Convencionais: petróleo, gás natural, hidroeletricidade e biomassa tradicional;
- Não convencionais ou alternativas: biomassa moderna, energia eólica, maremotriz, geotérmica e solar;
- Fontes exóticas: fusão nuclear e calor dos oceanos.

Silva (2004), entretanto, modifica essa classificação e sugere que as fontes sejam divididas conforme sua origem e renovabilidade. Com relação à origem, as fontes podem ser primárias, quando são originadas de processos fundamentais da natureza (solar e gravitacional), e secundárias, quando derivadas das primárias por ações e transformações, como a biomassa e a força das marés. No que diz respeito à renovabilidade, a energia pode ser classificada em renovável e não renovável.

A Figura 3 representa a classificação sugerida por Silva (2004), exemplificando os tipos de energias quanto à renovabilidade.

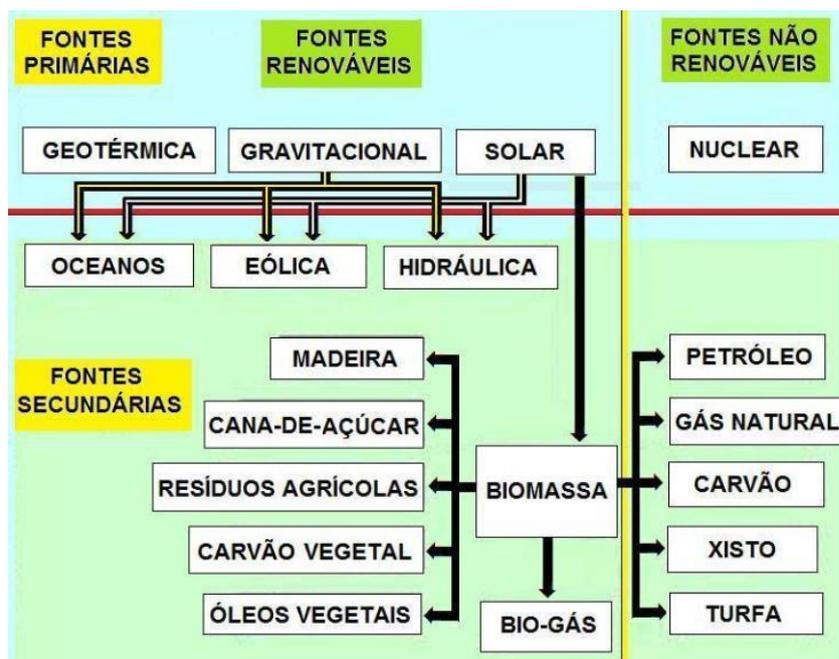


Figura 3 - Tipos de energias quanto à origem e renovabilidade
Fonte: SILVA (2004).

As fontes não renováveis são definidas, de acordo com Rocha e Costa (2014), como aquelas que se utilizam de recursos naturais esgotáveis, ou seja, possuem quantidades limitadas e se extinguem com a sua utilização (PENA, 2012). Os principais exemplos são os combustíveis fósseis e os combustíveis nucleares.

Os combustíveis fósseis (carvão mineral, gás natural e petróleo) contêm alta quantidade de carbono, usado para alimentar a combustão. Esse tipo de utilização de combustível gera uma preocupação ambiental, pois sua queima produz cerca de 21,3 bilhões de toneladas de dióxido de carbono (CO₂) por ano, e metade dessa produção atinge a atmosfera (MACIEL, 2007).

Segundo Metri (2008), o Brasil possui a sexta maior reserva mundial para a produção de energia nuclear, tendo sido pesquisado somente 30% do território nacional. Esse tipo de energia possui aplicações em diversas áreas, como: geração de energia elétrica, utilização de radioisótopos e radiofármacos na área de saúde, aplicação de radiação em indústrias, agriculturas e em monitoramento do meio ambiente.

Porém, na natureza, não existe somente fonte de energia que se esgota com o tempo. Lucon e Goldemberg (2009) relatam que essas fontes são menos poluentes e são produzidas em pequenas quantidades.

Devido às mudanças climáticas, as energias renováveis aparecem como alternativa para reduzir os efeitos da crise ambiental (AGUILAR, OLIVEIRA, e ARCANJO, 2012). O uso dessas energias pelas indústrias é uma ação estratégica que exige planejamento e responsabilidade ambiental, além de amplo envolvimento e conhecimento quanto aos recursos provenientes da natureza (RODRIGUES, 2006).

Contudo, além de prover esses benefícios, as fontes de energia renováveis, se implantadas apropriadamente, podem também contribuir para o desenvolvimento social e econômico, para a universalização do acesso à energia e para a redução de efeitos nocivos ao meio ambiente e a saúde (IPCC, 2011).

Os tipos de energias renováveis são:

- Eólica: seu aproveitamento ocorre por meio da conversão da energia cinética de translação em energia cinética de rotação, com o emprego de turbinas eólicas, também denominadas aerogeradores, para a geração de eletricidade, ou cataventos (e moinhos), para trabalhos mecânicos como bombeamento d'água (ANEEL, 2006). Para Camargo (2005), a Energia Eólica vem se destacando como uma das principais fontes alternativas de energia elétrica. Possui baixo impacto ambiental, porém sua estrutura deve ser instalada onde a ventilação seja grande.
- Solar: é transformada em energia através dos painéis fotovoltaicos. Essa energia, nas áreas industrial, agrícola e doméstica, tem se mostrado técnica e economicamente viável em países do primeiro mundo, pois possui baixo impacto ao meio ambiente, porém alto custo de equipamentos (SANTOS, 2007).

- Hidráulica: segundo Bortoleto (2001), a energia hidráulica provém da condensação, precipitação e evaporação das águas, fatores causados pela irradiação solar e pela energia gravitacional. As usinas hidrelétricas têm a capacidade de transformar energia cinética, em elétrica. Para Santos (2007), essa energia não polui a água, e não provoca emissão de gás do efeito estufa. Em contrapartida, gera alto impacto ambiental, alagando regiões, e ocasionando o deslocamento de população local, além de modificar fauna e flora.
- Geotérmica: energia térmica proveniente do interior da Terra, podendo ser capaz de solucionar alguns dos problemas atuais de energia e meio ambiente, tornando-se um recurso fundamental para tornar a sociedade mais sustentável (OZGENER, HEPBASLI e DINCER, 2007). Ocupa um pequeno espaço em sua instalação e produz poucos resíduos, porém alto custo dos equipamentos utilizados (GOMES, 2009).
- Maremotriz: segundo Walisewicz (2008), essa energia é gerada a partir do potencial energético contido no fluxo das marés. Nos períodos de maré baixa, a água sai e movimenta as turbinas, um sistema de conversão que possibilita a geração de eletricidade.
- Oceanos: é resultante da transformação da energia contida nas ondas marítimas em energia elétrica, através de um gerador (CRUZ, 2008).
- Biomassa: segundo Cortez *et al.* (2008) a biomassa tem origem em resíduos sólidos urbanos, são eles: animais, vegetais, industriais e florestais. Quando voltada para fins energéticos, abrange a utilização desses vários resíduos para a geração de fontes alternativas de energia.

2.2 Energia de Biomassa

De acordo com a Companhia Energética de Minas Gerais (2012), biomassa é todo recurso renovável proveniente de matéria orgânica, sendo esta, de origem animal ou vegetal, que pode ser utilizada na produção de energia. Constitui uma forma indireta de energia solar, uma vez que as plantas capturam energia do sol, através do mecanismo de fotossíntese, transformando-a em energia química. Essa energia pode ser convertida em eletricidade, combustível ou calor.

A utilização dessa biomassa, como combustível, pode ser feita a partir de sua forma bruta, como madeira, resíduos agrícolas, resíduos florestais, resíduos pecuários, excrementos de animais e lixo (DECICINO, 2007).

Goldemberg (2009) afirma que a utilização da biomassa tem inúmeras vantagens, pois possui baixo custo, é renovável, ajuda a sequestrar CO₂ do ar, permite o reaproveitamento de resíduos, e, além disso, é menos poluente.

São utilizadas como objeto de estudo e como matérias primas para a biomassa a cana-de-açúcar, beterraba, eucalipto, cupuaçu, lixo orgânico, lenha, carvão vegetal, mamona, coco babaçu, amendoim, soja, dendê, casca de arroz, milho, microalgas, dentre outros (MASIERO e LOPES, 2008).

Abaixo serão listados alguns dos produtos derivados da biomassa:

- Bioenergia: é gerada pela queima direta da biomassa, como madeira, casca de arroz, bagaço de cana-de-açúcar, entre outros (MORAIS *et al.*, 2009).
- Carvão Vegetal: é proveniente da queima parcial da madeira (SANTOS e HATAKEYAMA, 2012).
- Biofertilizantes: são líquidos que podem ser utilizados no solo ou em tratamento foliares, como inseticida natural e adubo (OLIVEIRA, 2014).
- Biocombustível: é definido como uma substância derivada de biomassa renovável, tal como o biodiesel, etanol e outras substâncias estabelecidas em regulamento da Agência Nacional do Petróleo (ANP). Pode ser empregada diretamente ou mediante alterações em motores à combustão interna ou para outro tipo de geração de energia, podendo substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil (BRASIL, 1997). Adicionalmente, de acordo com a União Europeia (2003), são classificados em: Bioetanol, Biodiesel, Biogás, Biometanol, Biocombustíveis sintéticos, Bio-hidrogênio e Óleo vegetal puro produzido a partir de plantas oleaginosas.

Goldemberg (2009) afirma que existe um grande número de tecnologias de conversão energética da biomassa, para aplicações em pequena e grande escala. Nesse grupo, estão inclusos: gaseificação, método de produção de calor e eletricidade, recuperação de energia de resíduos sólidos urbanos, gás de aterros sanitários, além de biocombustíveis para o setor de transportes, ou seja, etanol e biodiesel. Assim, relatórios do Ministério de Minas e Energia (2014) apontam que o Brasil supera a média mundial de participação da energia de

biomassa na oferta interna de energia, que gira em torno de 13,6 %, e ultrapassa em muito os países desenvolvidos, onde essa participação está em torno de apenas 6%.

Com base nas atuais tendências e no desenvolvimento tecnológico, estima-se que os custos de recuperação de energia de biomassa se reduzam em até dois terços em 20 anos (GOLDEMBERG, 2009).

2.3 Microalgas

O aumento no interesse para o estudo de microrganismos como microalgas, bactérias e fungos deve-se à essencial importância destes nas diversas cadeias tróficas (GROBBELAAR, 2004). Complementado a isso, Richmond (2004) também aborda sobre a possibilidade de aplicação de microalgas em distintas áreas como na nutrição, saúde humana e animal, tratamento de águas residuais, produção de energia e obtenção de compostos de interesse da indústria alimentar, química e farmacêutica.

As microalgas podem sintetizar toxinas, além de produzir uma gama de moléculas bioativas com propriedades antibióticas, anticancerígenas, anti-inflamatórias, antivirais, redutoras do colesterol, enzimáticas e com outras atividades farmacológicas (DERNER *et al.*, 2006).

O uso desses microrganismos possui muitas vantagens, pois devido ao fato de serem fotossintetizantes, capturam o CO₂ que ainda pode ser utilizado no tratamento de águas residuais e como bioindicadores de poluição (DERNER *et al.*, 2006). Sant'Anna *et al.* (2006), reafirmam essa teoria ao dizer que a utilização desses organismos fitoplanctônicos pode ser considerada como um bioindicador da qualidade da água e das condições ambientais em ecossistemas aquáticos. Além disso, podem ser utilizadas para a produção de biocombustíveis de uma forma sustentável e econômica (DEMIRBAS, 2009).

De acordo com Chisti (2007), esses microrganismos fotossintetizantes são utilizados em aquicultura, para a produção de suplemento alimentar e para a extração de compostos de alto valor comercial, apresentando potencial para uso em biorremediação e biofertilização, assim como, para a produção de vários tipos diferentes de biocombustíveis.

Demirbas (2009) relata que devido à alta quantidade de lipídeos presentes nas células desses fitoplânctons, muitos estudos têm sido realizados para verificar a viabilidade da produção de biocombustíveis, como biogás, bio-hidrogênio e biodiesel. Ashokkumar *et al.*

(2014), confirmam essa característica ressaltando que as microalgas podem produzir de 3 a 10 vezes mais energia por hectare, e são capazes de obter de 15 a 300 vezes mais óleo para produção de biodiesel, levando em consideração a sua produtividade por área.

2.3.1 Conhecimentos Gerais

De acordo com Bicudo e Menezes (2010), *Algae* é um termo genérico, desprovido de significado taxonômico, que inclui organismos que possuem clorofila *a* e um talo não diferenciado em raiz, caule ou folhas, com hábito predominantemente aquático. Esse nome era usado entre os romanos para designar certas plantas que eram destituídas de suas partes (RAVEN *et al.*, 2007).

As algas eram classificadas como um sub-reino das plantas. Atualmente, segundo Bicudo e Menezes (2010), estão classificadas dentro do reino *protocista*, e no domínio *Eukarya*, o qual inclui animais e plantas mais desenvolvidos.

A Ficologia, ciência que estuda as algas (*phykos*, do grego – alga e *logia* – estudo), é o ramo da biologia, pertencente à botânica, que abrange a maior diversidade de grandes grupos de organismos, incluindo organismos procariontes e eucariontes. (RAVEN *et al.*, 2007).

As algas estão entre as formas mais antigas de vida do planeta, surgindo como precursoras das plantas. Esses organismos podem apresentar estrutura procariótica ou eucariótica, sendo classificadas em classes, as quais são definidas principalmente pela sua pigmentação, ciclo de vida e estrutura celular básica. Dentre as classes mais importantes destacam-se as algas verdes (*Chlorophyta*), algas vermelhas (*Rhodophyta*) e as diatomáceas (*Bacillariophyta*) (BRENNAN e OWENDE, 2010). Na Figura 4 (p. 24) estão indicados os principais grupos de algas e suas correspondentes características.

ALGAS					
Filo	Organização	Tipo de clorofila	Pigmentos acessórios	Substância de reserva	Componentes da parede celular
Chlorophyta	Unicelular ou multicelular	a,b	Carotenos e xantofilas	Amido	Celulose
Phaeophyta	Multicelular	a,c	Carotenos, fucoxantina e xantofilas	Óleos e laminarina	Celulose e algina
Rhodophyta	Multicelular (maioria)	a,d	Carotenos, xantofilas, ficoeritrina e ficocianina	Amido das florídeas	Celulose, ágar e carragenina
Bacillariophyta	Unicelular	a,c	Carotenos, fucoxantina e xantofilas	Óleos	Dióxido de silício
Chrysophyta	Unicelular (maioria)	a,c	Carotenos, fucoxantina e xantofilas	Óleos e crisolaminarina	Celulose
Euglenophyta	Unicelular	a,b	Carotenos e xantofilas	Paramilo	Não possui parede celular
Dinophyta	Unicelular	a,c	Carotenos, peridina e xantofilas	Amido e óleos	Celulose

Figura 4 - Principais grupos de algas
Fonte: BICUDO (2010).

Bicudo e Menezes (2010) conceituam as algas como organismos fotossintéticos, que variam de uni a pluricelulares e cujos órgãos de reprodução (gametângios ou esporângios uni ou pluricelulares) não são envolvidos por camada de células estéreis.

Apresentam morfologia simples, com nível de diferenciação baixo, quando comparadas a outros grupos de organismos fotossintetizantes, variando suas formas, que podem ser unicelulares isoladas, agregados de células, colônias, filamentos simples ou ramificados, pseudoparênquimas, cenócitos (estruturas multinucleadas) até parênquimas (BICUDO e MENEZES, 2010). Algumas formas unicelulares e coloniais podem ser móveis pela presença de flagelos, e nesse caso, frequentemente são confundidas com protozoários (LEE, 2008).

Segundo Bicudo e Menezes (2010), as algas desempenham um papel ecológico importante como produtores primários dos ecossistemas onde ocorrem, sendo provavelmente responsáveis por mais de 50% do total da produção primária de todo o planeta. O fato de serem clorofiladas, não implica que sejam verdes, pois além da clorofila, possuem outros pigmentos denominados acessórios, que podem mascarar a presença da clorofila, proporcionando às algas coloração avermelhada, azulada, parda ou até enegrecida.

A reprodução desses microrganismos pode acontecer através de três processos: vegetativo, assexuado e sexuado. (South e Whittick 1987; Lee 2008). Além disso, possuem exigências nutricionais simples para o crescimento e podem produzir lipídeos, proteínas e carboidratos, em curto período de tempo (BRENNAN e OWENDE, 2010).

2.3.2 Biodiversidade das Algas

As algas constituem um grupo de organismos com grande diversidade de funções e formas. Uma de suas características mais marcantes é a ampla variedade que possui, com mais de 100 mil espécies, e muitas ainda não foram catalogadas (BICUDO e MENEZES, 2010). As estimativas calculam em 40.000 o número de espécies de algas catalogadas que ocorrem no mundo (WILSON, 1992). No Brasil, não existe esse tipo de informação, porém Bicudo e Menezes (2010) estimaram em 5.614 o número de espécies para o território nacional.

As microalgas são um grupo de seres vivos muito diversificados e podem possuir dois tipos de estrutura celular: procariótica e eucariótica. As procarióticas têm representantes nas divisões *Cyanophyta* (cianobactérias) e *Prochlorophyta*. Já as eucarióticas nas divisões *Chlorophyta*, *Rhodophyta*, *Glaucocystophyta*, *Euglenophyta*, *Chlorarachniophyta*, *Heterokontophyta* (*Raphidophyta*, *Chrysophyta*, *Bacillariophyta*, *Xanthophyta*, *Eustigmatophyta* e *Phaeophyta*), *Haptophyta* (= *Prymnesiophyta*), *Cryptophyta* e *Dinophyta* (DERNER *et al.*, 2006).

- *Cyanophyta* (cianobactérias): representadas pelas algas azuis, podem habitar vários locais, desde que haja umidade, e atuam como “espécies pioneiras” por sua pequena exigência nutricional. Realizam fotossíntese e aproveitam o nitrogênio atmosférico (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004).
- *Prochlorophyta*: são encontradas em ambiente aquático, fazendo parte do plâncton, ou associadas com ascídias coloniais (ROLLEMBERG *et al.*, 1998).
- *Chlorophyta*: são formados pelas algas verdes, extremamente abundantes nos ambientes aquáticos, e são um dos mais importantes componentes do fitoplâncton. Essas algas são responsáveis pela maior parte da produção de oxigênio molecular disponível no planeta (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004).
- *Rhodophyta*: vivem fixadas em um substrato. A principal característica é a presença do pigmento ficoeritrina em suas células, responsável pela coloração avermelhada desses organismos (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004).
- *Glaucocystophyta*: distinguem-se principalmente devido à presença de cianelas, que são cloroplastos que retêm características típicas das cianobactérias (VILLAC, CABRAL-NORONHA e PINTO, 2008).

- *Euglenophyta*: são os organismos denominados euglenas, presentes quase que exclusivamente em águas doces; possuem uma única célula com uma película externa de constituição proteica (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004).
- *Heterokontophyta*: constituem uma das principais linhagens do domínio *Eukarya*, com cerca de 10.500 espécies. Muitas delas são algas desde as *Laminariales* gigantes às diatomáceas unicelulares, que são componentes primários dos plânctons. São divididas em: *Raphidophyta*, *Chrysophyta*, *Bacillariophyta*, *Xanthophyta*, *Eustigmatophyta* e *Phaeophyta* (DAVID, 2002).
- *Haptophyta*: é um grupo de algas unicelulares cujos cloroplastos pigmentam-se de forma similar aos *Heterokontophyta* (DERNER *et al.*, 2006).
- *Dinophyta*: são compostas pelos organismos dinoflagelados, fitoplanctônicos e predominantemente marinhos. A presença de carotenos e peridina confere a tonalidade amarelada. A superpopulação dos dinoflagelados consome grande parte dos nutrientes disponíveis e libera toxinas na água, capazes de envenenar ou matar outros animais (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004).

2.3.3 Potencial Biotecnológico e Energético

A utilização de microalgas como combustível não é recente, porém o seu uso elevou-se devido ao aumento do preço do petróleo e a preocupação mundial com o meio ambiente (CHISTI, 2007).

As microalgas podem ser usadas na produção de hidrogênio, metano, biodiesel, entre outros (CHISTI, 2007). Segundo Field's *et al.* (2008), os óleos encontrados possuem características físico-químicas e químicas similares aos de óleos vegetais e por isso podem ser considerados como potencial matéria-prima para a produção de biodiesel.

O potencial das microalgas é reconhecido: possuem alto rendimento em óleo, rápido crescimento, utilizam terras e recursos de baixo custo de oportunidade, não competem por espaço para a produção de alimentos, além de capturar e utilizar o CO₂ (FRANCO *et al.*, 2013). Além disso, elas têm um curto ciclo de colheita, em média de 3 a 15 dias, permitindo colheitas múltiplas ou contínuas, com aumento da produtividade de biomassa (ASHOKKUMAR *et al.*, 2014).

Um dos mais importantes apelos para a produção de biodiesel a partir de microalgas é que tal atividade não deslocará áreas de cultivo voltadas para a alimentação humana – uma das principais críticas à produção de biodiesel a partir de oleaginosas (MENEZES *et al*, 2013).

Em estudo realizado por Chisti (2007), constatou-se que a microalga, apresenta-se como excelente alternativa para a produção de biodiesel, devido ao elevado teor de óleo, como mostra abaixo a Tabela 1.

Tabela 1 - Comparação de diferentes matérias-primas para a produção de biodiesel

Fonte de Biodiesel	Produtividade do óleo (L/ ha)
Mamona	806
Pinhão Manso	1892
Milho	172
Soja	446
Canola	1.190
Coco	2.689
Óleo de Palma	5.950
Microalga	58.700

Fonte: CHISTI (2007).

Muitas microalgas são potencialmente úteis para produção em grande escala, entretanto, a escolha das espécies envolve questões diversas, tais como a velocidade do crescimento e a composição química do óleo. Essas variáveis são influenciadas por alguns fatores como: o meio de cultura utilizado, idade do cultivo, intensidade luminosa, temperatura, fotoperíodo, entre outros (BROWN *et al.*, 1997).

A utilização de biomassa microalgal para a produção de energia engloba os mesmos processos. Entre os fatores que influenciam na escolha do processo de conversão incluem: o tipo e a quantidade de matérias-primas de biomassa, a forma desejada da energia e o ganho econômico desejado sobre o produto (BRENNAN & OWENDE, 2010).

2.3.4 Influência dos Fatores Ambientais Sobre o Cultivo de Microalgas

No ambiente natural, assim como nos cultivos, o crescimento é resultado da influência de fatores biológicos, físicos e químicos, de modo a viabilizar a sobrevivência e crescimento das microalgas. Os fatores biológicos estão relacionados às próprias taxas

metabólicas da espécie cultivada, bem como com a possível influência de outros organismos sobre o desenvolvimento dela (DERNER *et al.*, 2006).

Os fatores físico-químicos que podem tornar limitantes o crescimento algal são:

- Luz: esta permite a realização da fotossíntese. A intensidade luminosa e a qualidade do espectro luminoso ocasionam uma maior população microalgal (WARNIER, 2004).
- Temperatura: é um importante fator de regulação das taxas de reações químicas dos processos biológicos, como a fotossíntese e a respiração (RICKLEFS, 2003).
- Oxigênio e gás carbônico: estão relacionados aos processos de fotossíntese e respiração. O oxigênio participa em várias reações químicas e biológicas importantes, sendo continuamente produzido na fotossíntese. As concentrações de CO₂ na água normalmente mostram relação inversa às de O₂. Embora sua concentração atmosférica seja menor, o CO₂ é trinta vezes mais solúvel, e por isso é mais abundante (FERNANDES *et al.*, 2005).
- Potencial hidrogeniônico (pH): afeta diretamente a disponibilidade de vários elementos químicos, que podem cristalizar e precipitar dependendo do pH do cultivo. Assim, o pH deve ser quase neutro para que os componentes do meio possam ser efetivamente absorvidos pelas microalgas (SCHMIDT, 2007).
- Macronutrientes: são necessários em grande quantidade e apresentam funções bem distintas, como constituir a estrutura de biomoléculas, participar de processos de trocas de energia, regular atividades de metabolismo das microalgas, dentre outras funções. Classificam-se como macronutrientes: Hidrogênio, Nitrogênio, Fósforo, Enxofre, Potássio, Magnésio, Sódio, Sílica e Ferro (LOURENÇO, 2006).
- Micronutrientes: são elementos cuja principal função é participar da estrutura nas biomoléculas e funções enzimáticas. Os principais são: Manganês, Molibdênio, Cobalto, Boro, Vanádio, Zinco, Cobre e Selênio (LOURENÇO, 2006).

Além da quantidade de nutrientes da água, outros fatores influenciam a composição e distribuição espacial e temporal da comunidade fitoplanctônica, tais como: correntes, estratificação térmica, circulação, hora do dia, profundidade de penetração da luz e presença de substâncias tóxicas (RAVEN *et al.*, 2007).

Muitos meios de cultura têm sido desenvolvidos baseados nos requerimentos de micro e macronutrientes das algas, além disso, é usual adicionar vitaminas que apresentam funções importantes, as quais são a tiamina (B₁), biotina (H) e cianocobalamina (B₁₂) (LOURENÇO, 2006).

2.3.5 Modos de Cultivos de Microalgas

O cultivo de microalgas é indicado como uma alternativa importante de biomitigação de CO₂, pois cada quilograma de biomassa algal representa aproximadamente a fixação de 1,83 quilograma de CO₂ durante o seu ciclo de vida (WANG *et al.*, 2008). Os primeiros estudos envolvendo cultivo de microalgas no Brasil foram realizados na década de 70, com a criação de um laboratório com dezenas de cepas na Universidade de São Paulo (LOURENÇO, 2006).

As microalgas podem ser cultivadas nos modos autotróficos, heterotróficos e mixotróficos, sendo que a diferença entre eles está na fonte de energia e de carbono. No cultivo autotrófico, as células obtêm energia da luz e carbono do CO₂ do ar, produzindo através da fotossíntese suas biomoléculas: polissacarídeos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Embora apresente eficiência com a incidência de luz sobre a cultura, esse tipo de cultivo pode ocasionar uma redução do crescimento algal, por consequência da limitação da luz, pela alta densidade celular ou o seu excesso (VIEGAS, 2010).

No cultivo heterotrófico, as células utilizam compostos orgânicos (glicerol, glicose e acetato) como fonte de energia e de carbono. Apresenta como vantagem o maior controle do processo de cultivo e o baixo custo na colheita de biomassa (FRANCO *et al.*, 2013). Já no mixotrófico, as células utilizam a luz, compostos orgânicos e inorgânicos como fonte de energia e CO₂ (FRANCO *et al.*, 2013).

As microalgas podem ser cultivadas em fotobiorreatores, ou em lagoas e tanques abertos. Grande parte está sendo cultivada em lagoas e tanques abertos, sendo considerada a forma de cultivo mais natural, pela sua suscetibilidade a variações de parâmetro como temperatura, luminosidade e qualidade do ar. Por outro lado, tal cultivo apresenta como desvantagem a evaporação de água e o maior risco de contaminação por espécies indesejadas, reduzindo assim o rendimento do processo (FRANCO *et al.*, 2013).

O cultivo fechado é feito com fotobiorreatores, transparentes à luz visível, que permitem maior controle das condições de cultivo, obtendo com isso maior produtividade de biomassa. Esse sistema propicia uma produção em larga escala, com alto valor comercial, já que reduz os riscos de contaminação e possibilita uma melhor distribuição de luz. Contudo, seus custos de implantação e de operação são superiores aos dos tanques (FRANCO *et al.*, 2013).



Figura 5 - Sistemas de cultivos aberto e fechado
Fonte: SESTON (2013) e NPDEAS (2013).

O cultivo de microalgas apresenta vantagens em relação às oleaginosas, como a simplicidade de nutrientes necessários, a duplicação da biomassa em um curto período de tempo e a possibilidade de manipular suas condições, de modo a aumentar a produção de um metabólito específico (COSTA, 2000).

2.3.6 Curva de Crescimento

O desenvolvimento das microalgas em cultivo pode promover informações básicas sobre esses micro-organismos, como, por exemplo, o ciclo de vida. Em condições climáticas e nutrientes adequados, elas podem crescer profusamente. Comumente, dobram a sua biomassa dentro de 24 horas, ou menos, e durante a fase de crescimento exponencial, podem completar um ciclo de vida dentro de 2 a 4 horas, conforme mostra a Figura 6, na qual são mostradas as seguintes fases do ciclo de crescimento.

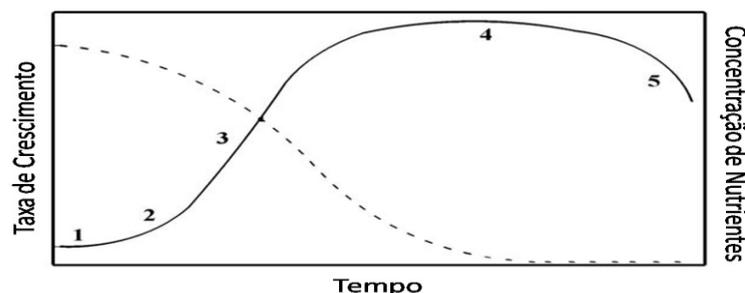


Figura 6 - Representação esquemática da curva de crescimento de microalgas
Fonte: Mata *et al.*, (2010).

Essa curva de crescimento na linha contínua representa o incremento da biomassa ou do número de organismos no decorrer do tempo. Já a linha tracejada indica a concentração de nutrientes no cultivo. A curva apresenta cinco fases distintas, e de acordo com a Figura 6 tem-se:

1 – Fase de indução ou fase lag: é uma fase relativamente curta. Ocorre logo após a repicagem, e caracteriza-se por não haver crescimento ou declínio devido à adaptação das células às novas condições de cultivo (ANDERSEN & KAWACHI, 2005).

2 – Fase exponencial ou fase log: nessa fase ocorre uma duplicação sucessiva em intervalos regulares de tempo. A duração da fase exponencial em culturas depende do tamanho do inóculo, do ritmo de crescimento, do meio utilizado e das condições físicas de crescimento como, luz e temperatura (MATA *et al.*, 2010).

3 – Fase de desaceleração: nessa fase a concentração celular é geralmente muito alta, e uma exaustão em termos de nutrientes, limitação de dióxido de carbono e luz tornam-se as principais causas do declínio do crescimento (BARSANTI e GUALTIERI, 2006).

4 – Fase estacionária: é caracterizada por ausência de crescimento e em pouco tempo as células começam a sofrer alterações bioquímicas (VEGA e VOLTOLINA, 2007).

5 – Fase de Morte: ocorre quando o metabolismo celular já não pode ser mantido. Nessa fase, a taxa de mortalidade supera a taxa de crescimento (BARSANTI e GUALTIERI, 2006).

As curvas de crescimento são elaboradas de acordo com a densidade celular diária da média das alíquotas realizadas em triplicata que são obtidas através da contagem dos organismos em microscópios, com o auxílio da câmara de sedimentação, que são instrumentos de precisão, confeccionados em vidro óptico especial, o qual foi utilizado no trabalho a câmara de Neubauer, como exemplifica a Figura 7.

Também foram verificados os parâmetros: a densidade celular máxima (DCM), a velocidade de crescimento (k), o tempo de cultivo (T), a velocidade específica de crescimento (μ) e a produtividade volumétrica.

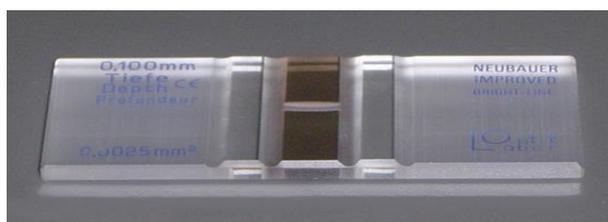


Figura 7 - Câmara de Neubauer
Fonte: Próprio autor (2015).

- Densidade celular máxima (DCM): Este parâmetro foi definido como o máximo valor obtido em número de células por mililitro, antes da cultura alcançar a fase estacionária da curva de crescimento, independentemente do tempo transcorrido desde o início do cultivo (GRESSLER, 2011).
- Velocidade de crescimento: A velocidade de crescimento representa o número de divisões celulares da população por unidade de tempo (dia) (DERNER, 2006).
- Tempo de cultivo (T): Esse parâmetro foi determinado pelo número de dias entre o início do cultivo até o dia em que foi alcançada a densidade celular máxima (GRESSLER, 2011).
- Velocidade específica de crescimento (μ): A velocidade específica representa o número de divisões celulares da população por unidade de tempo (dias) (GRESSLER, 2011).
- Produtividade volumétrica (Pv): A determinação da produtividade volumétrica representa o rendimento das culturas (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

A estatística da identificação das espécies foi realizada utilizando a curva de crescimento e obtida através da Distribuição de Poisson, o qual expressa a probabilidade de uma série de eventos ocorrer num certo período de tempo e se estes eventos ocorrem independentemente de quando ocorreu o último evento. O grau de confiança deste método é de 95 ± 20 % quando se conta 100 indivíduos da mesma espécie.

Os resultados foram expressos em organismos por mililitros de água (org/mL), células por milímetro quadrado (cél/mm²) e células por mililitro de água (cel/mL). Os resultados expressos em porcentagem são classificados nas seguintes categorias, de acordo com Ferreira (2007):

- F > 70% - Espécie muito frequente;
- 40% < F ≤ 70% - Espécie frequente;
- 10% < F ≤ 40% - Espécie pouco frequente;
- F ≤ 10% - Espécie com frequência rara.

2.3.7 *Chlorella sp*

De acordo com Graham e Wilcox (2000), a microalga *Chlorella sp* pertence ao filo *Chlorophyta*, classe *Trebouxiophyceae*. É unicelular, planctônica com forma esférica ou elipsoidal, tendo de 2 a 10 μm de comprimento e não possui flagelos. Têm cloroplastos verdes e são circundados por duas membranas. As paredes celulares das algas verdes são compostas de pectina e celulose, ou de polímeros de xilose ou manose, conectados com a proteína (BUCKERIDGE *et al.*, 2010).

A microalga *Chlorella* foi descoberta pelos japoneses (RICHMOND, 2004). Sua composição média é de aproximadamente 20% de gordura, 45% de proteína, 20% de carboidrato e 10% de minerais e vitaminas (PHUKAN *et al.*, 2011). Vonshak (1997) afirma que ela contém ainda mais de 2% de clorofila, o que lhe permite rápido crescimento, pois assim como as plantas superiores, seu metabolismo principal é a fotossíntese, que tem como fonte principal de energia a luz solar.

O cultivo em grande escala da espécie *Chlorella* está bastante desenvolvido, principalmente em Taiwan, Japão e Alemanha, sendo produzidas anualmente cerca de 2000 toneladas (peso seco) para alimentação e aquicultura (SPOLAORE *et al.*, 2006). Essa espécie tem recebido mais atenção nos últimos anos na indústria de biocombustíveis e de sequestro de CO_2 , devido ao fácil cultivo e às elevadas taxas de crescimento, que permitem atingir grandes concentrações celulares em cultivos exteriores (LI *et al.*, 2008).

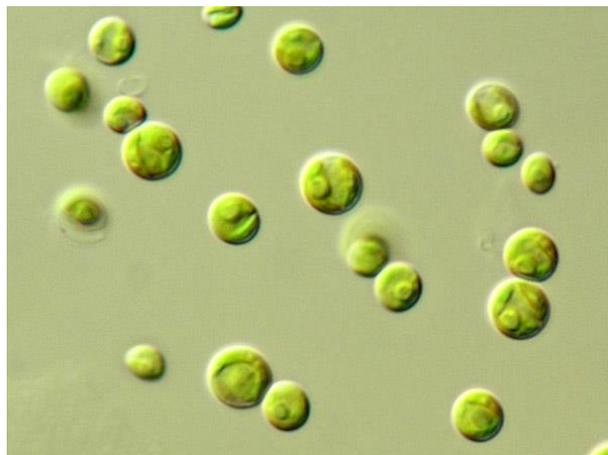


Figura 8 - Microalgas *Chlorella*
Fonte: KASTOVSKA *et al.*, 2005.

2.4 Biodiesel

O biodiesel é um biocombustível derivado de fonte renovável, para uso em motores à combustão interna com ignição por compressão. Ele contribui para a redução da temperatura global do planeta e dos custos com a saúde, devido à redução das emissões de gases poluentes, pois parte do gás carbônico emitido na queima do combustível é absorvida durante o crescimento da cultura da matéria-prima utilizada na sua produção (BERMANN, 2008).

Além de ser totalmente miscível em óleo diesel mineral, o biodiesel aumenta a lubrificidade do combustível, melhorando o desempenho do motor, sendo biodegradável e não tóxico (ENCARNAÇÃO, 2008). Ele pode ser classificado em primeira, segunda e terceira geração. As culturas comestíveis, como a soja, estão classificadas na primeira geração. Na segunda e terceira estão as que são obtidas a partir de fontes não comestíveis e de resíduos, como por exemplo, mamona e palha. Na Tabela 2 são apresentados com mais detalhes outros tipos de culturas que pertencem a cada geração (ATABANI *et al.*, 2012).

Tabela 2 - Diferentes fontes de óleo para produção de biodiesel

Óleos Comestíveis (1ª Geração)	Óleos Não Comestíveis (2ª Geração)	Gordura Animal e Demais Fontes (3ª Geração)
Soja	Algodão	Banha de Porco
Colza	Karanja	Sebo Bovino
Açafrão	Jojoba	Gordura de Aves
Arroz	Semente de Tabaco	Óleo de Peixe
Cevada	Semente de Serigueira	Gordura de Frango
Gergelim	<i>Jatropha curcas</i>	Bactérias
Girassol		Algas
Amendoim		Látex
Sorgo		Microalgas
Trigo		Fungos
Coco		
Canola		
Palma		

Fonte: ATABANI *et al.* (2012).

Inúmeras são as vantagens de se utilizar o biodiesel, entre elas, destacam-se os fatores ambientais, dos quais se pode enfatizar o fato de esse combustível não possuir enxofre em sua composição, o que evita a emissão de gases sulfídricos. Além disso, não contém agentes cancerígenos, e possui uma taxa de emissão de fuligem 50% menor que a do diesel, e o mais importante: é biodegradável (RAMOS *et al.*, 2003).

2.4.1 Biodiesel no Mundo

Segundo Rathmann *et al.* (2007), as preocupações com o esgotamento das reservas petrolíferas não são recentes e podem ser comprovadas com as experiências de uso alternativo de combustíveis ao longo de várias datas, como:

- 1900: na Europa, houve o ensaio de Rudolf Diesel, em Paris, o uso de um motor movido a óleos vegetais.
- 1937: foi concedida a primeira patente para combustíveis obtidos a partir de óleos vegetais, em Bruxelas, Bélgica, de nº. 422877.
- 1938: houve o primeiro registro de uso de combustíveis de óleo vegetal para fins comerciais, em um ônibus de passageiros da linha Bruxelas/Loivana.

E além dessas datas, Giacchetto (2008) relata que durante alguns conflitos bélicos, houve inúmeros registros de uso comercial de combustível de óleo vegetal na “frota de guerra” e entre muitas outras em todo o mundo.

Países como França, Áustria, Alemanha, Bélgica, Reino Unido, Itália, Holanda, Finlândia, Estados Unidos, Japão e Suécia vêm investindo significativamente na produção e viabilização comercial do biodiesel, através de unidades de produção com diferentes capacidades (DOURADO *et al.*, 2003).

A utilização de biodiesel como combustível vem apresentando um potencial promissor no mundo inteiro (FARIA *et al.*, 2007), sendo um mercado que cresce aceleradamente devido a sua enorme contribuição ao meio ambiente, com a redução qualitativa e quantitativa dos níveis de poluição ambiental, principalmente nos grandes centros urbanos (COSTA NETO *et al.*, 2000).

2.4.2 Biodiesel no Brasil

A utilização de biocombustíveis no Brasil é tão antiga quanto o uso do fogo, tendo destaque a madeira, um dos principais combustíveis sólidos consumidos no mundo. Algum tempo depois, os óleos e gorduras animais e vegetais também foram utilizados como combustíveis. No Rio de Janeiro, no final do século XVIII e início do século XIX, a

iluminação pública tinha como principal combustível o óleo de baleia ou azeite de peixe (SILVA, 2006).

Do ponto de vista da produção de energia, biomassa é toda massa orgânica que pode ser usada como combustível ou para a sua produção. Apesar dos combustíveis fósseis como petróleo, carvão ou gás mineral também serem derivados de matéria orgânica, precisam de milhares de anos para ser gerados, por isso não são considerados biomassa, pois não são recursos naturais renováveis a curto prazo (NOGUEIRA e RENDEIRO, 2008).

No Brasil, a primeira patente de biodiesel, apesar de ter sido registrada em 1980, pelo Dr. Expedito Parente, só foi regulamentada em 2003, quando a Portaria da Agência Nacional do Petróleo estabeleceu normas para a utilização de combustíveis sólidos, líquidos ou gasosos, não especificados no país. No mesmo ano, também foram autorizadas ações para a implantação da produção e uso do biodiesel (GIACCHETTO, 2008).

2.4.3 Legislação e Normas para Biodiesel no Brasil

Segundo a Lei Federal nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, inciso XXIV, define-se biodiesel como:

“biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores à combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustível de origem fóssil”.

A comercialização do biodiesel no Brasil se deu através do marco regulatório que autorizou a mistura do biodiesel ao diesel de petróleo, e estabeleceu os percentuais dessa mistura, a forma de utilização e o regime tributário. Essa regulamentação permite também usos específicos do biodiesel, com misturas superiores à estabelecida por ela (MME, 2014).

Mundialmente passou-se a adotar uma nomenclatura bastante apropriada para identificar a concentração do biodiesel na mistura. É o Biodiesel BXX, no qual XX é a porcentagem em volume. Por exemplo, o B2, B5, B20 e B100 são combustíveis com uma concentração de 2%, 5%, 20% e 100% de biodiesel, respectivamente, e esse último é o biodiesel puro (FANGRUI e MILFORD, 1999).

Essa mistura de biodiesel ao diesel fóssil teve início em dezembro do ano de 2004, porém somente em janeiro de 2008, entrou em vigor a mistura legalmente obrigatória de 2% em todo o território nacional, em que se utilizava 2% de biodiesel e 98% de diesel.

Após alguns anos, esse percentual foi ampliado pelo Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) sucessivamente até atingir uma mistura de 5% (B5) em 2013. Com o B5, o Programa demandou de 2,2 a 2,4 bilhões de litros em 2010. A previsão é de 2,8 bilhões de litros (por ano) até 2013 (PIRES, 2015).

O Brasil produziu, no ano de 2014, mais de 3,4 bilhões de litros de biodiesel, e a aprovação de lei que ampliou de 5% para 7% a adição de biocombustível no diesel fez a Associação dos Produtores de Biodiesel do Brasil (Aprobio) projetar um aumento de 25% na produção do ano de 2015 (CAMPO E LAVOURA, 2015).

3 FUNDAMENTAÇÃO OU QUADRO TEÓRICO: VISÃO DE MUNDO SUBJACENTE À FORMULAÇÃO DO PROBLEMA E SELEÇÃO DO MÉTODO DE PESQUISA.

Muitos fatores de caráter físico, econômico, político e ambiental justificam a necessidade de se investir em fontes de energia renováveis, tais como: a elevada demanda de energia no setor de transportes frente à proximidade do esgotamento dos combustíveis fósseis; a existência de disputas comerciais e geopolíticas acerca da exploração das fontes de combustíveis; a oscilação de seu valor de mercado; e a emissão de gases intensificadores do efeito estufa, originados através da queima deste tipo de combustível, agravando o processo de aquecimento global (MAROUBO, 2013).

Dessa forma, muitos pesquisadores têm estudado o desenvolvimento de tecnologias para a produção de biodiesel que não utilizem terras, e não haja competição com os alimentos. Um exemplo disso é a biomassa proveniente das microalgas. Vários estudos têm sido realizados para a utilização de microalgas na produção de biocombustíveis (CHISTI, 2007) e como forma de fixar CO₂ originado na atividade industrial e geração térmica de energia elétrica (MORAIS e COSTA, 2007).

Os óleos encontrados nas microalgas possuem características similares aos de vegetais, e por isso podem ser considerados como potencial matéria-prima para a produção de biodiesel (SHEEHAN *et al.*, 1998). O cultivo desses microrganismos em comparação aos vegetais, além de utilizar menores áreas, independem da qualidade do solo, podendo ser desenvolvido em solos estéreis, inutilizáveis para a agricultura e até mesmo no deserto, ou em solos férteis, sem causar impacto (HENRIKSON, 1994). E a produção de óleo, possui estimativas de 15.000 a 30.000 L /km² a mais, em comparação aos vegetais (LIRA *et al.*, 2012).

Na Tabela 3 a seguir, apresentam-se algumas microalgas promissoras como matéria-prima para a produção de biodiesel, em vista do seu percentual de lipídeos.

Tabela 3 - Percentual de lipídeos em microalgas em relação à massa seca

Microalga	% de Lipídeos
<i>Scenedesmus obliquus</i>	12 – 14
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	16 – 40
<i>Chlorella sp</i>	10 – 48
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	64 – 71
<i>Euglena gracilis</i>	14 – 20

<i>Prymnesium parvum</i>	22 – 38
<i>Spirulina platensis</i>	04 – 09
<i>Synechococcus sp.</i>	11

Fonte: Takagi, Karseno e Yoshida, (2006).

Dantas *et al.* (2010) indicam a microalga *Scenedesmus dimorphus* como uma das espécies em potencial para a produção em larga escala, visando à extração de óleo, embora a *Chlorella sp* também seja uma boa opção.

Os cultivos de microalgas utilizam processos industriais bastante simples. Porém, os nutrientes presentes nos meios de cultura são de grande importância para a viabilização desses cultivos. Estudar quais os componentes que devem ser acrescentados em maior ou menor quantidade nos meios de cultura é fundamental para proporcionar o melhor desenvolvimento das espécies (LOURENÇO, 2006).

Diante disso, este trabalho se justifica pela necessidade de se compreender os aspectos e as variáveis que influenciam significativamente o processo produtivo de biodiesel a partir de microalgas, o que inclui o levantamento da fauna de microalgas, a etapa da coleta, identificação, cultivo e colheita da biomassa, caracterizada como a mais onerosa em termos econômicos e energéticos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

O local escolhido para estudo foi o Município de Maracanaú, localizado na porção norte do Estado do Ceará, fazendo parte da região metropolitana de Fortaleza. Encontra-se a 3°52'42" de latitude sul e a 38°37'40" de longitude a oeste de Greenwich.

O município distancia-se 22 quilômetros do centro de Fortaleza, e possui aproximadamente 105,7 km² de extensão territorial (IPECE, 2012), cujos limites correspondem ao Norte com Fortaleza e Caucaia, ao Sul e Leste com Pacatuba e a Oeste com Maranguape.

Com base em dados preliminares divulgados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, Maracanaú possui população de 209.748, dos quais 99,57% habitam a área urbana (IBGE, 2012). É o município que mais arrecada Imposto sobre Circulação de Mercadorias e Prestação de Serviços do Estado (ICMS), com Produto Interno Bruto (PIB) centralizado fundamentalmente no setor industrial (IPECE, 2012).

Maracanaú caracteriza-se pela sazonalidade de sua precipitação e por elevadas temperaturas o ano todo. Sua localização territorial e latitudinal próxima ao Equador favorece intensa insolação, proporcionando elevadas temperaturas com baixas amplitudes térmicas.

A classificação climática segundo Köppen determina para a área um clima do tipo Aw': tropical chuvoso, quente e úmido. A pluviosidade média anual é de 1.426 mm e a temperatura média sofre pouca variabilidade sazonal, estando entre 26°C e 27°C, havendo variações mais significativas nos limites com as serras de Aratanha/Pacatuba e Maranguape.

As coletas das amostras de microalgas ocorreram na lagoa de Maracanaú durante os meses de outubro/2014 (representando o período seco), março e julho/2015 (março, representando o período chuvoso, e julho, o mês de transição entre o período chuvoso e seco), e cada coleta realizou-se através de quatro pontos da lagoa detalhados na Figura 9 (p. 41).



Figura 9 - Lagoa de Maracanaú – CE, Brasil
Fonte: Google maps (2016).

As coordenadas geográficas de cada ponto que foi coletado seguem na Tabela 4. Nessa lagoa observa-se diversas atividades como: a pesca e a lavagem de animais típicos da população local como caprinos e equinos, além de atividades de lazer. Além de receber despejo industrial, e esgoto da cidade.

Tabela 4 - Localização Geográfica dos pontos coletados

Ponto	Coordenadas Sul	Coordenadas Oeste
Ponto 1	3° 52' 49,5"	38° 37' 38,6"
Ponto 2	3° 52' 46,5"	38° 37' 35,5"
Ponto 3	3° 52' 40,9"	38° 37' 46,0"
Ponto 4	3° 52' 36,2"	38° 37' 40,0"

4.2 Caracterização do Experimento

4.2.1 Coleta das Amostras

Para a coleta da análise qualitativa foi utilizada uma rede de plâncton de 20µm de malha e diâmetro de 30 cm, na qual filtrou-se 60 litros de água. Também foram coletados 10 litros de água em cada ponto da lagoa para que fossem filtrados a vácuo, e usados posteriormente como meio de cultura natural. Essa análise qualitativa tem por objetivo a identificação das espécies e sua utilização para o isolamento dos microrganismos.



Figura 10 - Coleta dos microrganismos

Para a análise quantitativa, a coleta foi realizada na superfície do ecossistema com profundidade de 30 a 50 cm, conforme APHA (2005). O volume coletado para esse procedimento foi de 1 litro. No laboratório, os respectivos volumes, através de sedimentação em proveta, foram reduzidos até 20 vezes, durante um período de 24 horas.

A metodologia utilizada foi CETESB (2005), onde foi realizada a sedimentação das amostras em proveta e desprezando o sobrenadante, deixando um volume conhecido para ser utilizado em câmara de Sedgwick-Rafter (SANT'ANNA, et al., 2006). As amostras foram fixadas com lugol na proporção de 5mL.L^{-1} e transferidas para uma proveta de 1000ml onde ficaram em repouso por 24 horas. A solução de lugol é utilizado como corante fixador para permitir uma melhor visualização das estruturas internas dos microrganismos.

Após o período de repouso é retirado 900ml ou 950ml por sifonação com auxílio de uma bomba de vácuo e do concentrado é retirado uma alíquota para a análise.

Todo o material coletado foi acondicionado em frascos âmbar, e em baldes de PVC, conservado com gelo na temperatura de 4°C a 10°C . Em seguida, foi transportado para o Laboratório de Microbiologia e Química Ambiental (LAQAMB), no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, IFCE – campus Maracanaú, para executar os devidos procedimentos de análise e preservação.

A metodologia de coleta, preservação e acondicionamento seguiu APHA (2005) e Bicudo (2004). Bicudo (2004) afirma que os frascos utilizados precisam ter capacidade suficiente para conter a amostra, permitindo uma boa homogeneização. Em seguida, obtidas as amostras a partir dos coletores específicos, torna-se crucial armazená-las em frascos adequados, devido à dificuldade em se analisar uma amostra imediatamente após a sua coleta.

Logo, os autores relatam que, tornam-se necessárias técnicas de preservação, tais como adição de reagentes químicos e refrigeração, que mantenham a amostra praticamente inalterada até o momento de seu exame em laboratório. Posteriormente, a amostra deve ser transportada até o laboratório, garantindo sua integridade e preservação, e no tempo necessário para que sua análise ocorra dentro do prazo de validade da preservação.

4.2.2 Identificação das Espécies

A identificação das espécies foi realizada através das amostras que foram coletadas para a análise qualitativa e baseada em chaves dicotômicas especializadas publicadas por Bicudo e Menezes (2006). Foi feita com o auxílio de um microscópio óptico trinocular, marca Nikon, com varredura de, no mínimo, três lâminas, sendo as amostras observadas em diferentes ampliações das lentes objetivas (4x, 10x e 40x), para visualização de estruturas pertinentes, como flagelos, cílios, mucilagem e filamentos resultantes da mucilagem.

A contagem foi realizada em câmaras de Sedgewick Rafter em microscópio invertido por campos e faixas, seguindo diretrizes também da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB, 2005).

A amostra foi homogeneizada e, em seguida, colocada na câmara. Após 15 minutos, realizou-se a contagem por campos dentro de uma determinada faixa. Para isso, anotou-se a quantidade de campos contados até o correspondente a 100 indivíduos da mesma espécie. Caso a contagem de indivíduos predominantes não supere a 100, ou seja, não atenda a Distribuição de Poisson, é realizada uma nova sifonação, concentrando ainda mais a amostra.

4.2.3 Escolha e Isolamento da Espécie para Cultivo

A espécie escolhida, *Chlorella sp.*, esteve presente nas três coletas realizadas, variando de 40 a 60% das amostras. Tal espécie se aclimatou aos meios de cultivos oferecidos, e também apresentou o potencial biotecnológico visando o biodiesel.

As técnicas de isolamento utilizadas foram diluições sucessivas e inoculações em meio sólidos, com técnicas de estrias em placas de Petri, auxiliadas por uma alça de platina, conforme está demonstrado na Figura 11.

As técnicas de estrias são o método pelo qual se transfere microrganismos de um meio de cultura para um outro meio, com o objetivo de garantir que apenas o microrganismo desejado seja semeado, ou seja, realizando o isolamento do mesmo. Foi utilizado o esgotamento em estrias ou estrias múltiplas, onde foi transferida uma alçada da cultura para meio sólido em placa e estriar com a alça bacteriológica sobre o meio, como ilustra a Figura 12.

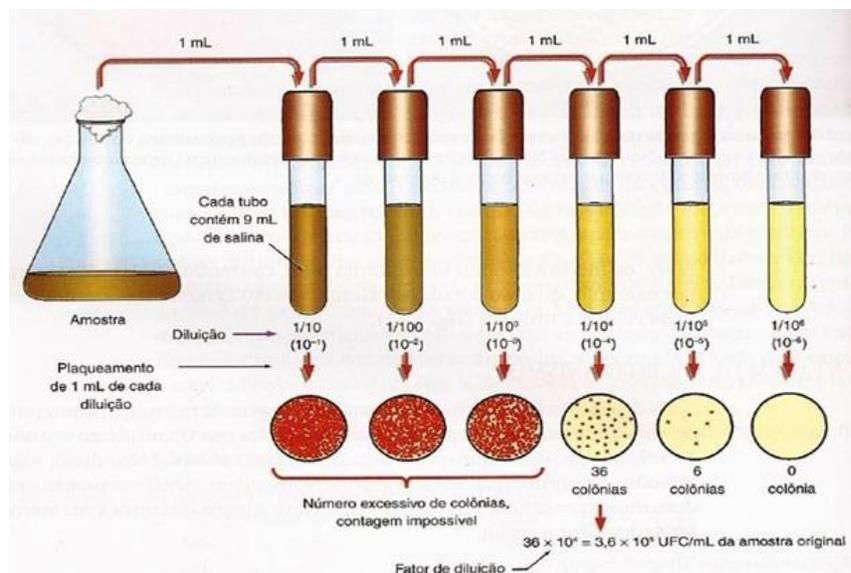


Figura 11 - Esquema do método de diluição seriada
Fonte: VIEGAS, (2010).

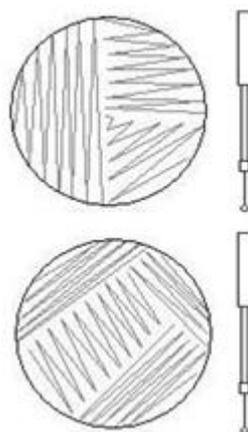


Figura 12 - Inoculação em placa de Petri, esgotamento em estrias.
Fonte: VIEGAS, (2010).

Os organismos isolados foram cultivados em microescala no laboratório de microbiologia e química ambiental (LAQAMB), do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, campus Maracanaú, inicialmente usando a água da própria lagoa como meio de cultivo, como mostra a Figura 13.

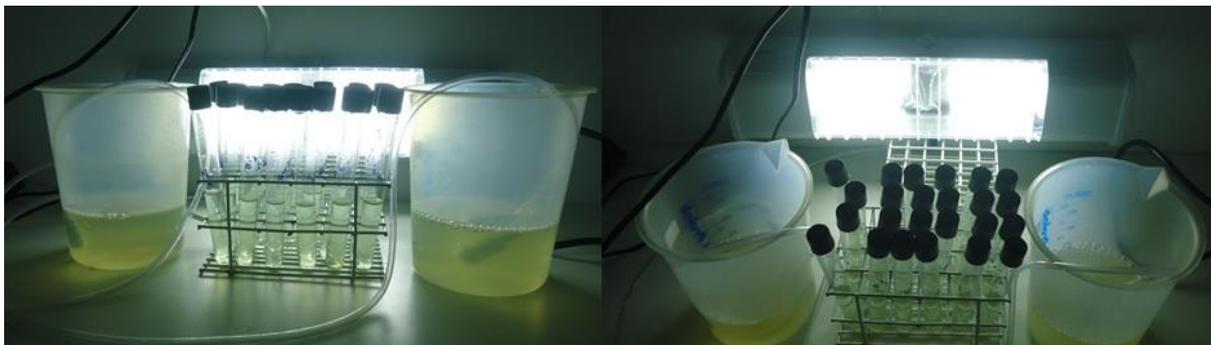


Figura 13 - Cultivo em microescala
Fonte: Própria autora, (2015).

Antes de iniciar a série de diluições, as amostras foram filtradas para a retirada de organismos maiores como, zooplâncton (predador natural) e para a seleção de organismos fitoplancônicos, com o objetivo de realizar um cultivo puro, dispondo de filtros com porosidade de 60 μm e 20 μm .

Após as filtragens, as amostras dos fitoplânctons foram submetidas a oito diluições sucessivas de 10^{-1} a 10^{-8} , sendo realizadas em triplicatas. Partiu-se de um volume total, para a primeira diluição, de 10 mL, que se deu pela inserção de 1 mL da amostra bruta em 9 mL de meio natural, previamente esterilizado a vácuo e armazenado em tubo de ensaio estéril, obtendo, portanto, a diluição 10^{-1} . A partir da primeira diluição foi retirado novamente 1 mL e transferido para 9 mL de meio, obtendo a diluição 10^{-2} e, assim sucessivamente.

4.2.4 Meios de Cultivo

Foram utilizados como meio de cultivo para as microalgas, os meios WC (GUILLARD e LORENZEN, 1972), L. C. Oligo (AFNOR, 1980) e ASM (GORHAM *et al.*, 1964, modificado por REYNOLDS e JAWORSKI, 1978), e a própria água da lagoa, meio natural, para verificar a melhor aclimação.

No anexo 1, encontram-se os reagentes que cada meio utiliza para o seu preparo. Todos os reagentes utilizados na execução dos experimentos e na preparação dos meios de cultura foram de grau padrão analítico.

4.2.5 Experimento com diferentes proporções de nutrientes (nitrato e fosfato)

No experimento, foram utilizadas diferentes concentrações de nitrato e fosfato, adicionadas no efluente utilizado como meio de cultura. Fixou-se a concentração de 10% de nitrato em todos os experimentos, e variaram-se apenas os valores para fosfato, podendo ser: 0%, 10%, 20%, 30%, e 40%, como apresentado na Tabela 5. Adotou-se também o cultivo sem adicionar nenhuma concentração de nutrientes, que foi o tratamento 6, ou também podendo ser chamado de branco. Ele foi utilizado para a comparação entre os crescimentos dos cultivos realizados.

Tabela 5 – Experimento com concentração diferente de Fosfato

Tratamento	Nitrato	Fosfato
1	10%	0 %
2	10%	10 %
3	10%	20 %
4	10%	30 %
5	10%	40 %
6	0 %	0 %

4.2.6 Cultivo em Microescala

A cepa da espécie *Chlorella sp.* doada foi armazenada em uma sala cuja temperatura variava entre 21 a 24° C. Para que a fotossíntese continuasse sendo realizada foi utilizado um fotoperíodo de 24 horas com uma lâmpada incandescente da marca Decolux LT-1063 127/220 VCA E27 60 W.

O cultivo em microescala foi realizado com um volume inicial de 100 mL, do qual, foram utilizados 90 mL do meio de cultura, e 10 mL contendo amostras da microalga selecionada. A troca por um volume maior ocorria de acordo com os valores coletados através

da curva de crescimento, quando esta se apresentava no fim da fase exponencial e início da fase estacionária.

As sequências dos volumes utilizados foram: 100 mL, 250 mL, 500 mL, 1 L, 2 L, e 5L. Os ensaios de cultivo ocorreram em triplicata.

4.2.7 Curva de Crescimento.

As curvas de crescimento foram elaboradas de acordo com a densidade celular diária da média das alíquotas realizadas em triplicata, com o auxílio da câmara de Neubauer. Também foram verificados os parâmetros para análise de crescimento dos microrganismos: densidade celular máxima (DCM), velocidade de crescimento (k), tempo de cultivo (T), velocidade específica de crescimento (μ) e produtividade volumétrica.

4.2.7.1 Velocidade de crescimento

Foi determinada considerando o dia de cultivo no qual a população alcançou a densidade celular máxima, através da equação 01, citada em Stein (1973).

$$k = \frac{3,322}{T_2 - T_1} \log \frac{N_2}{N_1} \quad \text{Equação 1}$$

Em que:

k = velocidade de crescimento;

3,322 = fator de conversão do logaritmo base 2 a base 10;

($T_2 - T_1$) = intervalo de tempo em dias;

N_1 = densidade celular inicial;

N_2 = densidade celular final;

Log = logaritmo em base 10.

4.2.7.2 Velocidade específica de crescimento (μ)

Para calcular a velocidade de crescimento de cada experimento, foi considerada a fase exponencial de cultivo até o alcance da densidade celular máxima, e foi obtida através da equação 2 (GRESSLER, 2011).

$$\mu = \frac{\ln \frac{N_2}{N_1}}{T_2 - T_1} \quad \text{Equação 2}$$

Em que temos:

μ = velocidade específica de crescimento;

$(T_2 - T_1)$ = intervalo de tempo em dias;

N_1 = densidade celular inicial;

N_2 = densidade celular final;

4.2.7.3 Produtividade volumétrica (P_v)

A determinação da produtividade volumétrica foi estimada a partir do cálculo pela equação 3 na fase exponencial do cultivo. (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

$$P_v = (X_2 - X_1) \cdot \mu \quad \text{Equação 3}$$

Em que temos:

P_v = produtividade volumétrica (células/ ml/ dia);

μ = velocidade específica de crescimento;

X_1 = concentração inicial da biomassa (células/ mL);

X_2 = concentração final da biomassa (células/ mL);

4.2.8 Obtenção da Biomassa Seca

Para a obtenção da biomassa seca, foram realizadas etapas de centrifugação, congelamento e liofilização. A centrifugação das amostras realizou-se no mesmo dia em que os cultivos forem encerrados, com capacidade para 16 tubos de plásticos de 15 mL em cada. Cada amostra de cultivo em microescala foi reduzida a volumes finais de menos de 50 ml. As condições de centrifugação empregadas foram de 4.800 rpm (força centrífuga de 3.044 g) por 5 minutos, com 30 segundos de aceleração e 30 segundos de frenagem, em temperatura ambiente.

Com o auxílio de uma espátula, o concentrado algáceo depositado no fundo dos tubos foi transferido para recipientes específicos para secagem por liofilização. As amostras foram submetidas a congelamento e posteriormente liofilizadas, com tempo médio de processo entre 24 e 48 horas, até verificar peso constante (SHENG-YI *et al.*, 2010).

4.2.9 Extração do Conteúdo Lipídico

Para a determinação dos lipídeos totais foi utilizada a metodologia de extração a frio, desenvolvida por Bligh e Dyer (1959) e adaptada por Soares (2010). Nela, a biomassa seca foi macerada em um cadinho de porcelana, em seguida retira-se cinco gramas, coloca-se em um erlenmeyer de 250 mL, junto com 25 mL de metanol, 12,5 mL de clorofórmio e 5 mL de água. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

Os erlenmeyer tampados foram dispostos em um banho ultrassônico com frequência de 40 kHz e potência de 80W, durante 20 minutos. Em seguida, adicionaram-se mais 12,5 mL de clorofórmio e 12,5 mL de solução de sulfato de sódio. Posteriormente, realizou-se outra sonicação com duração de 20 minutos. A parte sólida foi filtrada a vácuo e colocada para secar em estufa durante 24 horas a 105° C.

A mistura contendo a biomassa sólida e a fração líquida, constituída de lipídeo junto com solvente, passou por uma filtração para a remoção do primeiro componente (biomassa sólida). A fração líquida foi misturada com 75 mL de uma solução de KCl (0,88 % m/v) e foi colocada em repouso por 24 horas, em um funil de decantação. A fase oleosa foi transferida para um evaporador rotatório (Tecnal – TE-211), ajustado à temperatura de 45°C e

vácuo de 200 mmHg, para remover o solvente residual. Após a evaporação, os lipídeos remanescentes no balão foram pesados.

4.2.10 Produção do Biodiesel de Microalga

Após a extração, os óleos de microalgas foram convertidos em biodiesel utilizando o processo de transesterificação, que é uma reação química entre triacilglicerol e álcool de cadeia curta (metanol ou etanol), na presença de um catalisador, conforme a Figura 14.

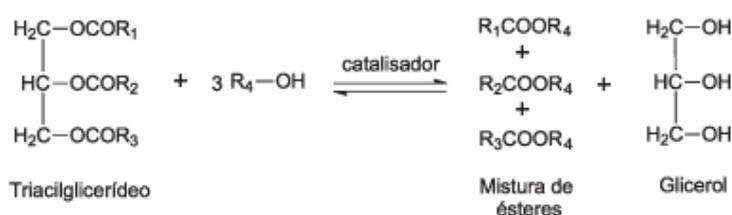


Figura 14 - Reação de Transesterificação
Fonte: GERIS *et al.*, (2007).

Para realizar a transesterificação foram pesados 50 ml do óleo de microalga, utilizando um erlenmeyer de 125 ml. Em outro erlenmeyer foram colocados 20% de álcool metílico (CH₃OH) e 0,5% de hidróxido de sódio (NaOH) da massa obtida do óleo, deixando misturar em agitação à temperatura ambiente por um período de aproximadamente 20 a 30 minutos.

Após dissolver a base no álcool, misturou-se a solução com o óleo que foi pesado. Essa nova mistura ficou sob agitação durante um período de 1 hora, à temperatura ambiente. Em seguida, a mistura foi transferida para um funil de decantação de 125 ml, no qual se realizou a separação dos ésteres-biodiesel (fase superior) e glicerol (fase inferior). Para a purificação do biodiesel foi utilizada água destilada para realizar sucessivas lavagens, que serviram para retirar impurezas básicas e glicerina.

A mistura foi separada por decantação, a fase aquosa (inferior) eliminada através das lavagens, e a fase orgânica (superior) armazenada. Esta representa o biodiesel lavado (GALLINA *et al.*, 2010). O biodiesel obtido foi levado para uma estufa a 105° C por um período de 1 hora, para que toda a água presente fosse evaporada. Após isso, o béquer foi

pesado novamente para saber a massa do biodiesel que foi obtida. O rendimento foi calculado através da equação seguinte:

$$Rm = \frac{100 \cdot m_b}{m_o}$$

Equação 4

Em que temos:

Rm = Rendimento mássico, em %;

m_b = massa de biodiesel formado, em gramas;

m_o = massa do óleo de microalga, em gramas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Coleta dos Microrganismos

A coleta aconteceu em quatro pontos da Lagoa de Maracanaú, no município de Maracanaú-CE, Brasil, durante os meses de outubro/2014, março e julho/2015. O efluente foi coletado com a rede de fitoplâncton e armazenado para a observação no Laboratório de Microbiologia e Química Ambiental – LAQAMB.

Foram escolhidos esses meses para verificar se havia alguma diferença de espécies coletadas no período seco e no chuvoso. As temperaturas da lagoa em cada ponto de coleta seguem na Tabela 6. Elas não mostraram alterações muito acentuadas. O ponto 4 apresentou maior temperatura em relação aos demais, devido à sua localização espacial, a leste, onde o sol nasce.

Tabela 6 - Temperatura da lagoa durante as coletas

Ponto	Outubro/2014	Março/2015	Junho/2015
Ponto 1	29° C	28° C	29° C
Ponto 2	29° C	29° C	28° C
Ponto 3	29° C	29° C	29° C
Ponto 4	31° C	30° C	31° C

5.2 Identificação das Microalgas

O efluente coletado, sem aditivos de reagentes, ou seja, *in natura*, foi observado em microscópio óptico e invertido e, em seguida, feita a identificação. As frequências de ocorrência das microalgas foram calculadas de acordo com a equação:

$$F = \frac{Na \cdot 100}{Nt} \quad \text{Equação 5}$$

Em que:

Na = número total de amostras em que as espécies de microalgas apareceram;

Nt = número total de amostras;

F = frequência das espécies.

Foram identificadas como espécies frequentes, ou muito frequentes, na lagoa de Maracanaú as seguintes microalgas:

- *Actinocyclus normanis*;
- *Aphanocapsa elachista*;
- *Chlorella sp*;
- *Closterium acutum*;
- *Crucigenia tetrapedia*;
- *Cyclotella ocellata*;
- *Desmodesmus sp*;
- *Dolichospermum planctonicum*;
- *Euglena oxyuris*;
- *Geitlerinema amphibium*;
- *Kirchneriella obesa*;
- *Microcystis aeruginosa*;
- *Monoraphidium komarkovae*;
- *Navicula notha*;
- *Nitzschia sp*;
- *Pediastrum duplex*;
- *Pediastrum simplex*;
- *Pinnularia viridis*;
- *Planktothrix agardhii*;
- *Pseudanabaena galeata*;
- *Raphidocelis contorta*;
- *Scenedesmus acuminatus*;
- *Scenedesmus acutus*;
- *Scenedesmus dimorphus*;
- *Scenedesmus obliquus*;
- *Scenedesmus quadricauda*;
- *Snowella lacustri*;
- *Sphaerocystis Schroeteri*;
- *Spirulina máxima*;
- *Synechocystis aquatilis*;
- *Tetraedron minimum*;



Figura 15 – Microalgas abundantes na lagoa de Maracanaú – CE, Brasil
 Fonte: Própria autora (2015).

Pelo método de contagem utilizando a câmara de sedimentação Sedgwick-Rafter, realizou-se a verificação das espécies que mais predominavam em cada ponto e em cada coleta. Foi utilizada a metodologia de APHA (2005), e está ilustrada algumas espécies mais frequentes da lagoa de Maracanaú na Figura 15. As espécies abundantes em cada coleta estão evidenciadas na Tabela 7 a seguir.

Tabela 7 - Espécies de microalgas predominantes em cada coleta

Outubro/2014	Março/2015	Junho/2015
<i>Monoraphidium komarkovae</i> ; - 5%	<i>Chlorella sp</i> ; - 28%	<i>Cyclotella ocellata</i> ; - 5%
<i>Chlorella sp</i> ; - 25%	<i>Navicula notha</i> ; - 9%	<i>Monoraphidium komarkovae</i> ; - 7%
<i>Navicula notha</i> ; - 3%	<i>Nitzschia sp</i> ; - 16%	<i>Chlorella sp</i> ; - 26%
<i>Pseudanabaena galeata</i> ; - 5%	<i>Desmodesmus sp</i> ; - 13%	<i>Navicula notha</i> ; - 10%
<i>Snowella lacustri</i> ; - 12%	<i>Raphidocelis contorta</i> ; - 8%	<i>Scenedesmus obliquus</i> ; - 14%
<i>Pediastrum simplex</i> ; - 5%	<i>Pseudanabaena galeata</i> ; - 12%	<i>Pseudanabaena galeata</i> ; - 12%
<i>Scenedesmus acutus</i> ; - 2%	Outras espécies - 14%	<i>Snowella lacustri</i> ; - 18%
<i>Scenedesmus obliquus</i> ; - 15%		Outras espécies - 8%
<i>Nitzschia sp</i> ; - 18%		
Outras espécies - 10%		

5.3 Escolha da Espécie Para Cultivo

De acordo com a análise realizada através da Distribuição de Poisson, verificou-se a existência de diversas espécies abundantes na lagoa estudada (Maracanaú-CE, Brasil). Após a identificação, foi realizado um estudo bibliográfico sobre o potencial biotecnológico de cada espécie, visando à produção de biodiesel. Com isso, as espécies escolhidas para o cultivo e obtenção de biodiesel foram aquelas que apresentaram maior teor de lipídeos, e de acordo com Takagi, Karseno e Yoshida (2006), foram as seguintes:

Tabela 8 - Espécies escolhidas de acordo com a porcentagem de lipídeos

Espécie	% Lipídeo
<i>Chlorella sp</i> ;	10 – 48
<i>Nitzschia sp</i> ;	16 – 47
<i>Pediastrum simplex</i> ;	8 – 12
<i>Scenedesmus obliquus</i> ;	12 – 14

Fonte: Takagi, Karseno e Yoshida, (2006).

5.4 Isolamento das Espécies Escolhidas

As espécies, depois de identificadas e selecionadas, foram cultivadas em microescala, logo após serem isoladas. Para realizar o isolamento de cada uma dessas espécies foram feitas diluições sucessivas em diferentes meios para verificar a qual deles esses organismos se aclimatariam melhor.

Houveram muitas dificuldades na etapa de isolamento, dentre elas: fungos, predatismo, como os zooplânctons, a falta de reagentes para o preparo do meio de cultivo e outros. Tentou-se realizar o isolamento em meios de cultivo diferentes, sendo eles líquidos (WC, Oligo, ASM) ou sólidos, em placas de petri, e o método de micropipetagem, utilizando pipetas com a ponta maior e mais afinadas, nos microscópios invertidos.

Dentre os meios, o meio de cultura Oligo foi o que obteve melhor resultado. Observou-se que uma quantidade maior de espécies crescia nesse meio. Porém, nos meios líquidos, as espécies *Scenedesmus obliquus* e *Pediastrum simplex* não se aclimataram tão bem, demoraram a se multiplicar, além do ciclo de vida ter sido alterado, prejudicando os objetivos da pesquisa.

Com relação à espécie *Chlorella sp.*, notou-se que esta cresceu bem em todos os meios líquidos, porém o seu isolamento não foi concretizado, apesar das inúmeras diluições sucessivas. Sempre se observava ao microscópio outras espécies da mesma família ou de outras presentes.

Já com relação à *Nitzschia sp.*, tal espécie não se aclimatou bem a nenhum dos meios líquidos. Contudo, quando colocada no próprio efluente da lagoa, meio natural, filtrado e autoclavado, observou-se uma predominância em relação às demais espécies. Foram realizadas as diluições sucessivas no meio natural, porém, também não foi obtido sucesso de isolamento, pois outras espécies permaneciam em todas as diluições.

No meio sólido, todas as tentativas de isolamento de todas as amostras de microalgas, exibiram fungos em menos de 24 horas, como demonstram a Figura 16.



Figura 16 - Isolamento em meios sólidos
Fonte: Próprio autor (2015).

Como as tentativas não foram satisfatórias, decidiu-se trabalhar com uma cepa de uma microalga já isolada, o qual foi doado pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia – IFCE, campus Fortaleza, pelo Professor Dr. Raimundo Bemvindo Gomes, responsável pelo Laboratório Integrado de Águas Mananciais e Residuárias (LIAMAR).

A espécie selecionada foi a *Chlorella sp*, devido ao teor de lipídeos que ela apresenta, pela boa aclimatação ao meio natural, e pelo ciclo de vida ser bastante rápido. Todo o cultivo em microescala foi realizado com o meio natural, a fim de reduzir custos.

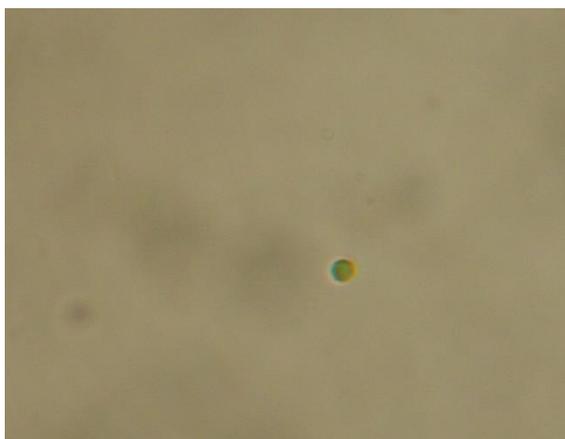


Figura 17 - *Chlorella sp* aumentada em lente objetiva de 40x
Fonte: Próprio autor (2015).

5.5 Experimento com diferentes proporções de nutrientes (fosfato)

A observação dos diferentes tratamentos foi realizada através de comparações entre os resultados para a curva de crescimento, usando os valores obtidos através das contagens na câmara de Neubauer. O ensaio foi desenvolvido em laboratório durante 11 dias, sendo adicionada uma concentração diferenciada de fosfato, com a finalidade de avaliar em qual dos tratamentos houve o maior crescimento da espécie escolhida, *Chlorella sp*. Os resultados de tais tratamentos encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9 – Resultados para os diferentes tratamentos

Trat.	Nitrato	Fosfato	k	T (dias)	DCM (Cél/ mL)	μ	Pv (Cél/ mL/ dia)
1	10%	0%	1,661	7	73087500	0,500	33542380
2	10%	10%	0,975	8	57225000	0,293	12914945
3	10%	20%	1,389	9	64875000	0,418	26169421
4	10%	30%	1,216	9	66637500	0,366	23091796
5	10%	40%	0,871	9	52125000	0,262	11477988
6	0%	0%	1,201	7	59100000	0,362	16340288

Fonte: Própria autora (2015).

Onde: k = velocidade de crescimento

T = tempo de cultivo

DCM = densidade celular máxima

μ = velocidade específica de crescimento

Pv = Produtividade Volumétrica

Na Figura 18, representou-se a comparação entre a curva de crescimento de cada tratamento analisado, na qual fica claramente visível que o experimento com melhores resultados é apresentado pelo tratamento 1.

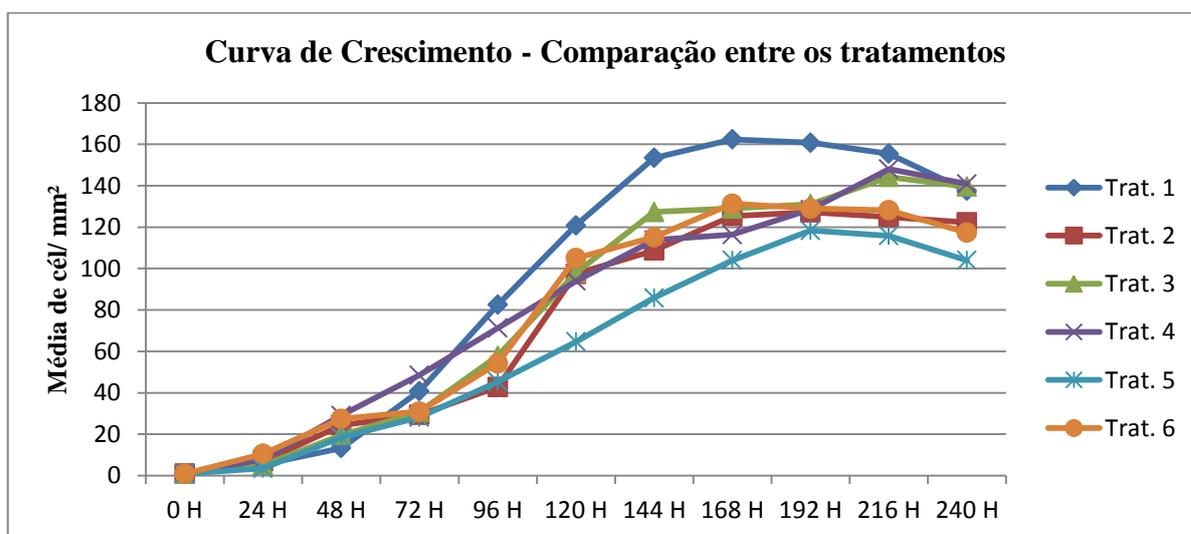


Figura 18 - Comparação entre os tratamentos

Fonte: Própria autora (2015).

De acordo com a curva de crescimento (Figura 18), observou-se que a partir do 1º dia de cultivo, as espécies aclimataram-se bem e com isso já apresentaram um pequeno crescimento. A fase exponencial da maioria dos tratamentos começou logo no 2º dia e variaram com relação ao término dessa fase, uns no 7º dia (tratamentos 1 e 6), outros no 8º dia (tratamentos 2), e 9º dia (tratamentos 3, 4 e 5), conforme descrito na Tabela 9.

O melhor tratamento foi o de número 1, sem fosfato e com 10% do meio de nitrato, apresentando a melhor densidade celular máxima (DCM) no 7º dia, de $7,31 \cdot 10^7$ cél/

mL, sugerindo então um ciclo de vida também mais rápido. O tratamento 6, que também foi chamado de branco, pela ausência de adicionais de nutrientes, obteve uma densidade celular máxima (DCM) $1,40 \cdot 10^7$ menor do que o valor observado no experimento de tratamento 1.

A velocidade de crescimento (k) dos tratamentos também ficou melhor avaliada pelo tratamento 1, com o resultado de 1,66 divisões/ dia. Em seguida ficou o tratamento 3, com 1,39, e o último resultado foi o tratamento 5, com velocidade de 0,87. Resultados semelhantes também foram encontrados em outros experimentos, como o de Conventi *et al* (2009), que afirma que meios de cultivos com valores altos de nutrientes influenciam na velocidade de crescimento das microalgas *Chlorella sp* e *Chlorella vulgaris*, pois uma vez que o meio possui mais nutriente, maior será a taxa de crescimento do cultivo.

Os resultados da velocidade específica de crescimento (μ) confirmam os anteriores, com o melhor tratamento sendo o número 1 (0,50), seguido do número 3 (0,42) e o pior tratamento o número 5 (0,26), quase 50% abaixo do primeiro resultado.

O tempo de cultivo até o fim da fase exponencial foi: 7 dias para os tratamentos 1 e 6; 8 dias para o tratamento 2; e 9 dias para os tratamentos de número 3, 4, e 5. Para a viabilidade de produção em larga escala, uma ótima opção de tratamento seria aquela que apresentasse maior quantidade de células em um ciclo de vida mais rápido, ocorrendo com os que tiveram tempo de cultivo igual a 7 dias.

A determinação da produtividade volumétrica que representa o rendimento das culturas foi estimada até o fim da fase exponencial do cultivo, e os melhores tratamentos correspondem aos resultados anteriores, sendo o resultado $3,35 \cdot 10^7$ cél/ mL/ dia para o experimento.

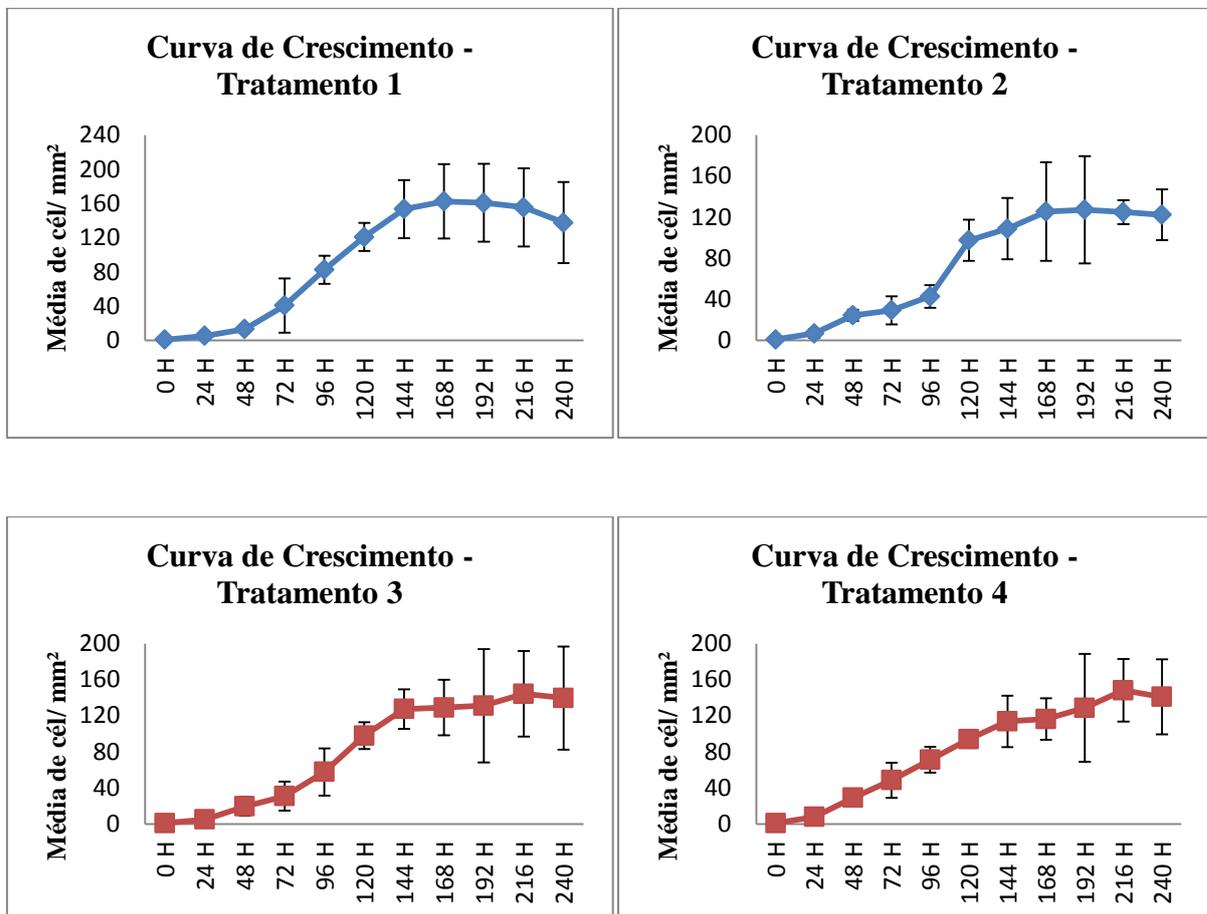
Os valores de pH nesse ensaio ficaram sem alterações exageradas. Os valores encontrados foram 7 a 7,33. Sobre a condutividade elétrica, os valores mais altos foram para os tratamentos 1 e 2, com 0,457, e o menor resultado o experimento 5, com 0,4. Araújo (2012), em seu trabalho, avaliando o desenvolvimento da microalga *Botryococcus braunii* nas mesmas condições de pH, obteve um k de 0,65 divisões/dia, valor este inferior ao encontrado neste trabalho.

O coeficiente de regressão linear (r^2) também foi analisado e com relação a ele, o tratamento que melhor correspondeu à curva do gráfico de um polinômio de grau 3 foi o tratamento 5, com $r^2 = 0,9960$, que em outros testes sempre foi considerado o pior. Os tratamentos 1 e 3, que antes eram os melhores, foram considerados como 3º e 4º resultados com relação a esse parâmetro.

Com relação às análises do teste Tukey, o tratamento 1 apresentou os melhores resultados desde o 3º dia até o fim do experimento. No 1º e 2º dias, o melhor resultado ficou com o experimento 6, que era o branco. Compreende-se esse resultado, pois fora o período em que os outros tratamentos estavam na fase de indução ou *lag*, período este em que os microrganismos passam para se adaptar ao meio e à quantidade de nutrientes.

Nos 3 últimos dias do experimento, todos os cultivos obtiveram resultados iguais para o teste de Tukey, apresentando resultados isolados diferentes no 5º dia do experimento, Nesse dia o melhor tratamento foi o de número 1, seguido pelo tratamento 4, e em último pelo tratamento 5.

Na Figura 19 representou-se a curva de crescimento de cada tratamento analisado.



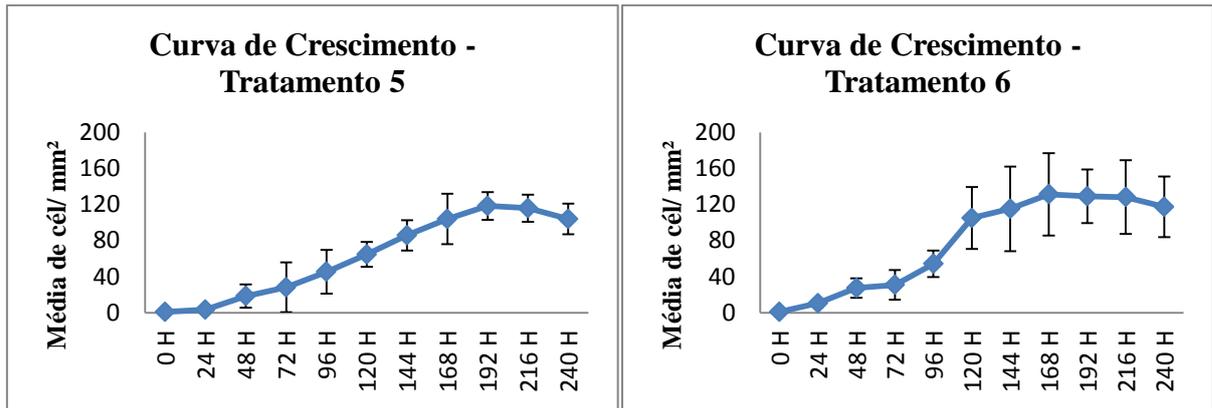


Figura 19 - Curvas de crescimento dos tratamentos
Fonte: Próprio Autor (2015).

Com isso, para todos os ensaios realizados posteriormente foi utilizado o parâmetro do tratamento 1, pois demonstrou melhores resultados.

5.6 Curva de Crescimento e Cultivo em Microescala

O crescimento de microalgas, de acordo com Veja e Voltolina (2007), é definido como um aumento da matéria viva. Um dos métodos empregados para a sua avaliação é a curva de crescimento, podendo ser expressa pelo aumento da biomassa ou do número de células em um determinado volume pelo tempo.

O cultivo em microescala começou com uma quantidade de 100 mL de meio natural, sendo adicionada a esta uma alíquota (2mL) da cepa da espécie escolhida e o nutriente nitrato (NO_3^-), na proporção sempre de 10% do valor total do meio natural.

As contagens para a determinação da curva de crescimento iniciaram-se já nesse volume de 100 ml e continuaram durante todo o cultivo em microescala. As observações foram realizadas todos os dias, durante dois meses, utilizando a câmara de contagem Newbauer.



Figura 20 - Cultivo da espécie selecionada
Fonte: Próprio autor (2015).

Observou-se, então, que a espécie *Chlorella sp* chegava à fase estacionária de crescimento por volta do 7º dia, o que levava a fazer um aumento do volume do meio de cultivo, evitando que as microalgas morressem.

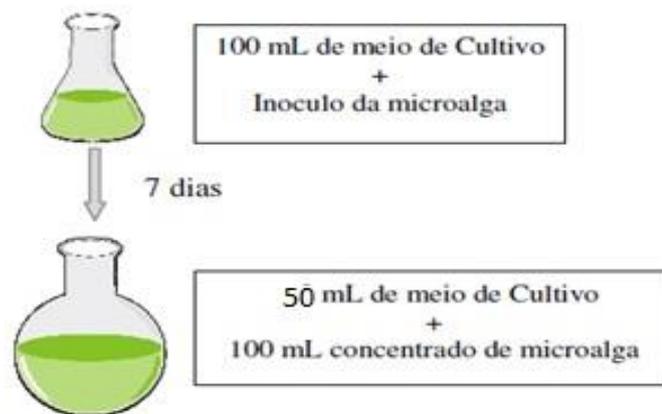


Figura 21 - Esquema ilustrativo do aumento de volume no cultivo
Fonte: Própria autora (2015).

Após o volume inicial de 100 mL, o volume do cultivo aumentou para 250 mL, em seguida para 500 mL, depois para 1 litro, 2 litros e por fim, 5 litros. Sempre acrescentando a esse meio, o valor correspondente aos 10% de nitrato. A curva de crescimento obtida está indicada abaixo na Figura 22.

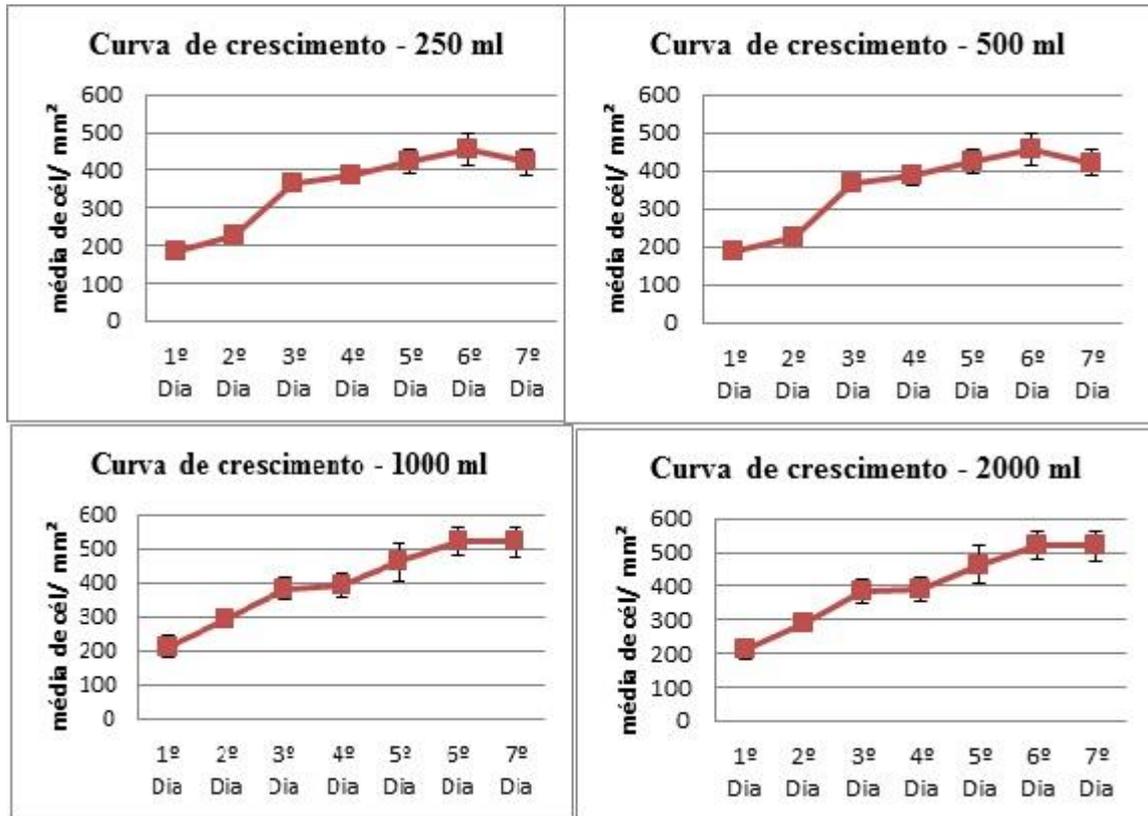


Figura 22 - Curva de crescimento das microalgas
Fonte: Própria autora (2015).

5.7 Obtenção da biomassa seca

Dos 15 litros de cultivo laboratorial, submetidos ao processo de centrifugação, foram coletados 0,516 litros de concentrado de microalgas, ou seja, 3,44% do volume total. Ao final do congelamento foram obtidos 10,54 gramas de biomassa seca de microalga *Chlorella sp.*, com um rendimento de 0,2185 gramas por litro.



Figura 23 - Biomassa seca da microalga *Chlorella sp*
Fonte: Própria autora (2015).

Johson e Wen (2009) em seu trabalho, realizaram uma comparação para avaliar o melhor rendimento, utilizando a biomassa úmida e seca da espécie *Chlorella sp*, e os resultados obtidos nos dois processos foram similares, no que diz respeito a sua obtenção. Porém, no que concerne à transesterificação direta da biomassa úmida, o teor de éster foi significativamente menor do que o obtido utilizando a seca.

Trabalhos semelhantes sobre a utilização de microalgas para a produção de biodiesel tiveram os seguintes resultados para o rendimento da biomassa: Cavalcanti *et al.*, (2014) utilizando a microalga *Chlorella vulgaris* obtiveram um rendimento de 0,3397 gramas/Litro de biomassa seca. Vieira (2011) obteve um rendimento de 0,4307 gramas/ Litro da espécie *Chlorella sp*, sendo cultivada em fotobiorreator. Pereira (2013), para um mix de microalgas tendo como predominância a espécie *Scenedesmus sp*, obteve um rendimento de 0,451 gramas/ Litro de biomassa seca.

Logo, o rendimento de biomassa seca apontado neste estudo encontra-se abaixo do já visto na literatura, podendo ser otimizado por meio de um estudo mais detalhado da curva de crescimento da microalga, e também modificando a maneira de obtenção da biomassa seca. Tal processo também pode ser realizado através de eletrofloculação, uma vez que na centrifugação exige um gasto de energia muito grande.

5.8 Extração do conteúdo lipídico

Após a secagem e determinação dos rendimentos em peso seco de biomassas, realizou-se a extração de lipídeos (óleos) para determinação dos teores destes componentes nas biomassas, com vistas à avaliação do potencial de produção de biodiesel.

A biomassa foi macerada, conforme a Figura 24, e retirados 5 gramas, que serão utilizados para a extração do conteúdo lipídico, utilizando a metodologia desenvolvida por Bligh e Dyer (1959) e adaptada por Soares (2010).



Figura 24 - Maceração da biomassa
Fonte: Própria autora (2015).

O processo de sonicação é necessário para otimizar a extração de lipídeos das células devido à espécie possuir celulose em sua parede. Dessa forma, após a sonicação, ocorreu o rompimento da parede e membrana celular, facilitando a saída dos componentes celulares. Com essa ruptura, todo o conteúdo interno da microalga ficou disponível para extração e, posteriormente para determinação da recuperação de biomassa e produção de lipídeos. O método de sonicação possui alta eficiência e baixo requerimento energético, tornando-o viável. Esta técnica tem sido bastante utilizada para extrair diversas substâncias de baixo peso molecular e para compostos bioativos de vegetais (MACÍAS-SÁNCHEZ *et al.*, 2009).

O teor médio dos lipídeos obtidos através do método adotado neste trabalho foi de 185,23 mg, o que equivale a 17,6% do peso seco, o qual está sendo representado por uma amostra do conteúdo na Figura 25.

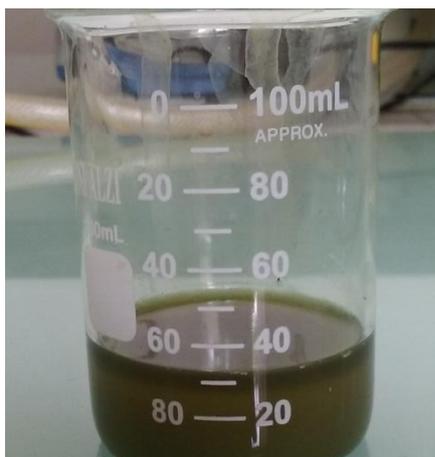


Figura 25 - Conteúdo lipídico da microalga *Chlorella sp*
 Fonte: Própria autora (2015).

Esse resultado apresenta-se abaixo do que foi encontrado em trabalhos desenvolvidos por outros autores como demonstrados através da Tabela 10.

Tabela 10 - Rendimento do teor lipídico de várias espécies

Espécie	Teor de lipídeos (%)	Referência
<i>Haematococcus pluvialis</i>	24,3	Wu <i>et al.</i> , 2013
<i>Chlorella vulgaris</i>	27,6	Wu <i>et al.</i> , 2013
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	17,4	Wu <i>et al.</i> , 2013
<i>Chlorella sorokiniana</i>	32,0	Wu <i>et al.</i> , 2013
<i>Chlorella sp.</i>	26,43 - 27,96	Ahmad <i>et al.</i> , 2014
<i>Scenedesmus obliquus</i>	12 - 14	Dragone <i>et al.</i> , 2011
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	16 - 40	Dragone <i>et al.</i> , 2011
<i>Chlorella protothecoides</i>	14.6-57.8	Maity <i>et al.</i> , 2014
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	16,7	Maity <i>et al.</i> , 2014

Fonte: Pacheco (2015).

Segundo Prochazkova *et al.* (2014), a acumulação de lipídeos intracelulares em geral ocorre como resultado de um estresse ambiental, dentre os quais destaca-se as limitações na disponibilidade de nutrientes, especialmente o nitrogênio, em que o metabolismo microalgal é direcionado da produção de carboidratos para a síntese e acumulação de lipídeos.

5.9 Produção do biodiesel da microalga *Chlorella sp*

Após a extração do conteúdo lipídico, passou a ser realizada, através da transesterificação, a produção de biodiesel utilizando a microalga da espécie *Chlorella sp.*

Com relação ao rendimento do produto final, foram obtidos 75,24 mg do produto por grama de biomassa, ou seja, 7,52%. Esse número representa um valor abaixo do que foi encontrado em literaturas com trabalhos semelhantes.

Cavalcanti *et al.*, (2013) realizaram um estudo semelhante na produção de biodiesel, utilizando uma cultura de microalgas mistas, apresentando rendimentos de 11,79%. Silva-Baumgärtner (2011) obteve como rendimento, para a microalga *Scenedesmus sp.*, 60,74 mg de éster/g de biomassa, ou seja, 6,07%, em trabalho mais recente. Esses mesmos autores verificaram que a síntese de ésteres da biomassa da microalga da espécie *Spirulina platensis* mostrou melhor resultado utilizando etanol e hexano, obtendo valores de rendimento acima de 70mg/g.

De acordo com Ahmad *et al.*, (2014) as diferenças nas reações de transesterificação/esterificação *in situ* entre espécies ocorrem, possivelmente, devido às diferenças na estrutura celular entre as espécies de microalgas.

A Figura 26 representa a produção de biodiesel a partir da transesterificação.





Figura 26 - Produção de biodiesel
Fonte: Própria autora (2015).

6 CONCLUSÃO

O desenvolvimento de cultivo das microalgas apresenta-se bastante promissor por apresentar altas taxas de crescimento, o que implica em um aumento considerável na produtividade de ácidos graxos.

Verificou-se que a fauna de microrganismos fitoplanctônicos na lagoa de Maracanaú-Ce, Brasil, é bastante diversificada, contendo várias espécies consideradas com ocorrência, variando de frequente e muito frequente. Observou-se também que não há sazonalidade entre o período chuvoso e não chuvoso, e que muitas das espécies encontradas tem potencial biotecnológico.

Ao realizar o isolamento das espécies, observou-se que não foi possível devido à presença de fungos, no meio de cultivo sólido, e dos zooplânctons, no meio natural líquido, o qual são predadores naturais do fitoplâncton.

Com relação aos meios de cultivos líquidos utilizados (WC, Oligo e ASM), percebeu-se que houve eficiência principalmente no meio Oligo, mas que para algumas espécies, como *Scenedesmus obliquus* e *Pediastrum simplex*, foi alterado o seu ciclo de vida, fazendo com que dobrasse o tempo para que as espécies chegassem à fase exponencial, prejudicando os objetivos do trabalho.

Já para as espécies *Nitzschia sp* e *Chlorella sp*, apesar de ter sido feito inúmeras diluições do meio de cultivo, o isolamento não foi efetivado devido à presença de outras espécies da mesma família dessas microalgas.

Com isso, optou-se pela opção de utilizar uma cepa de microalga já isolada, Escolheu-se a espécie *Chlorella sp*, pois a mesma estava presente em todas as coletas realizadas na lagoa de Maracanaú-Ce, e pelo potencial para biocombustível que tal espécie possui.

Concluiu-se que é possível realizar o cultivo em escala laboratorial a partir da espécie *Chlorella sp*, o qual obteve um bom crescimento, mediante as condições fornecidas.

Entretanto, os valores obtidos para a etapa de colheita da biomassa seca, a obtenção do óleo de microalga, e o rendimento encontrado para a produção de biodiesel, foram inferiores quando comparados a outros trabalhos, por litro de biodiesel proveniente de microalgas.

Verificou-se ainda, que a tecnologia não se apresenta economicamente viável frente a outros tipos de biocombustíveis. O principal fator que encarece o biodiesel de

microalgas é o elevado consumo de energia, principalmente pela colheita, através da centrifugação.

Sendo assim, entende-se que seja necessário realizar um estudo para otimizar esse processo, objetivando melhorar os rendimentos para cada etapa, sendo uma alternativa trocar a centrifugação por eletrofloculação.

REFERÊNCIAS

- AFNOR – Association Française de Normalisation. Essais des eaux. Derteminacion de linhibition de *Snedesmus subspicatus* par une substance. Norme experimentable T90-304. 1980.
- ANDERSEN, R. A; & KAWACHI, M; 2005. Traditional microalgae isolation techniques. In “Algal culturing techniques” (Andersen R. A., ed.), PP. 83-100. Elsevier, London, UK.
- AGUILAR, R. S.; OLIVEIRA, L. C. de S.; ARCANJO, G. L. F. Energia Renovável: Os ganhos e os impactos sociais, ambientais e econômicos nas indústrias Brasileiras. In: XXXII ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO. 2012. Bento Gonçalves, RS, outubro de 2012.
- AHMAD, A.L. *et al.* Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, v.15, p.584-593, 2014.
- APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20 ed. Washington: APHA/ WEF/ AWWA. 2005.
- ANEEL – AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA, Energia Éolica. 2006. Disponível em: <http://portal2.tcu.gov.br/portal/pls/portal/docs/2506133.PDF>. Acesso em: 17 Nov. 2015.
- ANJOS, J. P.; ROCHA, G. O.; ANDRADE, J. B;. Matriz energética e o binômio água vs. energia para o Brasil. **Ciência Cultural.**, São Paulo, v. 66, n. 4, Dez. 2014. Available from <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252014000400002&lng=en&nrm=iso>. access on 17 Nov. 2015.
- ATABANI, A.E.; SILITONGA, A.S.; BADRUDDIN, I.A.; MAHLIA, T.M.I.; MASJUKI, H.H.; MEKHILEF, S. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 2070– 2093, 2012.
- ASHOKKUMAR, V.; RENGASAMY, R.; DEEPALAKSHMI, S.; SIVALINGAM, A.; SIVAKUMAR, P. Mass cultivation of microalgae and extraction of total hydrocarbons: A kinetic and thermodynamic study. **Fuel**. V. 119, p.308-312, 2014.
- AZEREDO, V.B.S. Produção de biodiesel a partir do cultivo de microalgas: estimativa de custos e perspectivas para o Brasil. 2012. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- Banco Mundial. 2014. **Relatório Anual de 2014 do Banco Mundial Washington, DC:** Banco Mundial. doi: 10.1596/ 978-1-4648-0245-4. Licença: Creative Commons Atribuição Sem Derivações-Sem Derivados 3.0 OIG (CC BY-NC-ND 3.0 IGO).
- BARSANTI L.; GUALTIERI, P. Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology. London: Taylor & Francis, 2006, 301p.
- BERMANN, C. Crise ambiental e as energias renováveis. **Ciência Cultura**, São Paulo, v. 60, n. 3, p. 2029. Set. 2008. Available from

<http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252008000300010&lng=en&nrm=iso>. access on 15 Jun. 2015.

BICUDO, Carlos E. M.; BICUDO, Denise C. Amostragem em Limnologia. São Carlos: RiMa, 372 p. 2004.

BICUDO, C.E.M. & MENEZES, M. 2006. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições. RiMa Editora, São Carlos, 489 p.

BICUDO, C.; MENEZES, M. Introdução: As algas do Brasil. In: FORZZA, RC., org., et al. INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. Catálogo de plantas e fungos do Brasil [online]. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. p. 49-60. Vol. 1. ISBN 978-85-8874-242-0. Available from SciELO Books.

BLIGH, E.G., DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, n. 37, p. 911-917. 1959.

BORTOLETO, E. M. A implantação de grandes hidrelétricas: desenvolvimento, discursos impactos. **Geografares**, Espírito Santo. [S.l.], jun. 2001. ISSN 2175-3709. Disponível em: <<http://periodicos.ufes.br/geografares/article/view/1140>>. Acesso em: 10 jun. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.7147/GEO2.1140>.

BRASIL. Congresso Nacional. **Lei n. 9.478**, de 6 de Agosto de 1997.

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

BROWN, M. R. *et al.* Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, v.151, p.315-331, 1997.

BUCKERIDGE, M. S; DOS SANTOS, W. D; DE SOUZA, A. P. As rotas para o etanol celulósico no Brail. In CORTEZ, L. A. B. (Ed.). **Bioetanol para cana de açúcar, P & D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: FAPESP, 2010. p. 365-380.

CAMARGO, A. S. G. *Análise da operação das Usinas Eólicas de Camelinho e Palmas e avaliação do potencial eólico de localidades no Paraná*. 2005. Dissertação (Mestrado em Tecnologia), CEFET-PR, Curitiba. 2005.

CAMPO E LAVOURA. Disponível em: <<http://zh.clicrbs.com.br/rs/noticias/campo-e-lavoura/noticia/2015/04/producao-de-biodiesel-deve-crescer-25-no-brasil-em-2015-4731798.html>>. Acesso em: 10 jun. 2015.

CAVALCANTI, V. F; LEAL, B. E.S; PRADO, M. R; SAKUMA, A. C; PEGORADO, L, A; RAMOS, L. P. Cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* em fotobiorreator de placas planas e produção de ésteres por transesterificação *in situ*. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 3, p.244-254, 2014.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Norma Técnica L5.303 - Fitoplâncton de ÁguaDoce – Métodos Qualitativo e Quantitativo (Método de Ensaio), março, 2005.

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

CNI – Confederação Nacional da Indústria; Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico e Social; Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. (2010). Pesquisa gestão ambiental na indústria brasileira. Rio de Janeiro, 2010.

Companhia Energética de Minas Gerais. Alternativas Energéticas: uma visão Cemig. Belo Horizonte: Cemig, 2012. P. 369: ilustr.

CORTEZ, L. A. B.; LORA, E. E. S.; GÓMEZ, E. O. *Biomassa para energia*. Campinas, São Paulo. Editora Unicamp, 2008. 29 p.

COSTA NETO, Pedro R. et al. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 531-537, Agosto. 2000. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422000000400017&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 19 Abril 2016 <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422000000400017>.

CRUZ, J. *Ocean Wave Energy - Current Status and Perspectives*. Virtual Series. 2008. Springer-Verlag. 431 p.

DANTAS, D. M.; DRUMMOND, A. R. F.; SANTOS, L. B. G.; SANTOS, F. K.; BEZERRA, R. S.; GALVÁREZ, A. O. Extração de óleo de microalga utilizando ultrassom com diferentes solventes visando a produção de biodiesel. In: IV CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA E I SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE OLEAGINOSAS ENERGÉTICAS, 2010. p. 1900-1904. Anais... Campina Grande, 2010.

DAVID, J. C. A preliminary catalogue of the names of fungi above the rank of order. **Constancia**. v.83. p.1–30. 2002.

DECICINO, R. (s.d). Material orgânico pode ser combustível. 2007. Disponível em: <<http://educacao.uol.com.br/disciplinas/geografia/biomassa-material-organico-pode-ser-combustivel.htm>>. Acesso em 07 Mar. 2015.

DERNER, R. B. *et al.*. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, dez. 2006. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782006000600050&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em 19 nov. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782006000600050>.

DEMIRBAS, A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. **Energy Conversion and Management**, Turquia. v.50, n. 1. p. 14– 34. 2009.

DOURADO, M. P.; BALLESTEROS, E.; ARNAL, J. M.; GÓMEZ, J.; JIMÉNEZ, F. J. L.; *Energy Fuels*. n. 17, p. 1560. 2003.

DRAGONE, G; FERNANDES, B. D; ABREU, A. P; VICENTE, A.A; TEIXEIRA, J. A. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. **Applied Energy**. V. 88, p. 3331-3335, 2011.

ENCARNAÇÃO, A.P. 2008. **Geração de Biodiesel pelos Processos de Transesterificação e Hidroesterificação, Uma Avaliação Econômica**. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ.144 p. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos UFRJ, Escola de Química. 2008.

EPE – Empresa de Pesquisa Energética. Nota técnica DEA 02/09: Caracterização do uso da Energia no Setor Siderúrgico Brasileiro. Disponível em: <http://www.epe.gov.br>. Rio de Janeiro/RJ. 2009.

FANGRUI M.; MILFORD A. H. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, n. 70, v. 70, p. 1-15. 1999.

FARIA, Rita C. M. et al . Desenvolvimento e validação de metodologia de análise de misturas biodiesel: diesel utilizando cromatografia gasosa-espectrometria de massas. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 8, p. 1900-1905, 2007.

FERNANDES, L. F; LAGOS, P. D; WOSIACK, A.C; PACHECO, C.V; DOMINGUES, L; ZENHDER-ALVES, L; COQUEMALA, V. **Comunidades fitoplanctônicas em ambientes lênticos**. Capítulo 9 *in* ANDREOLI, C.V. & CARNEIRO, C. (Editores) **Gestão Integrada de Mananciais de Abastecimento Eutrofizados**. Curitiba (PR), Sanepar, c.9, 500P, 2005.

FERREIRA, L. C. **O fitoplâncton na zona de arrebanção de praias urbanas na região metropolitana de Recife, Pernambuco, Brasil**. 2007.147f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Oceanografia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

FRANCO, A. L. C. *et al*. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 437-448, 2013. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422013000300015&lng=en&nrm=iso>. Access on 19 Nov. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422013000300015>.

FIELD'S K. A. P.; DAMASCENO K. H. R.; MARTINS, M. M.; JUNIOR, D. O. A.; CORDEIRO, D. L. Aquisição de conhecimento por meio da produção de biodiesel por craqueamento. XIV encontro Nacional de ensino de Química. Cód. 539-2. São Paulo, 2008.

GALLINA, A. L. ; RUSSO, M. E. ; ZANETTE, V.H. ; CUNHA, M. T.; RODRIGUES, P. R. P. Aplicação do aço inoxidável 316 na construção de uma mini destilaria de álcool e uma usina compacta para de biodiesel. IN: 10º SEMINÁRIO BRASILEIRO DO AÇO INOXIDÁVEL, 2010, RIO DE JANEIRO. 10º SEMINÁRIO BRASILEIRO DO AÇO INOXIDÁVEL. Rio de Janeiro: Polo Printer. v. único. p. 236-244, 2010.

GERIS, R. *et al*. Biodiesel de soja: reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1369-1373, Outubro 2007. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000500053&lng=en&nrm=iso>. access on 19 Jan. 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000500053>.

GIACCHETTO, C. P. Um panorama do biodiesel: novo combustível para o Brasil. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Administração de empresas). Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos – UNIFEB, Barretos. 53 f. 2008.

GOLDEMBERG, J. **Energia no Brasil**. Rio de Janeiro: LTC, 1979. 171p.

- GOLDEMBERG, J. Biomassa e energia. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 582-587, 2009. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000300004&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 18 Nov. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000300004>.
- GOLDEMBERG, J; LUCON, O. Energia e meio ambiente no Brasil. **Estudos avançados**, São Paulo, v. 21, n. 59, p. 7 – 20, Abril. 2007. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40142007000100003&lng=en&nrm=iso>. access on 17 Nov. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-40142007000100003>.
- GOMES, A. J. L. **Avaliação de recursos geotermiais da Bacia do Paraná**. 2009. 184 f. Tese (Doutorado em Geofísica) – Observatório Nacional. Rio de Janeiro, 2009.
- GOOGLE Maps. **Lagoa de Maracanaú – Ceará**. 2016. Disponível em: <<https://www.google.com.br/maps/place/Lagoa+de+Maracana%C3%BA+-+Centro,+Maracana%C3%BA+-+CE/@-3.878585,-38.6296562,800m/data=!3m1!1e3!4m2!3m1!1s0x7c7536bea70b733:0x397116a498c9b3e0>>. Acesso em: 10 jan. 2016.
- GRAHAM L. E.; WILCOX L. W. *Algae*; Prentice Hall, New York. 2000.
- GRESSLER, P. D; **Avaliação da eficiência de *Desmodesmus subspicatus* (R. Chodat) E. Hegewald & A. Schmidt (CHLOROPHYCEAE) cultivada em fotobiorreator tubular com efluente da ETE-UNISC, visando biorremediação e obtenção de energia**, 2011. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental). Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC. 2011.
- GROBBELAAR, J.U. Algal biotechnology: real opportunities for Africa. **South African Journal of Botany**, África do Sul. v.70, n.1, p.140-144, 2004.
- GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. Yellow green algae with chlorophyllid-c. **Journal of Phycology**, New York, v. 8, p. 10-14, 1972.
- HENRIKSON, R. *Microalga Spirulina: Superalimento del futuro*. Barcelona: Ediciones S.A. Urano, ISBN: 84-7953-047-2, 1994.
- IEA – International Energy Agency. **World Energy Statistics**. 2010.
- IPCC – Intergovernmental Panel on Climate Change. **Climate Change 2011: Synthesis Report**. A Contribution of Working Groups I, II, and III to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Watson, R. T., Core Writing Team (Ed.). Cambridge: Cambridge University Press, 2011.
- JOHNSON, M.; WEN, Z.; **Energia. Fuel** **2009**, 23, 5179.
- KASTOVSKA K., ELSTER J., STIBAL M. and SANTRUCKOVA H. 2005. Microbial assemblages in soil microbial succession after glacial retreat in Svalbard (high Arctic). *Microbial Ecology* v.50, pg.396–407.
- LEE, R.E. *Phycology*. 2ª ed. Cambridge University Press, Cambridge. 644p. 2008.

Lei Nº 11.097, de 13 de Janeiro de 2005. Disponível em:
www.aneel.gov.br/cedoc/blei200511097.pdf. Acesso em 25/05/2015.

Li, Yanqun; Horsman, Mark; Wu, Nan; Lan, Christopher Q; Calero - Dubois, Nathalie. 2008. Biofuels from microalgae. **Biotechnology**. 12 de Março de 2008, Vol. 24, 815-820, pp. 815-820.

LIRA, R. de A.; MARTINS, M. A.; MACHADO, M. F.; CORRÊDO, L. de P.; MATOS, A. T. As microalgas como alternativa à produção de biocombustíveis. **Reveng**, Minas Gerais. n.20, v. 5, p. 389-403, 2012.

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

LUCON, O.; GOLDEMBERG, J. Crise financeira, energia e sustentabilidade no Brasil. **Estudos avançados**, São Paulo, v. 23, n. 65, p. 121-130, 2009. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40142009000100009&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 17 nov. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-40142009000100009>.

MACIEL, A. C. da C. O carbono através dos tempos. 2007. 96 f. Trabalho de Conclusão de Curso. (Curso de Licenciatura Plena em Química). Centro Universitário LA SALLE. Canoas. 2007.

MACIAS-SANCHES, M. D; MANTELL, C; RODRIGUEZA, M; MARTINEZ DE LA OSSAA E; LUBIANB, L. M; MONTEROB, O. Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*. **Talanta**, v. 77, n. 3, p. 948-952, 2009.

MAITY, J.P; *et al.*, Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives e A mini review, **Energy** (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2014.04.003>.

MARIUZZO, P. Hidrelétricas são a opção energética mais limpa e barata para o Brasil. **Inovação Uniemp**, Campinas, v. 3, n. 2, abr. 2007. Disponível em <http://inovacao.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-23942007000200002&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 17 nov. 2015.

MAROUBO, L. A. **Estudo sobre a obtenção de biomassa microalgal como matéria-prima para a produção de biodiesel**. 2013. Trabalho de conclusão de curso em Engenharia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Londrina. Londrina. 102 f. 2013.

MARTINI, P. R. R. **Conversão Pirolítica de Bagaço Residual da Indústria de Suco de Laranja e Caracterização Química dos Produtos**. 2009. 117 f. Dissertação (Mestrado em Química) PPGQ, UFSM, Santa Maria: 2009.

MASIERO, G; LOPES, H. Etanol e biodiesel como recursos energéticos alternativos: perspectivas da América Latina e da Ásia. **Revista Brasileira Política Internacional** [online]. v.51, n.2. ISSN 0034-7329. 2008.

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, n. 1, p. 217–232, Jan. 2010.

MELO, A. M. F. Desenvolvimento de catalisadores alternativos para obtenção de ésteres alquílicos por transesterificação ou esterificação. 2012. 70 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas, Alagoas. 2012.

MENEZES, R. S. *et al.* Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 10-15, 2013. Available from

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422013000100003&lng=en&nrm=iso>. access

on 19 Nov. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-4042201300010000>

METRI, P. Energia nuclear. **Geociências (São Paulo)**, São Paulo, v. 27, n. 1, jan. 2008.

Disponível em <http://ppegeo.igc.usp.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-90822008000100025&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 17 nov. 2015.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA – MME. Balanço energético nacional. BEN 2014. Brasília, 2014.

MIURA, A. K. *Identificação de áreas potenciais para cultivos destinados à produção de bioenergia com apoio de geotecnologias*. 2012. 152 p. (sid.inpe.br/mtc-

m19/2012/05.10.18.50-TDI). Tese (Doutorado em Sensoriamento Remoto) - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos, 2012. Disponível em: <<http://urlib.net/8JMKD3MGP7W/3BS8BU5>>. Acesso em: 10 jul. 2015.

MORAIS, R. F. de. *et al.* Elephant grass genotypes for bioenergy production by direct biomass combustion. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 44, n. 2, p. 133-140, Fev. 2009. Available from

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2009000200004&lng=en&nrm=iso>. access

on 18 Nov. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2009000200004>

MORAIS, M. G., COSTA, J. A. V. Carbon dioxide biofixation with *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina sp.* cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. **Biotechnol Letters**. n. 29, p. 1349–1352, 2007.

NOGUEIRA, M. F. M.; RENDEIRO, G. Caracterização energética da biomassa vegetal. In: RENDEIRO, G. *et al.* Combustão e gasificação de biomassa sólida: soluções energéticas para a Amazônia. Brasília, DF: MME, 2008. p.52-63.

NPDEAS. 2013. Disponível em: <<http://www.npdeas.blogspot.com/>>. Acesso em: 10 nov. 2015.

OLIVEIRA, J. R. de *et al.* Estado nutricional e produção da pimenteira com uso de biofertilizantes líquidos. **Revista brasileira engenharia agrícola ambiental**, Campina Grande, v. 18, n. 12, p. 1241-1246, Dez. 2014. Available from

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-43662014001200006&lng=en&nrm=iso>. access on 18 Nov. 2015.

<<http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v18n12p1241-1246>>.

OZGENER, L.; HEPBASLI, A.; DINCER, I. Parametric study of the effect of dead state on energy and exergy efficiencies of geothermal district heating systems. **Heat Transfer Engineering**, Canadá. v. 28, nº. 7, p. 357-364, Mar. 2007. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01457630601122948?journalCode=uhte20>>. Acesso em: 5 mar. 2015.

PENA, R. F. A. Fontes não renováveis de energia. **Brasil Escola**. 2012. Disponível em <<http://www.brasilecola.com/geografia/fontes-nao-renovaveis-energia.htm>>. Acesso em 17 de novembro de 2015.

PEREIRA, A. B. **Produção de biomassa e de lipídeos por cultivo misto de microalgas suplementado por CO₂**. 2013. 109f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

PHUKAN, M. M. *et al.*. Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock. **Special issue of energy from algae: current status and future trends**, v. 88, n. 10, p. 3307-3312, out. 2011.

PIRES, V. B. L. IMPACTO SOCIAL DO PROGRAMA NACIONAL DE PRODUÇÃO E USO DE BIODIESEL (PNPB) NO NORDESTE: 2008/2013. 2015. Dissertação (Mestrado em agronegócio), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília (UnB), Brasília, 147 f. 2015.

PROCHÁZKOVÁ, G.; BRÁNYIKOVÁ, I.; ZACHLEDER, V.; BRÁNYIK, T. Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. **Journal Applied Phycology**, v. 26, p. 1359–1377, 2014.

RAMOS, L.P.; KUCEK, K.; DOMINGOS, A.K.; WILHEM, H.M. Biodiesel: um projeto de sustentabilidade econômica e socio-ambiental para o Brasil. **Biociência, Ciência e Desenvolvimento**, v. 31, p. 28–37, 2003.

RAVEN P. H.; EVERT R. F.; EICHHORN S. E. *Biologia Vegetal*. 7th ed. Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, p. 830. 2007.

RATHMANN, R. *et al.* Biodiesel: Uma alternativa estratégica na matriz energética brasileira. 2007. Disponível em: <http://www.biodiesel.gov.br/docs/ArtigoBiodieselGINCOB-UFRGS.pdf> >. Acesso em: 10/09/2015.

REYNOLDS, C. S. & JAWORSKI, G. H.M. 1978. Enumeration of natural *Microcystis* populations. *Br.Phycol. J.* 13: 269-277.

RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell. Science, 2004. p. 264-272.

RICKLEFS, R. E. **A economia da Natureza**. 5ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2003.

ROCHA. L. S. da; COSTA, R. G. S. As vantagens e desvantagens das energias renováveis e não renováveis. 2014. p. 2. Disponível em <<http://www2.unigranrio.br/recursos/documentos/ICJr/12ICJr.pdf>>. Acesso em 28.01.2015.

RODRIGUES, M. do C. **Economia, energia e meio-ambiente: elementos para a formulação de políticas públicas e análise de oportunidades de investimentos.** 2008. 123 f. Dissertação (mestrado). Programa de Pós – graduação em Economia. Universidade do Vale do Rio dos Sinos. São Leopoldo-RS, 2008.

RODRIGUES, R. S. O uso de energia oriunda de fontes renováveis nas indústrias brasileiras: uma questão de sustentabilidade. São Paulo: 2006.

ROLLEMBERG, M. C.; GONÇALVES, M. L. S.; SANTOS, M. M. C dos; BOTELHO, M. J.; Bioelectr. **Bioenergia.** v. 48. n. 61. 1998.

SANT'ANNA, C.L., AZEVEDO, M.T.P., AGUJARO, L.F., CARVALHO, M.C., CARVALHO, L.R. & SOUZA, R.C.R. Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras. Interciência/ Sociedade Brasileira de Ficologia – SBFic, São Paulo, 2006. 58p.

SANTOS, M. G. R. S. Fontes alternativas de energia. **Revista Analytica.** São Paulo. n.32. Dezembro 2007/Janeiro 2008 • Nº32. Disponível em: <suapesquisa.com/energia/fontes_renovaveis.htm> Acesso em: 02 Fev. 2014.

SANTOS, S. de F. de O. M.; HATAKEYAMA, K. Processo sustentável de produção de carvão vegetal quanto aos aspectos: ambiental, econômico, social e cultural. **Produção,** São Paulo, v. 22, n. 2, p. 309-321, Abr. 2012. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-65132012000200011&lng=en&nrm=iso>. access on 18 Nov. 2015. Epub Mar 06, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-65132012005000010>.

SÉSTON BIOTECNOLOGIA. 2013. Disponível em: <<http://www.seston.com.br>>. Acesso em: 12 nov. 2015.

SHEEHAN, J. *et al.* An overview of biodiesel and petroleum diesel life cycles. **A report by US Department of Agriculture and Energy,** U. S. A, p. 1–35, Mai. 1998.

SILVA, L. L. F. **Luminação pública no Brasil: aspectos energéticos e institucionais,** 2006. 161f. (COPPE/UFRJ, Mestrado em Planejamento Energético) - Universidade Federal do Rio de Janeiro – COPPE. 2006.

SILVA, M. A. S. da. **Mapas auto-organizáveis na análise exploratória de dados geoespaciais multivariados.** 2004. 117 f. Dissertação (Mestrado em Computação Aplicada). Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos. 2004. Disponível em: <<http://urlib.net/sid.inpe.br/jeferson/2004/03.25.16.40>>. Acesso em: 18.10.2011.

SILVA, M. S. **Energia Elétrica.** 2009. Editora Alameda. Disponível em: <http://www.suapesquisa.com/o_que_e/energia_eletrica.htm>. Acesso em: 15 nov. 2015.

SILVA-BAUMGÄRTNER, T. R. D. S. **Cultivo e extração de óleo das microalgas *Scenedesmus sp.* e *Spirulina sp.* para a síntese de ésteres visando a produção de biodiesel.** 2011, 124p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011.

SHENG-YI, C.; CHIEN-YA, K.; MING-TA, T.; SEOW-CHIN, O.; CHIUN-HSUN, C.; CHIH-SHENG, L. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. **Bioresource technology**. Taiwan, n. 100. p. 833-838. 2010.

SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**. São Paulo: E. Blücher, 2001. v. 2, 254 p.

SCHMIDT, C. J. B.. Aislamiento, purificación, y mantenimiento de cepas de microalgas. In: VEGA, B.O.A.; VOLTOLINA, D.. **Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal**. 1. ed. La Paz: Centro de Investigaciones biológicas Del Noroeste (CIBNOR), p 1 ± 16, 2007.

SOARES, D. **Avaliação do crescimento celular e da produtividade de Lipídios de microalgas marinhas em diferentes regime de cultivo**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, p. 107. 2010.

SOUTH, G. R. & WHITTICK, A. Introduction to phycology. **Blackwell Scientific Publications**, London. Edinburgh. Boston. Palo Alto. Carlton. p. 341, 1987.

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

STEIN, J. Handbook of phycological methods; Culture methods and growth measurements, Cambridge: University Press. 1973.

TAKAGI, M.; KARSENO, YOSHIDA, T. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglycerid in marine microalgae. *Dunaliella cells*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 3, p. 223-226, 2006.

TOLMASQUIM, M. T.; GUERREIRO, A.; GORINI, R. Matriz energética brasileira: uma prospectiva. **Novos estudos - CEBRAP**, São Paulo, n. 79, p. 47 – 69, Nov. 2007. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-33002007000300003&lng=en&nrm=iso>. Access on 16 Nov. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-33002007000300003>.

União Europeia, **Diretiva 30**, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 8 de maio de 2003.

VEGA, B.O.A.; VOLTOLINA, D.. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. In: VEGA, B.O.A.; VOLTOLINA, D.. **Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal**. 1. ed. La Paz: Centro de Investigaciones biológicas Del Noroeste (CIBNOR), p. 17-25. 2007.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. do C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 139-145, Fev. 2004. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000100024&lng=en&nrm=iso>. Access on 19 Nov. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000100024>.

VIÊGAS, C.V. **Extração e caracterização dos lipídeos da microalga *Chlorella pyrenoidosa* visando à produção de ésteres graxos**. 2010. 90 f. Dissertação (Mestrado em química tecnológica e ambiental). Rio Grande: Universidade Federal do Rio Grande, 2010.

- VIEIRA, G. **Gap dynamics in managed Amazonian forest: Structural and ecophysiological aspects**. 2011. 162f. Tese (Doutorado em Ecologia Tropical) - University of Oxford, Grã-Bretanha. 2011.
- VILLAC, M.C.; CABRAL-NORONHA, V.A.P. & PINTO, T.O. The Phytoplankton Biodiversity of the Coast of the State of São Paulo, Brazil. **Biota Neotropical**. v. 8. n. 3. p.152-174. 2008.
- VONSHAK, A. *Spirulina platensis* (Arthrospira) physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis, ISBN 0-7484-0674-3, 1997.
- WALISIEWICZ, M. Energia alternativa: solar, eólica, hidrelétrica e de biocombustíveis. Tradução Elviras Serapico. São Paulo. Publifolha, 2008.
- WANG, B., LI, Y.; WU, N., LAN, C. Q.. CO2 bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Germany, 79, 2008, p. 707–718
- WARNIER, O. The influence of an anti-hail net on the quality of fruits and their production. *Fruit Belge*, v.72, p.86-93, 2004.
- WILSON, E. O. *The Diversity of life*. **Belknap press of Harvard University**, Cambridge. 1992.
- WU, Z; ZHU, Y; HUANG, C; LI, T; ZHANG, Y; LI, A. Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 496-502, 2013.

ANEXOS

1. Tabela de reagentes utilizada para o preparo do meio de cultura W. C.

Reagentes	Solução-estoque (g 100mL ⁻¹)	Meio de cultura
CaCl ₂ .2H ₂ O	36,8	1mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	37,0	1mL
Na ₂ HCO ₃	12,6	1mL
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	11,4	1mL
NaNO ₃	85,0	1mL
Na ₂ SiO ₃ .5H ₂ O	21,2	1mL
Solução de Ferro	(g 1000mL ⁻¹ de água destilada) Na ₂ EDTA = 4,36 FeCl ₃ .H ₂ O = 3,15	1mL
Solução micronutrientes MnCl ₂ .4H ₂ O = 0,18 Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O = 0,006 H ₃ BO ₃ = 1,0	(g 1000mL ⁻¹ de água destilada) CuSO ₄ .5H ₂ O = 0,01 ZnSO ₄ .7H ₂ O = 0,022 CoCl ₂ .H ₂ O = 0,01	1mL
Solução vitaminas	(g 1000mL ⁻¹ de água destilada) Tiamina HCl = 0,1 Biotina = 0,0005	1mL
Água destilada		1000mL

2. Tabela de reagentes utilizada para o preparo do meio de cultura ASM.

Soluções Estoque	Nutrientes	Quantidade (g)
Sol. A	NaNO ₃	8,5000
	MgSO ₄ + 7H ₂ O	2,4500
	MgCl ₂ + 6H ₂ O	2,0500
	CaCl ₂ + 2H ₂ O	1,4500
Sol. B	KH ₂ PO ₄	8,7000
	Na ₂ HPO ₄ + 12H ₂ O	17,8000
Sol. C	H ₃ BO ₃	28,4000
	MnCl ₂ + 4H ₂ O	13,9000
	FeCl ₂ + 6H ₂ O	10,8000
	ZnCl ₂	3,3500
	CoCl ₂ + 6H ₂ O	0,1900
	CuCl ₂ + 2H ₂ O	0,0140
Sol. D	EDTA titriplex	18,6000

Para cada solução (A, B, C e D) os compostos são diluídos em 1.000 mL de água deionizada e armazenados no freezer em frascos plásticos.

3. Tabela de reagentes utilizada para o preparo do meio de cultura L. C. Oligo.

Solução	Reagente	Quantidade Mg	Preparo
1	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	4 000	Dissolver e diluir a 100 mL com água

			processada
2	KNO_3	10 000	Dissolver e diluir a 100 mL com água processada
3	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3 000	Dissolver e diluir a 100 mL com água processada
4	K_2HPO_4	4 000	Dissolver e diluir a 100 mL com água processada
5	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	30	Dissolver e diluir a 1 000 mL com água processada
	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	60	
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	60	
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	60	
	$\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	60	
	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	60	
6	H_3BO_3	60	Dissolver e diluir a 1 000 mL com água processada
	$\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1 625	
	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	625	
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	625	
7	NaHCO_3	15 000	Dissolver e diluir a 1 000 mL com água processada