



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOGÁS UTILIZANDO MICROALGA *Spirulina*
sp. LEB-18

ADRIANO SEIZI ARRUDA HENRARD

Prof. Dr. JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA
Orientador

Prof^a. Dr^a. MICHELE DA R. A. Z. DE SOUZA
Co-orientadora

RIO GRANDE, RS
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOGÁS UTILIZANDO MICROALGA *Spirulina*
sp. LEB-18

ADRIANO SEIZI ARRUDA HENRARD

Tese apresentada como parte
dos requisitos à obtenção do
título de Doutor em
Engenharia e Ciência de
Alimentos.

Prof. Dr. JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA
Orientador

Prof^a. Dr^a. MICHELE DA R. A. Z. DE SOUZA
Co-orientadora

RIO GRANDE, RS

2013

Tenha em mente que tudo que você aprende na escola é trabalho de muitas gerações. Receba essa herança, honre-a, acrescente a ela e, um dia, fielmente, deposite-a nas mãos de seus filhos.

Albert Einstein

Dedico este trabalho aos meus pais Paulo Arruda Pereira e Abgail Rosa Arruda, imprescindíveis e a quem serei eternamente grato.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Paulo e Abgail que sempre me apoiaram, incentivaram e me ajudaram de todas as formas possíveis, pela luta incansável para que eu conseguisse superar os obstáculos e realizasse esse sonho.

Aos meus familiares pelo apoio e esforço incondicional para me ajudar de alguma forma e por torcerem e vibrarem com as minhas conquistas.

Ao meu orientador Jorge Alberto Vieira Costa por ter me orientado desde a iniciação científica, pela confiança, pelos conselhos, incentivo, respeito, amizade, por acreditar no meu potencial e me fazer crescer tanto pessoalmente como profissionalmente.

A minha co-orientadora Michele da Rosa Andrade Zimmermann de Souza que dedicou muito de seu tempo corrigindo esta tese, pelas reuniões intermináveis, pelos conselhos e puxões de orelha, atenção e preocupação ao longo deste período.

A minha namorada Lucia Rivero, melhor amiga e companheira, pelo amor, atenção, carinho e amizade, por ter vivenciado e ajudado em todos os detalhes deste trabalho e pela eterna paciência nos momentos de estresse.

Aos colegas do G[∞] Lucia Rivero, Gabriel Martins, Daiane Schmatz e Joice Aline e outros que ficaram pelo caminho, pela grande contribuição na execução deste trabalho e incansável dedicação.

Aos amigos (as) que sempre torceram por mim e me apoiaram, pelos momentos de alegria e grande amizade, os conselhos, o pôquer ganho com facilidade e os churrascos inacabáveis.

Por toda a equipe do LEB pela disposição em ajudar em vários momentos, conhecimentos passados, suportarem o “cheiro agradável” das análises, os bolinhos de chuva da Roberta, os cafés da “melhor padaria do mundo”, as viagens, os churrascos.

Aos demais professores e funcionários da FURG pelos conhecimentos passados e pelo indispensável auxílio.

A todos os membros da banca examinadora que com sua experiência científica e conceituada qualificação enriqueceram as discussões deste trabalho através de suas sugestões.

Às pessoas que contribuíram: Professor Renato Dutra Pereira e Vitor Furlong (contribuição teórica, artes gráficas e ideias para montagem de dispositivos), Juliana Moura (Refinaria Riograndense, análises cromatográficas), Professora Mônica Wellner (análises elementares).

A Universidade Federal do Rio Grande – FURG, uma instituição pública, gratuita e de qualidade, por ter me acolhido desde a graduação.

A CAPES e CNPq pelo apoio financeiro e por me proporcionar o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE QUADROS	xiv
NOMENCLATURA	xv
CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
1.1 INTRODUÇÃO	4
1.2 OBJETIVOS	6
1.2.1 Objetivo Geral.....	6
1.2.2 Objetivos Específicos.....	6
1.3 JUSTIFICATIVA	7
1.4 HISTÓRICO DA LINHA DE PESQUISA NO LEB	9
CAPÍTULO II: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 Matriz Energética	13
2.2 Microalgas	14
2.3 Fotossíntese	17
2.4 Fatores físico-químicos no cultivo de microalgas	19
2.4.1 Nutrientes.....	19
2.4.2 Carbono no cultivo de microalgas.....	21
2.4.3 Temperatura e luminosidade.....	24
2.5 Biorreatores para cultivo de microalgas	26
2.6 Lipídios e ácidos graxos obtidos da biomassa microalgal e suas aplicações	29
2.7 Digestão anaeróbia	32
2.8 Biomassa metanogênica	35
2.9 Biorreatores anaeróbios	37
2.9.1 Biorreator anaeróbio operado em batelada sequencial (ASBR).....	37
2.10 Fatores físico-químicos na digestão anaeróbia	38
2.10.1 Temperatura.....	38
2.10.2 pH.....	40
2.10.3 Alcalinidade.....	41

2.10.4 Nitrogênio amoniacal.....	42
2.11 Biogás	43
2.12 Remoção biológica do CO₂ presente no biogás a partir de microalgas.....	44
2.13 Efluente da produção de biogás e sua aplicação em cultivo de microalgas	46
CAPÍTULO III: DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	49
3.1 ARTIGO 1	51
PRODUÇÃO DE BIOGÁS UTILIZANDO BIOMASSA MICROALGAL EM ESCALA PILOTO.....	51
3.1.1 Resumo.....	52
3.1.2 Introdução	53
3.1.3 Material e Métodos.....	54
3.1.4 Resultados e Discussão	57
3.1.5 Conclusão	65
3.1.6 Referências Bibliográficas	66
3.2 ARTIGO 2	71
CULTIVO DE <i>Spirulina</i> sp. LEB-18 UTILIZANDO EFLUENTE DA DIGESTÃO ANAERÓBIA	71
3.2.1 Resumo.....	72
3.2.2 Introdução	73
3.2.3 Material e Métodos.....	74
3.2.4 Resultados e Discussão	78
3.2.5 Conclusão	88
3.2.6 Referências Bibliográficas	89
3.3 ARTIGO 3	96
PURIFICAÇÃO DE BIOGÁS EM FOTOBIOREATOR TUBULAR VERTICAL EM SÉRIE	96
3.3.1 Resumo.....	97
3.3.2 Introdução	98
3.3.3 Material e Métodos.....	99
3.3.4 Resultados e Discussão	104
3.3.5 Conclusão	118
3.3.6 Referências bibliográficas.....	119
CAPÍTULO IV: CONCLUSÃO GERAL	123
4 CONCLUSÃO GERAL.....	124
4.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	126

CAPÍTULO V: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128
ANEXOS	155
Fotos dos ensaios	156
Meio Zarrouk (Zarrouk, 1966).....	159
Artigo publicado na revista Brazilian Journal of Chemical Engineering.....	168

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fotomicrografia da microalga <i>Spirulina</i>	16
Figura 2 Esquema da fotossíntese, fixação de CO ₂ e acúmulo de carbono nas células de microalgas.....	18
Figura 3 Espécies de carbono inorgânico formadas em função do pH	22
Figura 4 Etapas da transformação da biomassa para produção de biogás	33
Figura 5 Etapas do ciclo operacional do reator anaeróbio operado em batelada sequencial (ASBR) (DAGUE et al., 1992).....	38
Figura 6 (a) proporção entre as formas de nitrogênio amoniacal em função do pH; (b) porcentagem de amônia presente em uma solução a 20, 35 e 55 °C variando o pH...	42
Figura 7 Biossistema para produção de biogás e biomassa microalgal utilizando efluentes do processo anaeróbio.....	50

ARTIGO 1: PRODUÇÃO DE BIOGÁS UTILIZANDO BIOMASSA MICROALGAL: EM ESCALA PILOTO

Figura 1 Aparato experimental utilizado para a produção de biogás a partir de <i>Spirulina</i> sp. LEB-18 (1) biorreator anaeróbio de 310 L; (2) tubulação de alimentação de biomassa de <i>Spirulina</i> sp. LEB-18 e saída de efluente; (3) frasco de segurança; (4) fluxômetro	56
Figura 2 (a) Produção específica de biogás (P _E) e (b) conversão de biomassa (fração orgânica) em biometano (Y _{CH₄/Org}) nos ensaios: escala de bancada a 35 °C (■), escala piloto com temperaturas entre 26-38 °C (□) e escala piloto com temperaturas entre 12-21 °C (▲). Os desvios padrões são apresentados sobre cada coluna.	58
Figura 3 (a) Produção específica de biogás (P _E , d ⁻¹) para o Ensaio 1 (▲) e Ensaio 2 (■). (b) Temperaturas registradas durante o Ensaio 1 (Δ) e Ensaio 2 (□).....	61

ARTIGO 2: CULTIVO DE *Spirulina* sp. LEB-18 UTILIZANDO EFLUENTE DA DIGESTÃO ANAERÓBIA

Figura 1 Desenho esquemático do biorreator tipo <i>raceway</i> de 6 L	76
Figura 2 Curvas de crescimento de <i>Spirulina</i> sp. LEB-18 em: (a) meio Zarrouk; (b) meio Zarrouk modificado contendo 20 % (v/v) de efluente e 5,3 g.L ⁻¹ de NaHCO ₃ ; e (c) meio Zarrouk modificado contendo 20 % (v/v) de efluente e 2,8 g.L ⁻¹ de NaHCO ₃	81
Figura 3 Variação da concentração de HCO ₃ ⁻ (a) e pH (b) dos cultivos de <i>Spirulina</i> sp. LEB-18 em: meio Zarrouk (◇); meio Zarrouk modificado contendo 20 % (v/v) de	

efluente e $5,3 \text{ g.L}^{-1}$ de NaHCO_3 (●); e meio Zarrouk modificado contendo 20 % (v/v) de efluente e $2,8 \text{ g.L}^{-1}$ de NaHCO_3 (x).....84

ARTIGO 3: PURIFICAÇÃO DE BIOGÁS EM FOTOBIOREATOR TUBULAR VERTICAL EM SÉRIE

Figura 1 Desenho esquemático dos cultivos da microalga *Spirulina* sp. LEB-18 nos FBRTs de 2 L em série: (1) cilindro de CO_2 ou biogás; (2) bomba pneumática; (3) válvulas solenoide; (4) rotâmetros; (5) entrada do gás e/ou ar; (6) FBRTs em série; (7) saída do gás e/ou ar.....100

Figura 2 Curvas de crescimento para a microalga *Spirulina* sp. LEB-18 cultivada em FBRTs em série com diferentes fontes de carbono: E1: (a) pulsos diários de NaHCO_3 , FBRT1 (X), FBRT2 (+) e FBRT3 (◇); E2: (b) ar enriquecido com 25 % (v/v) CO_2 , FBRT1(●),FBRT2 (■) e FBRT3 (▲) e E3: (c) biogás (25 % (v/v) CO_2 e 75 % (v/v) CH_4), FBRT1 (○), FBRT2 (□) e FBRT3 (Δ).....106

Figura 3 Produtividade diária da microalga *Spirulina* sp. LEB-18 cultivada em FBRTs em série com diferentes fontes de carbono: E1: (a) pulsos diários de NaHCO_3 , FBRT1 (X), FBRT2 (+) e FBRT3 (◇); E2: (b) ar enriquecido com 25 % (v/v) CO_2 , FBRT1(●), FBRT2 (■) e FBRT3 (▲) e E3: (c) biogás (25 % (v/v) CO_2 e 75 % (v/v) CH_4), FBRT1 (○), FBRT2 (□) e FBRT3 (Δ)108

Figura 4 pH nos cultivos da microalga *Spirulina* sp. LEB-18 nos FBRTs em série: (a) E1: FBRT1 (X) FBRT2 (+) FBRT3 (◇), (b) E2: FBRT1(●) FBRT2 (■) FBRT3 (▲) e (c) E3: FBRT1 (○) FBRT2 (□) FBRT3 (Δ).....110

Figura 5 Concentração de carbono inorgânico dissolvido no meio para os FBRTs em série durante os 8 d de ensaio: E2: (a) ar enriquecido com 25 % (v/v) CO_2 , FBRT1(●), FBRT2 (■) e FBRT3 (▲) e E3: (b) biogás (25 % (v/v) CO_2 e 75 % (v/v) CH_4), FBRT1 (○), FBRT2 (□) e FBRT3 (Δ)111

Figura 6 Fixação diária total (FDT, %) de CO_2 para a microalga *Spirulina* sp. LEB-18 após os três FBRTs em série para: E2 (■): ar enriquecido com 25 % (v/v) CO_2 e E3 (■): biogás (25 % (v/v) CO_2 e 75 % (v/v) CH_4)116

Figura 7 Concentração de metano purificado no ensaio E3 realizado em FBRTs em série após remoção biológica do CO_2 pela microalga *Spirulina* sp. LEB-18 em cada FBRT: (●) concentração de CH_4 na entrada do FBRT1; (+) concentração de CH_4 na saída FBRT1; (X) concentração de CH_4 na saída FBRT2 e (▲) concentração de CH_4 na saída FBRT3117

ANEXOS

Figura A1 Reator anaeróbio de 310 L utilizado nos Ensaios 1 e 2.....	156
Figura A2 “Sample bag” utilizado para coleta do gás e envio à análise cromatográfica.	156
Figura A3 Cultivo da microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB-18 em meio Zarrouk modificado com efluente da produção de biogás.	157
Figura A4 Cultivo da microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB-18 em meio Zarrouk modificado com adição diária de NaHCO ₃	157
Figura A5 Cultivo da microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB-18 em meio Zarrouk modificado com CO ₂ sintético.	158
Figura A6 Cultivo da microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB-18 em meio Zarrouk modificado com biogás sintético.	158
Figura A7 pH no Ensaio 1: 26-38 °C (●) e Ensaio 2: 12-21 °C (○).....	160
Figura A8 Sólidos Totais no Ensaio 1: 26-38 °C (●) e Ensaio 2: 12-21 °C (○)	160
Figura A9 Sólidos Voláteis no Ensaio 1: 26-38 °C (●) e Ensaio 2: 12-21 °C (○)	161
Figura A10 Decomposição da biomassa (X_T) de <i>Spirulina</i> sp. LEB-18 no Ensaio 1: 26-38 °C (●) e Ensaio 2: 12-21 °C (○)	161
Figura A11 Decomposição da fração orgânica (X_{Org}) da biomassa de <i>Spirulina</i> sp. LEB-18 no Ensaio 1: 26-38 °C (●) e Ensaio 2: 12-21 °C (○).....	162
Figura A12 Produção de biogás ($V_{gás\ produzido}$) no Ensaio 1: 26-38 °C (●) e Ensaio 2: 12-21 °C (○)	162
Figura A13 Conversão da fração orgânica da biomassa em biogás ($Y_{CH_4/Org}$) no Ensaio 1: 26-38 °C (●) e Ensaio 2: 12-21 °C (○)	163
Figura A14 Alcalinidade no Ensaio 1: 26-38 °C (●) e Ensaio 2: 12-21 °C (○)	163
Figura A15 Nitrogênio amoniacal (N-NH ₄) no Ensaio 1: 26-38 °C (●) e Ensaio 2: 12-21 °C (○)	164
Figura A16 Acúmulo de CO ₂ fixado (FA) em cada FBRT pela microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB-18 nos FBRTs em série: (a) E2: FBRT1(●) FBRT2 (■) FBRT3 (▲) e (b) E3: FBRT1 (○) FBRT2 (□) FBRT3 (Δ).....	165
Figura A17 Fixação diária de CO ₂ (FD) em cada FBRT pela microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB-18 nos FBRTs em série: (a) E2: FBRT1(●) FBRT2 (■) FBRT3 (▲) e (b) E3: FBRT1 (○) FBRT2 (□) FBRT3 (Δ).....	166
Figura A18 Fixação diária de CO ₂ (FD) em cada FBRT pela microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB-18 nos FBRTs em série: (a) E2: FBRT1(●) FBRT2 (■) FBRT3 (▲) e (b) E3: FBRT1 (○) FBRT2 (□) FBRT3 (Δ).....	167

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Energia primária no Brasil e no mundo.....	13
Tabela 2 Concentrações de óleo encontradas em diferentes espécies de microalgas.	30
ARTIGO 1: PRODUÇÃO DE BIOGÁS UTILIZANDO BIOMASSA MICROALGAL: EM ESCALA PILOTO	
Tabela 1 Composição centesimal da biomassa de <i>Spirulina</i> sp. LEB-18 utilizada como substrato para produção de biogás.	55
Tabela 2 Decomposição da biomassa de <i>Spirulina</i> sp. LEB-18 (X_T , %), decomposição da fração orgânica da biomassa (X_{Org} , %) e conversão da fração orgânica da biomassa em CH_4 ($Y_{CH_4/Org}$, $g.g^{-1}$) obtidas durante a produção de biogás a partir de <i>Spirulina</i> sp. LEB-18, em escala de bancada e nos Ensaios 1 e 2.....	59
Tabela 3 Composição do biogás produzido na digestão anaeróbia da biomassa de <i>Spirulina</i> sp. LEB-18 em escala de bancada e nos Ensaios 1 e 2	62
Tabela 4 pH, alcalinidade e nitrogênio amoniacal durante a digestão anaeróbia da biomassa de <i>Spirulina</i> sp. LEB-18.....	64
ARTIGO 2: CULTIVO DE <i>Spirulina</i> sp. LEB-18 UTILIZANDO EFLUENTE DA DIGESTÃO ANAERÓBIA	
Tabela 1 Composições dos meios de cultivo utilizadas nos experimentos	75
Tabela 2 Caracterização do efluente de processo anaeróbio utilizado para os cultivos de <i>Spirulina</i> sp. LEB-18.....	78
Tabela 3 Parâmetros cinéticos nos cultivos da microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB-18.	82
Tabela 4 Caracterização da biomassa de <i>Spirulina</i> sp. LEB-18 produzida.....	85
Tabela 5 Perfil de ácidos graxos (%) da biomassa de <i>Spirulina</i> sp. LEB-18 produzida em meio Zarrouk (1), 20 % (v/v) de efluente e 5,3 $g.L^{-1}$ de $NaHCO_3$ (2) e 20 % (v/v) de efluente e 2,8 $g.L^{-1}$ de $NaHCO_3$ (3).....	86
ARTIGO 3: PURIFICAÇÃO DE BIOGÁS EM FOTOBIOREATOR TUBULAR VERTICAL EM SÉRIE	
Tabela 1 Condições experimentais dos cultivos com a microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB-18	101
Tabela 2 Concentração celular máxima ($X_{máx}$, $g.L^{-1}$) e produtividade máxima ($P_{máx}$, $g.L^{-1}.d^{-1}$) para a microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB-18 cultivada com diferentes fontes de	

carbono: NaHCO ₃ (E1), CO ₂ sintético (E2) e biogás sintético (E3) nos FBRTs em série	105
Tabela 3 Composição elementar da biomassa de <i>Spirulina</i> sp. LEB-18 cultivada com diferentes fontes de carbono: NaHCO ₃ (E1), CO ₂ sintético (E2) e biogás sintético (E3) nos FBRTs em série.....	113
Tabela 4 Fixação diária máxima (FDM, %) e fixação média (FM, %) de CO ₂ pela microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB-18 cultivada com injeção de CO ₂ sintético (E2) e biogás sintético (E3) nos FBRTs em série	114

ANEXOS

Tabela A1 Composição do Meio Zarrouk.	159
--	-----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Funções dos principais nutrientes presentes nos meios de cultivos de microalgas.....	20
Quadro 2 Comparação entre cultivos realizados em sistemas abertos e fechados.	28
Quadro 3 Algumas conversões anaeróbias com os respectivos valores de Energia Livre de Gibbs.	40
Quadro 4 Microalgas estudadas para biofixação de CO ₂	46

NOMENCLATURA

% v/v	Concentração percentual em volume
% p/p	Concentração percentual em peso
α_0, α_1 e α_2	Frações de ionização de cada espécie química no equilíbrio
ω -3	Ácidos graxos ômega-3
ω -6	Ácidos graxos ômega-6
[CO ₂]	Concentração molar de CO ₂
[CO ₃ ²⁻]	Concentração molar de CO ₃ ²⁻
[H ⁺]	Concentração molar de íons hidrogênio
[HCO ₃ ⁻]	Concentração molar do íon bicarbonato
[NH ₄ ⁺]	Concentração molar de íons amônio
AA	Ácido araquidônico
ADP	Adenosina difosfato
AGI	Ácidos graxos insaturados
AGPI	Ácidos graxos poli-insaturados
Alc _c	Alcalinidade total
ANEEL	Agência Nacional de Energia Elétrica
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association Of Analytical Communities
APHA	American Public Health Association
ATP	Adenosina trifosfato
ASBR	Anaerobic sequencing batch reactor
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CGTEE	Companhia de Geração Térmica de Energia Elétrica
CHN	Composição elementar da biomassa (%)
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CNTP	Condições Normais de Temperatura e Pressão (273,15 K; 101.325 Pa)
CSTR	Continuously stirred tank reactor
CTC	Centro de Tecnologia Canavieira
DHA	Ácido docosahexaenoico
C _{CO₂ in}	Concentração de CO ₂ na entrada da série dos FBRTs (% v/v)
C _{CH₄ in}	Concentração de CH ₄ na entrada da série dos FBRTs (% v/v)
C _T	Concentração total de carbono inorgânico dissolvido

E1	Ensaio com fonte de carbono NaHCO_3
E2	Ensaio com fonte de carbono CO_2 sintético
E3	Ensaio com fonte de carbono biogás
ELETOBRAS	Centrais Elétricas Brasileiras
EPA	Ácido eicosapentaenoico
EPB	Efluente da produção de biogás
FA	Acúmulo de CO_2 fixado (g CO_2)
FA_t	Acúmulo de CO_2 (g CO_2) no tempo t (d)
FA_{t+1}	Acúmulo de CO_2 (g CO_2) no tempo $t+1$ (d)
FA1_t	Acúmulo de CO_2 (g CO_2) no FBRT1 no tempo t (d)
FA2_t	Acúmulo de CO_2 (g CO_2) no FBRT2 no tempo t (d)
FA3_t	Acúmulo de CO_2 (g CO_2) no FBRT3 no tempo t (d)
$\text{FA1}_{(t+1)}$	Acúmulo de CO_2 fixado (g CO_2) no FBRT1 no tempo $t+1$ (d)
$\text{FA2}_{(t+1)}$	Acúmulo de CO_2 fixado (g CO_2) no FBRT2 no tempo $t+1$ (d)
$\text{FA3}_{(t+1)}$	Acúmulo de CO_2 fixado (g CO_2) no FBRT3 no tempo $t+1$ (d)
FAO	Food and Agriculture Organization
FBRT	Fotobiorreator tubular vertical
FBRT1	Primeiro fotobiorreator da série
FBRT2	Segundo fotobiorreator da série
FBRT3	Terceiro fotobiorreator da série
FD	Fixação diária de CO_2 ($\text{g CO}_{2\text{fixado}} \cdot \text{g}^{-1} \text{CO}_{2\text{injetado}} \cdot \text{d}^{-1}$)
FDM	Fixação diária máxima de CO_2 ($\text{g CO}_{2\text{fixado}} \cdot \text{g}^{-1} \text{CO}_{2\text{injetado}} \cdot \text{d}^{-1}$)
FDT	Fixação total diária de CO_2 ($\text{g CO}_{2\text{fixado}} \cdot \text{g}^{-1} \text{CO}_{2\text{injetado}} \cdot \text{d}^{-1}$)
FDA	Food and Drug Administration
FM	Fixação média de CO_2 ($\text{g CO}_{2\text{fixado}} \cdot \text{g}^{-1} \text{CO}_{2\text{injetado}} \cdot \text{d}^{-1}$)
FURG	Universidade Federal do Rio Grande
GJ	Gigajoule
GNV	Gás Natural Veicular
GRAS	Generally Recognized As Safe
GWh	Gigawatts hora
HDL	High-density lipoprotein
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IEA	International Energy Agency
K_1 e K_2	Constantes de ionização
LEB	Laboratório de Engenharia Bioquímica

LDL	Low-density lipoprotein
MDL	Mecanismo de Desenvolvimento Limpo
M_C	Massa molar do carbono ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
m_{cbm}	Fração mássica de carbono na biomassa ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
m_{CH_4}	Massa de metano produzida (g)
$m_{\text{CO}_2\text{d}}$	Massa de CO_2 (g) injetada diariamente
M_{CO_2}	Massa molar do CO_2 ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
m_{Org}	Massa da fração orgânica da biomassa decomposta (g)
MWh	Megawatts hora
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NAG	N-acetilglicosamina
NAM	Ácido N-acetil murâmico
ρ	Nível de significância
P	Produtividade ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)
P_A	Produtividade areal de biomassa ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$)
$P_{A \text{ máx}}$	Produtividade máxima areal ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$)
P_V	Produtividade volumétrica de biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)
$P_{V \text{ máx}}$	Produtividade máxima volumétrica ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)
P_E	Produção específica de biogás (d^{-1})
$P_{\text{máx}}$	Produtividade máxima ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)
ppm	Concentração em partes por milhão
PUFA	Ácido graxo poliinsaturado
SBR	Sequential batch reactor
SQDG	Sulfoquinovosil diglicerídeo
t	tempo (d)
TAG	Triacilgliceróis
UASB	Upflow anaerobic sludge bed
UPF	Universidade de Passo Fundo
$V_{\text{biorreator}}$	Volume do biorreator anaeróbio (L)
$V_{\text{gás}}$	Volume de biogás produzido por dia ($\text{L}\cdot\text{d}^{-1}$)
vvm	Vazão específica de aeração (volume de ar por volume de meio por minuto) (min^{-1})
WHO	World Health Organization
X	Concentração de biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

X_o	Concentração inicial de biomassa em base seca (g.L^{-1})
$X_{\text{máx}}$	Concentração máxima de biomassa em base seca (g.L^{-1})
X_{Org}	Decomposição da fração orgânica da biomassa (%)
X_t	Concentração de biomassa (g.L^{-1}) no tempo t (d)
X_T	Decomposição da biomassa alimentada (%)
$Y_{\text{CH}_4/\text{Org}}$ em metano (g.g^{-1})	Conversão da fração orgânica da biomassa de <i>Spirulina</i> LEB-18
ZERI	Zero Emissions Research & Initiatives
$\mu_{\text{máx}}$	Velocidade específica máxima de crescimento (d^{-1})
ΔG	Energia Livre de Gibbs (kJ.mol^{-1})

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO

RESUMO

O crescimento da população mundial e a tentativa de substituição parcial dos combustíveis fósseis por novas fontes de energia têm levado a uma maior atenção quanto à possível escassez de alimentos e a carência de grandes áreas disponíveis para agricultura. Microalgas, por meio do metabolismo fotossintético, utilizam energia solar e gás carbônico como nutrientes para o crescimento. A microalga *Spirulina* pode ser utilizada como suplemento alimentar, na biofixação de CO₂, como fonte de biocombustíveis e no tratamento de efluentes. A digestão anaeróbia da biomassa microalgal produz biogás e os resíduos deste processo podem ser utilizados como substrato para novos cultivos da microalga. O objetivo deste trabalho foi estudar a conversão de *Spirulina* sp. LEB-18 em biogás em escala piloto e produzir biomassa microalgal utilizando os efluentes bicarbonato e dióxido de carbono do processo anaeróbio como fonte de nutrientes. *Spirulina* foi utilizada como substrato na digestão anaeróbia para produção de biogás em escala piloto sob temperaturas variáveis (12-38 °C). Efluente do processo anaeróbio foi adicionado (20 %, v/v) como fonte de carbono no cultivo da microalga para avaliar o crescimento e a composição da biomassa. A seguir foi avaliada a capacidade da microalga de remover CO₂ presente no biogás através de biofixação para obtenção do biocombustível purificado. O biogás produzido sob as diferentes temperaturas apresentou entre 72,2 e 74,4 % de CH₄, quando realizado nas temperaturas 12 a 21 °C e 26 a 38 °C, respectivamente. A redução na temperatura do processo anaeróbio provocou um decréscimo na conversão de biomassa em biogás (0,30 para 0,22 g.g⁻¹), ocorrendo dentro da faixa adequada e segura para as bactérias metanogênicas (pH 6,9; alcalinidade entre 1706,0 e 2248,0 mg.L⁻¹ CaCO₃ e nitrogênio amoniacal 479,3 a 661,7 mg.L⁻¹). Os cultivos de *Spirulina* sp. LEB-18 em efluente anaeróbio contendo 20 % (v/v) e meio Zarrouk modificado (NaHCO₃ 2,8 e 5,3 g.L⁻¹) apresentaram velocidade específica máxima de crescimento entre 0,324 e 0,354 d⁻¹, produtividade volumétrica entre 0,280 e 0,297 g.L⁻¹.d⁻¹ e produtividade areal entre 14,00 e 14,85 g.m⁻².d⁻¹, sem diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as diferentes condições estudadas. Lipídios variaram entre 4,9 e 5,0 % com proporção de ácido linoleico maximizada nos meios com efluente e ácido alfa-linolênico reduzida nesses meios em comparação ao meio Zarrouk completo. Nos ensaios para avaliar a capacidade da microalga *Spirulina* sp. LEB-18 de remover CO₂ contaminante no biogás, as máximas concentrações celulares e produtividades de biomassa variaram, respectivamente, entre 1,12 e 1,24 g.L⁻¹ e 0,11 e 0,14 g.L⁻¹.d⁻¹, não apresentando diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os ensaios. A maior fixação diária total (FDT) de dióxido de carbono obtida foi 58,01 % (v/v) em cultivos com adição de biogás contendo 25 % (v/v) CO₂. Obteve-se biogás com 89,5 % (v/v) de CH₄ após injeção em cultivos de *Spirulina*, no qual aproximadamente 45 % (v/v) do CO₂ injetado foi fixado pela microalga, gerando biomassa para diversas aplicações e biogás purificado.

Palavras - chave: biogás, cianobactéria, digestão anaeróbia, dióxido de carbono, efluente anaeróbio.

ABSTRACT

The world's population increase and the attempt in partial substitution of fossil fuels for new energy sources have been leading to a greater attention towards a possible food shortage and lack of available lands for agriculture. Through the photosynthetic metabolism, microalgae use solar energy and carbon dioxide as nutrients for their growth. The microalgae *Spirulina* can be used as food supplement, on the biofixation of CO₂, as source of biofuels and on the treatment of effluents. The anaerobic digestion of the microalgae biomass produces biogas and its residues can be used as substratum for new microalgae culture. The objective of this task was to study a *Spirulina* sp. LEB-18 conversion into biogas in a pilot scale and to produce microalgae biomass using the effluents bicarbonate and carbon dioxide of the anaerobic process as a source of nutrients. *Spirulina* was used as substratum in the anaerobic digestion for the biogas production in pilot scale under varying temperatures (12-38 °C). The process of the anaerobic effluent has been added (20 %, v/v) as a carbon source in the microalgae culture to evaluate the biomass's growth and composition. Next, the microalgae's capacity of removing the resident CO₂ in the biomass through biofixation to obtaining the refined biofuel has been evaluated. Produced under different temperatures, the biogas has shown between 72.2 % and 74.4 % of CH₄ when accomplished with 12 to 21 °C and 26 to 38 °C temperatures, respectively. The reduction of the temperatures in the anaerobic process caused a decrease in the conversion of biomass into biogas (0.30 to 0.22 g.g⁻¹), occurring within the adequate and safe range for methanogenic bacteria (pH 6.9; alkalinity between 1706.0 and 2248.0 mg.L⁻¹ CaCO₃ and ammoniacal nitrogen 479.3 to 661.7 mg.L⁻¹). The *Spirulina* sp. LEB-18 cultures into anaerobic effluents containing 20 % (v/v) and Zarrouk modified medium (NaHCO₃, 2.8 and 5.3 g.L⁻¹) showed specific maximum speed of growth between 0.324 and 0.354 d⁻¹, volumetric productivity between 0.280 and 0.297 g.L⁻¹.d⁻¹ and areal productivity between 14.00 and 14.85 g.m⁻².d⁻¹, without signifying differences ($p > 0.05$) between different studied conditions. Lipids vary between 4.9 and 5.0 % with maximized proportion of linoleic acid in environments with effluent and reduced alfa-linoleic acid in these environments in comparison to the complete Zarrouk one. On the essays to evaluate microalgae *Spirulina* sp. LEB-18's capacity of removing contaminant CO₂ on biogas, the maximum cellular concentrations and productivities of biomass varied, respectively, between 1.12 and 1.24 g.L⁻¹ and 0.11 and 0.14 g.L⁻¹.d⁻¹, not showing signifying differences ($p > 0.05$) between essays. The major total diary fixation (TDF) of carbon dioxide obtained was 58.01 % (v/v) in cultures with the addition of biogas containing 25 % (v/v) of CO₂. Biogas has been obtained with 89.5 % (v/v) of CH₄ after injection in *Spirulina*'s cultures, in which approximately 45 % (v/v) of CO₂ injected had been fixed by the microalgae, generation biomass for multiple applications and refined biogas.

Keywords: biogas, cyanobacterium, anaerobic digestion, carbon dioxide, anaerobic effluent.

1.1 INTRODUÇÃO

O rápido aumento da concentração de gases poluentes na atmosfera, principalmente o CO₂, combinado com a depleção dos combustíveis fósseis, tem aumentado o interesse em energias renováveis e sustentáveis. Cientistas em vários países vem estudando novas tecnologias para o sequestro do CO₂ emitido principalmente devido à atividade industrial, contribuindo assim com a redução do aquecimento global.

Devido à alta produtividade de biomassa e por se reproduzirem em águas residuais, as microalgas podem unir estes temas, através da mitigação de CO₂ utilizado para o crescimento fotossintético da biomassa, da produção de biomassa com valor nutricional e com composição adequada para utilização na produção de biocombustíveis, como o biodiesel, bioetanol e biogás.

As microalgas são um dos mais eficientes sistemas biológicos de transformação de energia solar em compostos orgânicos, por meio da fotossíntese (VONSHAK, 1997). Esses micro-organismos podem ser utilizados na biofixação de CO₂ (MORAIS; COSTA, 2007b) bem como no tratamento de efluentes (MATA et al., 2012). Os biocombustíveis de microalgas, comparados com os combustíveis de primeira e segunda geração, têm a vantagem de não contribuir com o desmatamento, com o consumo excessivo de água, podendo esta ser alcalina, salobra ou até mesmo residual. Além disso, não competem com áreas que poderiam ser utilizadas para a produção de alimentos (COSTA; MORAIS, 2011).

O biogás pode ser produzido a partir de resíduos sólidos ou líquidos, bem como através de biomassa microalgal. As microalgas são substratos adequados para processamento anaeróbio, devido à sua elevada concentração de proteínas, lipídios e carboidratos (SIALVE et al., 2009). A produção de biogás a partir da digestão anaeróbia da biomassa de *Spirulina* é facilitada pela sua alta concentração de matéria orgânica (cerca de 93 %, p/p) (COSTA et al., 2008). No processo de digestão anaeróbia da biomassa o efluente produzido contém importantes nutrientes, como carbono, nitrogênio e fósforo, que podem ser recuperados para a produção de biomassa da microalga (CONVERTI et al., 2009).

Duas fontes de carbono são geradas durante a produção de biogás, HCO₃⁻ (bicarbonato) no efluente líquido e CO₂ gasoso no biogás. Embora a concentração de carbono inorgânico dissolvido no efluente líquido anaeróbio seja menor do que a indicada na formulação de meios de cultivo padrão para a produção de biomassa de

microalgas do gênero *Spirulina*, como o meio Zarrouk (ZARROUK, 1966), Radmann et al. (2007) e Andrade et al. (2008) encontraram maiores produtividades para esta microalga em meios de cultivo diluídos, abrindo assim a possibilidade da utilização do efluente anaeróbio para o crescimento de microalgas do gênero *Spirulina* e uma alternativa para diminuição dos custos de produção da biomassa. Segundo Chen et al. (2008), microalgas cultivadas em efluente da produção de biogás podem apresentar elevadas concentrações de proteínas, lipídios e carboidratos, podendo ser utilizadas na produção de biocombustíveis.

Como produto final da digestão anaeróbia, obtém-se biogás, com uma combinação de metano, dióxido de carbono, traços de outros gases (H_2 , N_2 , O_2 e H_2S) e ácidos orgânicos de baixo peso molecular (GE et al., 2011). Um dos aspectos positivos da digestão anaeróbia de microalgas é o fato do biogás apresentar elevada concentração de metano (60-70 %) e mínimas concentrações de enxofre quando comparado ao gás oriundo de outros substratos (SIALVE et al., 2009). Além disso, o CO_2 produzido durante o processo pode ser consumido como nutriente para cultivos de microalgas, aumentando assim, a pureza do biogás (KAO et al., 2012a).

Neste sentido, aliar o cultivo de microalgas para obtenção de biomassa microalgal, produção de biogás e a redução dos efluentes gerados durante o processo anaeróbio pode proporcionar uma alternativa promissora para produção de biocombustível e de biomassa microalgal com redução nos custos com fonte de nutrientes. Ainda, esta biomassa pode ser fonte de biocompostos e biocombustíveis para geração de energia renovável.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Estudar a conversão de *Spirulina* sp. LEB-18 em biogás em escala piloto e produzir biomassa microalgal utilizando os efluentes bicarbonato e dióxido de carbono do processo anaeróbio como fonte de nutrientes.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a produção de biogás em escala piloto em diferentes temperaturas utilizando como substrato biomassa microalgal;
- Estudar o crescimento, composição e o perfil de ácidos graxos da microalga *Spirulina* sp. LEB-18 em meio complementado com efluente da produção de biogás;
- Avaliar a capacidade de remoção biológica do CO₂ presente no biogás por meio da microalga *Spirulina* sp. LEB-18 para obtenção de metano purificado.

1.3 JUSTIFICATIVA

Clima, vegetação, fauna e ecossistemas vem sendo afetados devido ao aquecimento global nas últimas décadas. Este fenômeno é provocado pelo acúmulo de gases que são emitidos para a atmosfera devido a queima de combustíveis fósseis como o carvão mineral, óleo diesel e a gasolina, sendo o CO₂ o gás lançado em maior quantidade.

A preocupação internacional devido às consequências do acúmulo dos gases do efeito estufa na atmosfera, fez com que, em 1997, fosse estabelecido o Protocolo de Kyoto. Através deste Tratado, países desenvolvidos assumiram um compromisso em reduzir suas emissões. Porém, somente em fevereiro de 2005, entrou em vigor o Protocolo de Kyoto estabelecendo os primeiros passos para a meta de redução de gases poluentes no planeta. Os países que assinaram este Tratado se comprometeram em reduzir as emissões de gases do efeito estufa para 5,2 % abaixo dos níveis registrados em 1990. No entanto, países como o Estados Unidos tem dificultado o avanço destes acordos. Para que ocorra o cumprimento da redução desses gases, foram propostos 3 Mecanismos de Flexibilização, o Comércio Internacional de Emissões (CIE), Mecanismo de Desenvolvimento Limpo (MDL) e a Implementação Conjunta (IC). O principal deles foi o MDL, o qual possibilita a participação dos países em desenvolvimento, como o Brasil, no tratado. Esses países podem vender os créditos de carbono para países desenvolvidos, contribuindo assim para a redução de emissões de CO₂.

Desenvolvimento de energia renovável e mitigação de gases causadores do efeito estufa estão diretamente relacionados. Fontes de energias renováveis, como solar, eólica, hídrica e biomassa, podem potencialmente substituir a energia de combustíveis fósseis, emitindo assim, menores concentrações de gases para a atmosfera.

Uma das culturas que tem recebido interesse crescente por parte de grandes empresas e pesquisadores é o cultivo de microalgas. Devido à sua estrutura celular e rápida taxa de crescimento, as microalgas apresentam eficiência na biofixação de 10-50 vezes maior do que plantas terrestres e menores áreas para cultivo (LAM; LEE, 2013). A biomassa microalgal produzida pode ser utilizada como alimento para humanos e animais, e também ser aplicada na produção de biocombustíveis e na obtenção de diversos compostos com alto valor agregado, como

corantes e ácidos graxos (ZAMALLOA, et al., 2012; COLLA et al., 2004; RICHMOND, 2004).

Comparadas aos vegetais superiores, as microalgas apresentam maior eficiência fotossintética e podem ser cultivadas em meio salino (OLGUÍN et al., 2001). Além disso, o cultivo de microalgas pode ser mais facilmente controlado, com altos níveis de produção durante todo o ano, ao passo que o cultivo de vegetais depende de condições climáticas regionais mesmo com modernos sistemas de irrigação (GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009).

O cultivo das microalgas necessita de área muito menor do que aquela utilizada para produção agrícola. Uma estimativa mostra que podem ocupar apenas 1 % da área que a soja utiliza hoje e produzir a mesma quantidade de biodiesel que ela produz (QUINTELLA et al., 2009). Além disso, as microalgas apresentam elevadas produtividades em biomassa, o que representa menor utilização de área para o cultivo, a região de cultivo pode ser desértica e o solo pode estar degradado, já que o mesmo é somente utilizado como suporte para o sistema de cultivo; a produção da biomassa é contínua, não segue regime de safras; o meio de cultivo pode ser reaproveitado e como fontes de carbono podem ser utilizados o CO₂ residual de processos (KAO et al., 2012a; CONVERTI et al., 2009; BENEMANN, 1997) e fontes orgânicas residuais (ANDRADE; COSTA, 2008).

A digestão anaeróbia transforma matéria orgânica em gás, produzindo principalmente CH₄ e CO₂. O bioprocesso anaeróbio é tradicionalmente utilizado para o tratamento de resíduos agroindustriais e municipais com a finalidade de adequá-los a exigências ambientais. No entanto, vem crescendo o interesse da utilização do bioprocesso anaeróbio para a produção de biocombustíveis, principalmente biogás e bio-hidrogênio (PARMAR et al., 2011).

Comparado a outros biocombustíveis, o biogás apresenta a vantagem de poder ser produzido por meio de processamento biológico de toda a fração orgânica da biomassa microalgal ou da fração residual após a extração dos lipídios da biomassa (EHIMEN et al., 2011). A digestão anaeróbia, comparada a outros processos de produção de biocombustíveis, é operacionalmente mais simples e dispensa a secagem e o pré-tratamento químico da matéria-prima, com menor gasto energético e menor geração de resíduos. O principal componente residual da digestão anaeróbia é o dióxido de carbono (aproximadamente 25-45 % v/v), que pode ser utilizado como substrato para os cultivos de microalgas, purificando o biogás.

A biomassa microalgal vem sendo estudada como substrato para a digestão anaeróbia em escala laboratorial (ZAMALLOA et al., 2012; RAS et al., 2011; MUSSGNUMG et al., 2010; SIALVE et al., 2009; COSTA et al., 2008). No entanto, não há registros da utilização dessa biomassa para a produção de biogás em escala piloto submetida a condições ambientais não controladas, principalmente devido à quantidade de biomassa necessária a ser utilizada diariamente como substrato. Porém, o Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG, onde foi realizado este trabalho, possui duas plantas pilotos de produção de microalga, disponibilizando assim, quantidade suficiente de biomassa para o estudo proposto.

No cultivo de *Spirulina*, os nutrientes são os principais componentes dos custos de produção, principalmente o carbono (VONSHAK, 1997), que é fornecido aos cultivos como bicarbonato (HCO_3^-) ou CO_2 . Porém, estas duas fontes de carbono inorgânico são geradas no processo de produção do biogás a partir da própria biomassa da microalga. O CO_2 contamina o biogás, reduzindo o poder calorífico do mesmo, e HCO_3^- está presente no efluente líquido do processo.

1.4 HISTÓRICO DA LINHA DE PESQUISA NO LEB

O Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) vem estudando o cultivo de microalgas desde 1996. Já foram estudados substratos alternativos para o crescimento (FREITAS, 2012; ANDRADE; COSTA, 2008, 2007; COSTA et al., 2003, 2001), configurações de fotobiorreatores e modos de cultivo (HENRARD et al., 2011; ROSA, 2008; REICHERT et al., 2006; COSTA et al., 2004), efeito de fatores como temperatura (COLLA et al., 2004), iluminação (ANDRADE; COSTA, 2007), taxa de renovação e concentração de corte (HENRARD, 2009; REICHERT et al., 2006) no crescimento e composição da biomassa de microalgal. Foram realizados estudos de custos de produção (COZZA, 1999), do potencial antitumoral (LOPES et al., 2004) e hipocolesterolêmico (COLLA et al., 2008) da microalga, modelagem matemática do crescimento de *Spirulina* (CAMERINI, 2012; COSTA et al., 2002, 2000), produção de ácidos graxos (ROSA, 2012; MORAIS; COSTA, 2008a; RADMANN; COSTA, 2008) e o isolamento de uma cepa nativa do extremo sul do Brasil (MORAIS et al., 2008). Foram desenvolvidos produtos adicionados de biomassa microalgal para alimentação humana (MORAIS et al., 2006), alimentos para praticantes de atividades físicas adicionados de *Spirulina* (CARVALHO, 2010), a fixação microalgal de gás carbônico de gases de combustão

(ROSA et al., 2011; RADMANN et al., 2011; MORAIS; COSTA, 2008b; RADMANN; COSTA, 2008; CAMERINI, 2008), a seleção de microalgas para produção de bioetanol (MARGARITES, 2010), cultivo de microalgas para produção de biossurfactantes (RADMANN, 2011), potencialidade do sul do Brasil para o cultivo de *Spirulina* (ANDRADE; COSTA, 2008), extração de biopolímeros para desenvolvimento de nanofibras (MORAIS et al., 2013; MORAIS et al., 2010; MORAIS, 2008), entre outros produtos.

A produção de biogás através de biomassa microalgal começou a ser estudada em 2006 em escala de bancada, assim como a realização dos primeiros ensaios utilizando efluente líquido do processo anaeróbio como fonte de nutrientes (ANDRADE, 2009; COSTA et al., 2008).

A partir de uma parceria entre o LEB, empresas, prefeituras e organizações não governamentais foi construída uma planta para produção de microalgas. Esta planta opera, desde 2004, no extremo sul do Brasil, às margens da Lagoa Mangueira, possuindo 3 biorreatores de 15 m³, com uma produção mensal de 50-70 kg de biomassa, utilizada para enriquecimento de merenda escolar no município de Rio Grande.

Em 2004 iniciou o convênio entre o LEB, a ELETROBRÁS (Centrais Elétricas Brasileiras S. A.) e a CGTEE (Companhia de Geração Térmica de Energia Elétrica), localizada no município de Candiota – RS para desenvolvimento de tecnologia para biofixação de CO₂ originado na combustão do carvão mineral por microalgas. Como produto deste convênio foi projetada e montada a Planta Piloto de Biofixação de CO₂ por microalgas, formada por um sistema modular composto por 2 containers-laboratório de 12 m (40 pés) cada, 2 biorreatores do tipo *raceway*, com dimensões de 15 x 3 x 0,4 m e volume de 18 m³ e um biorreator, com dimensões de 4 x 0,8 x 0,4 m e volume de 1 m³, para crescimento e manutenção de inóculo. Em 2012, foi firmado a continuidade do convênio através do projeto P&D da ANEEL (Agência Nacional de Energia Elétrica) juntamente com a CGTEE, para colocar em operação a Planta Piloto de Biofixação de gás carbônico.

Uma terceira planta de produção de biomassa microalgal foi colocada em operação na cidade de Ribeirão Preto, para tratamento da vinhaça originada da produção de bioetanol por microalgas. A planta piloto é formada por 2 biorreatores de 15 m³ e 2 biorreatores de 1 m³.

Estudos vêm sendo realizados para produção de bioetanol a partir de biomassa microalgal, que pode se tornar a quarta geração de obtenção deste álcool. O

trabalho inclui parceria entre o LEB e o CTC (Centro de Tecnologia Canavieira), unindo pesquisadores e infraestrutura das duas instituições. Ainda na linha de biocombustíveis, no período 2006/2009 foi desenvolvido o projeto “Biodiesel a partir de microalgas cultivadas em água de produção/salobra”, convênio entre FURG e PETROBRÁS.

Em 2008 foi aprovado o projeto “Aquicultura de microalgas para a biofixação do gás carbônico gerado na queima do carvão e co-geração de biodiesel e bioprodutos de alto valor agregado”, através do Edital MCT/CNPq/MPA 26/2008 (Seleção pública de propostas de pesquisa e tecnologias para produção de biodiesel a partir de microalgas), o qual foi realizado através de uma parceria entre o Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG, CGTEE (Companhia de Geração Térmica de Energia Elétrica), Fundação ZERI e UPF.

Pesquisas sobre microalgas vem sendo desenvolvidas no LEB através dos projetos “Cooperação Técnica Para Obtenção de Biomassa, Bioenergia e Produtos de Alto Valor Agregado a Partir de Microalgas” e “Rede Integradora de Nanotecnologia e Biotecnologia Microalgal Para o Desenvolvimento Científico/Tecnológico e Formação de Recursos Humanos”, aprovados pela CAPES.

CAPÍTULO II: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Matriz Energética

A energia é um requisito essencial para o desenvolvimento social e econômico de um país, de modo que um dos índices de melhoria da qualidade de vida é o consumo de energia *per capita*. Nos últimos anos a energia renovável vem ganhando espaço na matriz energética de diversos países, como a Índia e o Brasil.

Os padrões atuais de produção e consumo de energia são baseados nas fontes fósseis, o que gera emissões de poluentes locais, gases de efeito estufa e põem em risco o suprimento de energia a longo prazo no planeta. Na Tabela 1 tem-se a contribuição percentual das diversas fontes de energia à energia total consumida no Brasil e no mundo em 2009.

Tabela 1 Energia primária no Brasil e no mundo.

Energia Primária	Participação (%)	
	Brasil	Mundo
Petróleo	40,2	32,8
Carvão mineral	4,6	27,2
Gás natural	7,2	20,9
Nuclear	1,4	5,8
Biocombustíveis	32,1	10,2
Hidráulica	14,2	2,3
Geotérmica/solar/eólica	0,3	0,8

Fonte: IEA (2011).

Em 2010, o consumo médio anual de energia *per capita* no Brasil alcançou 52,9 GJ. Estados Unidos, China, União Européia e Índia destacam-se por representarem mais de 60 % do consumo mundial de eletricidade. O consumo total de energia no Brasil em 2010 foi cerca de 456 mil GWh. Apesar de estar entre os dez maiores consumidores de energia no mundo, a IEA (*International Energy Agency*) ressalta que o Brasil é um dos líderes no cenário global, em que a energia renovável representa 46,6 % da matriz energética nacional, enquanto a geração de energia renovável no mundo é de apenas 13,3 % (IEA, 2011). Esse número é devido

principalmente ao bioetanol, produzido através da biomassa de cana-de-açúcar, e que representa 19 % da matriz energética e pela energia hidrelétrica, representando aproximadamente 14 % da matriz e que sustenta a geração de energia elétrica no país (IBGE, 2012).

No Brasil, a geração de energia elétrica pela queima de carvão mineral representa uma estratégia importante na matriz energética nacional. Na região onde encontra-se instalada a Companhia de Geração Térmica de Energia Elétrica (CGTEE), Empresa do Grupo Eletrobrás – Centrais Elétricas Brasileiras S.A., situa-se a maior reserva carbonífera brasileira (Jazida Grande Candiota), com aproximadamente 12 bilhões de toneladas, representando cerca de 38 % das reservas de carvão do país. A CGTEE possui duas unidades de produção de energia no Rio Grande do Sul que utilizam a queima de carvão para a geração de energia elétrica. Estas unidades, denominadas “Candiota” e “São Jerônimo”, possuem capacidades de geração de 796 e 20 MWh, respectivamente.

O gás natural é constituído pelo metano de origem fóssil e utilizado no Brasil como GNV (gás natural veicular) e para a geração de energia elétrica. Em 2010, o gás natural contribuiu com 10,8 % na matriz energética brasileira (IBGE, 2012). Além das reservas naturais, o país importa gás da Argentina e Bolívia. No entanto, o consumo de gás natural traz consigo os problemas relacionados à emissão de CO₂ fóssil e outros contaminantes como o mercúrio.

Biomassa é um termo usado no contexto de energia para uma gama de produtos derivados da fotossíntese. Os produtos podem ser classificados como resíduos sólidos urbanos de processos florestais e agrários, especialmente plantações como árvores e cana-de-açúcar, plantas aquáticas e algas (RICHMOND, 1990). A energia obtida a partir da biomassa é renovável, ao lado de outras formas, como eólica e hidrelétrica (TOLMASQUIM, 2003).

2.2 Microalgas

As microalgas representam um grupo de micro-organismos autotróficos que crescem através da fotossíntese como as plantas terrestres. Sua estrutura unicelular lhes permite crescer rapidamente e converter a energia luminosa em energia química (HARUN et al., 2010). Podem ser procarióticos (cianobactérias), antigamente chamadas de algas azul-esverdeadas, e eucarióticos, conhecidas como algas verdadeiras (LI et al., 2008). São constituídas de células típicas de bactérias

gram-negativas e coloridas devido à presença de pigmentos fotossintéticos, podendo ser amplamente encontradas nos oceanos, águas continentais e ambientes terrestres (OLAIZOLA, 2003; TOMASELLI, 1997). Apesar da ocorrência estimada de mais de 50.000 espécies de microalgas no mundo, apenas cerca de 30.000 já foram reconhecidas e estudadas (TOMASELLI, 2004).

Cianobactérias são reconhecidas como os seres vivos mais antigos do planeta. Suas características talófitas (plantas que não possuem raízes, caules e folhas), bem como a presença de clorofila proporcionam às microalgas um mecanismo fotossintético análogo ao de plantas superiores. Esta via é mais eficiente para estes seres devido à estrutura celular e também ao ambiente aquático, pois as células têm grande facilidade de interagir com água, dióxido de carbono e outros nutrientes (CHISTI, 2007a).

O uso de microalgas por seres humanos começou com os chineses há mais de 2.000 anos, que utilizavam biomassa de *Nostoc* como fonte de alimento (SPOLAORE et al., 2006). No entanto, o cultivo comercial de microalgas em larga escala só começou nos anos 60 no Japão com a cultura de *Chlorella*, seguida nos anos 70-90 pelo cultivo de *Spirulina* no México, Estados Unidos e China, onde estas microalgas eram utilizadas como alimento (BOROWITZKA, 1999). Segundo Borowitzka (1999), a microalga *Dunaliella salina* era cultivada para extração de β -caroteno, *Haematococcus pluvialis* para extração de astaxantina e diversas outras espécies de microalgas eram utilizadas como ração na aquicultura.

Atualmente a biotecnologia microalgal tem sido desenvolvida para ser utilizada em diferentes aplicações comerciais. Devido às microalgas apresentarem clorofila em sua composição, vem sendo utilizadas na formulação de alimentos e cosméticos (MORAIS et al., 2006; SPOLAORE et al., 2006), na indústria farmacêutica, devido algumas espécies de microalgas apresentarem compostos bioativos, tais como antioxidantes, antibióticos e toxinas e na extração de pigmentos e vitaminas (SAJILATA et al., 2008; MENDIOLA et al., 2008; PATIL et al., 2008; CAMPO et al., 2007). Além disso, estudos têm mostrado também sua aplicação na produção de biocombustíveis (LAM; LEE, 2013; COSTA; MORAIS, 2011; CHISTI, 2007a, 2007b), entre os quais biogás (ZAMALLOA et al., 2012; MUSSGNUM et al., 2010; COSTA et al., 2008), biodiesel (CERÓN-GARCÍA et al., 2013; HARUN et al., 2011), bioetanol (GUO et al., 2013; SUALI; SARBATLY 2012), bio-hidrogênio (RASHID et al., 2011) e na mitigação de gases que causam o efeito estufa (RADMANN et al., 2011; ROSA et al., 2011; MORAIS; COSTA, 2007a).

Spirulina

A microalga *Spirulina* (Figura 1) é uma cianobactéria filamentosa, aeróbia, tipicamente procariótica com parede celular, membrana celular, ribossomas e região nuclear, sem núcleo verdadeiro. Ao microscópio, esta microalga aparece como filamentos verdes azulados e compostos por tricomas cilíndricos multicelulares, é regularmente espiralada, com diâmetro de 20 a 45 μm , largura do filamento de 6 a 14 μm e comprimento total de 400 a 900 μm (WU et al., 2012). A forma dos tricomas pode mudar em função de fatores ambientais e físico-químicos de cultivo, como o meio de cultivo e a temperatura e varia também entre as diferentes cepas da microalga (VONSHAK, 1997).

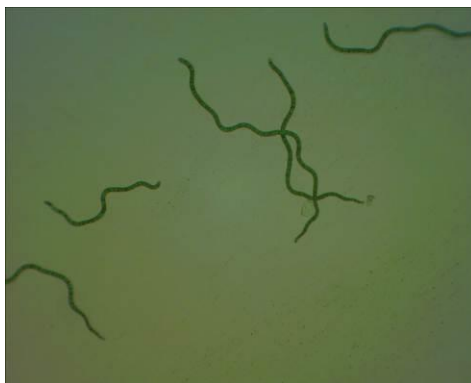


Figura 1 Fotomicrografia da microalga *Spirulina*.

Fonte: Laboratório de Engenharia Bioquímica – FURG.

Através da fotossíntese, a *Spirulina* converte os nutrientes do meio em material celular, liberando oxigênio (HENRIKSON, 1994). Sua reprodução ocorre por fissão binária, onde um tricoma sofre alongamento, acompanhando pelo aumento do número de células, seguido de quebra gerando vários filamentos (VONSHAK, 1997). Diversos nutrientes são necessários para o crescimento celular como fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, magnésio, ferro e outros micronutrientes.

A *Spirulina* é uma das microalgas mais cultivadas no mundo, pois é uma fonte proteica alternativa utilizada como suplemento alimentar humano e animal (PLAZA et al., 2009), apresentando características de alta digestibilidade (até 85 %) e teor proteico acima de 65 % (base seca). Além do alto teor proteico, a *Spirulina* apresenta de 5 a 10 % de lipídios, onde os ácidos graxos constituem a principal

porção dos lipídios totais. O teor de carboidratos encontra-se entre 10 a 20 % e 6 a 9 % de minerais e oligoelementos (VONSHAK, 1997).

Vários autores relatam a ocorrência natural de *Spirulina* sp. em diversos países como nos lagos Chad na África Central, Texcoco no México, Nakaru e Elementeita no Quênia, Aranguadi e Kilotes na Etiópia (VONSHAK, 1997; HENRIKSON, 1994). Mais recentemente, no extremo sul do Brasil, Morais et al. (2005) registraram a ocorrência de *Spirulina* na Lagoa Mangueira.

A microalga possui o certificado GRAS (*Generally Recognized As Safe*), podendo ser utilizada como alimento sem oferecer risco à saúde. Desde 23 de junho de 1981, *Spirulina* foi legalmente aceita pelo FDA (*Food and Drug Administration*) que declarou “A *Spirulina* é uma fonte de proteínas e contém várias vitaminas e minerais. Ela pode ser legalmente comercializada como alimento ou complemento alimentar, desde que precisamente qualificada e livre de contaminantes e de adulteração com substâncias” (FOX, 1996).

Efeitos terapêuticos da microalga contra doenças têm sido relatados, entre as quais hepatotoxicidade (KARADENIZ et al., 2009), rinite alérgica (CINGI et al., 2008), hipercolesterolemia (COLLA, 2008), desnutrição infantil (FOX, 1993), inclusive em pacientes imunodeprimidos (SIMPORE et al., 2005), anemias (FALQUET, 1997) e câncer (DEGBEY et al., 2004).

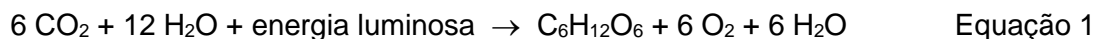
2.3 Fotossíntese

Fotossíntese é a rota pela qual quase toda a energia entra na biosfera. Este processo realiza a transformação de energia luminosa em energia química, que é estocada pelos organismos fotossintetizantes autotróficos na forma de carboidratos. A energia armazenada nessas moléculas é utilizada por algas, plantas superiores e certas bactérias para impulsionar processos celulares e servir como fonte de energia para animais já que esses não podem utilizar a luz do sol para obtenção de energia (ALBERTS et al., 1997).

Na natureza, a fotossíntese é o principal processo no qual a fixação de CO₂ é observada. A fixação biológica de CO₂ por microalgas é considerada a melhor forma de fixar esse gás, visto que o aproveitamento da energia solar é muito maior que em plantas terrestres que desempenham sua máxima capacidade fotossintética apenas por um curto período do cultivo (DOUCHA et al., 2005). Segundo Vonshak

(1997), a fotossíntese é a principal rota de fixação de carbono da microalga *Spirulina*, sendo a luz solar sua principal fonte de energia.

A reação global de fotossíntese está descrita na Equação 1:



A fotossíntese, no entanto, não ocorre em apenas uma reação química. Duas fases distintas podem ser identificadas: a fase clara e a fase escura (Figura 2). As reações da fase clara, conhecida como etapa fotoquímica, envolvem a captação da energia luminosa e conversão do ATP com redução de energia realizada pelo transporte de elétrons da H_2O para o NADP^+ . O local destas reações que envolvem o transporte de elétrons são as membranas tilacoides dispersas nas células. As reações da fase escura, conhecida como etapa química, ocorrem no estroma dos cloroplastos, sem necessidade de luz. São de natureza enzimática e utilizam a energia gerada das reações da fase clara para converter CO_2 em carboidratos, através da reação entre o gás carbônico, NADPH e ATP (VONSHAK, 1997).

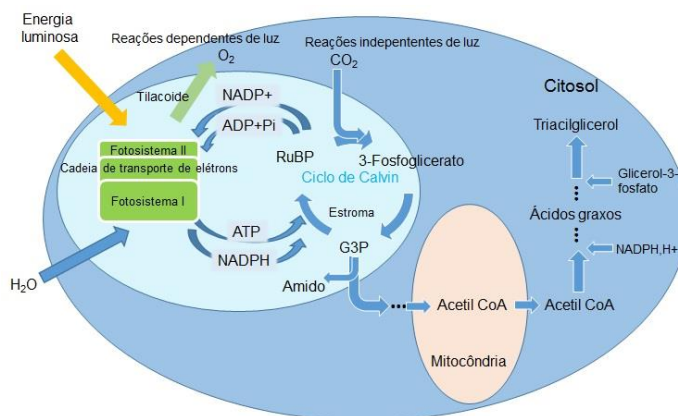


Figura 2 Esquema da fotossíntese, fixação de CO_2 e acúmulo de carbono nas células de microalgas (Adaptado de ZENG et al., 2011).

O carbono orgânico gerado a partir da fotossíntese fornece o esqueleto carbônico para a biossíntese de compostos mais complexos como as proteínas e lipídios, além de ser fonte de energia metabólica, que move todos os processos bioquímicos (LEHNINGER et al., 1995; ALBERTS et al., 1994).

Na ausência dessa energia ou na deficiência de CO_2 , um composto de reserva denominado α -1,4-glucano, similar ao glicogênio ou à fração amilopectina de amido encontrado em plantas superiores é o principal produto de reserva que suporta

o metabolismo em cianobactérias. Este é provavelmente sintetizado a partir das ficobiliproteínas, sendo oxidado a partir do ciclo oxidativo das pentoses-fosfato, fornecendo a energia necessária para processos celulares. Por sua vez, a assimilação do nitrogênio também depende da energia derivada da fotossíntese. Embora os metabolismos de carbono e nitrogênio sejam independentes, ambos podem ser absorvidos simultaneamente em compostos como proteína e cianoficina (COLLA et al., 2002).

2.4 Fatores físico-químicos no cultivo de microalgas

O desenvolvimento de um cultivo microalgal é resultado da interação entre fatores biológicos, químicos e físicos. Os fatores biológicos referem-se às próprias taxas metabólicas da espécie cultivada. Quanto aos fatores físico-químicos, os principais que afetam o crescimento da biomassa microalgal são temperatura, luminosidade, pH, salinidade e disponibilidade de nutrientes, demandando maior estudo (SCHMITZ et al., 2012). Não existe um meio de cultivo único para todas as espécies de microalgas, uma vez que cada uma tem suas necessidades específicas (RICHMOND, 2004).

2.4.1 Nutrientes

A microalga *Spirulina*, assim como outras microalgas, necessita de fontes de carbono, nitrogênio, fósforo e de outros micronutrientes (HUANG et al., 2009). Estudos sobre a nutrição de microalgas permitem avaliar o papel dos vários elementos químicos no crescimento e na produtividade do fitoplâncton (LOURENÇO, 2006).

O meio de cultivo deve fornecer nutrientes suficientes para o crescimento microalgal. A concentração de nutrientes dissolvidos contribui para o aumento da pressão osmótica do meio, influenciando na fisiologia da microalga, podendo ter efeito no crescimento e na composição da biomassa (ZENG et al., 2011; RICHMOND, 1986). O Quadro 1 resume os elementos como, carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre, os quais constituem os nutrientes mais importantes para as células microalgais.

Quadro 1 Funções dos principais nutrientes presentes nos meios de cultivos de microalgas.

Nutriente	Principais fontes	Função	Faixa de concentração
Fonte de carbono	CO ₂ , HCO ₃ ⁻ , CO ₃ ²⁻	Fornecer C à célula	1-16,8 g.L ⁻¹
Fonte de nitrogênio	NO ₃ ⁻ , Ureia, AA, N ₂	Fornecer N à célula	0,01-2,5 g.L ⁻¹
Fósforo	PO ₄ ³⁻ , hidrofosfato	Fornecer P às reações e células	0,01-0,5 g.L ⁻¹
Enxofre	SO ₄ ²⁻	Fornecer S a reações e proteínas	0,001-1,0 g.L ⁻¹
Sais Inorgânicos	K, Ca, Na, Mg	Manter a estrutura e atividade celular	0,1-1000 mg.L ⁻¹
Oligoelementos	Fe, Zn, Mn, Pb, Cd	Co-fatores enzimáticos	0,01-10 mg.L ⁻¹
Vitaminas	B, C, E	Auxiliar na divisão celular	0,01-1000 mg.L ⁻¹

Fonte: adaptado de Zarrouk (1966) e Zeng et al. (2011).

Outros elementos essenciais para o desenvolvimento de algumas espécies de microalgas são os metais como ferro, magnésio, manganês, cobalto e cobre (ZENG et al., 2011; REBOLLOSO-FUENTES et al., 2001). O principal papel de alguns metais é participar da estrutura e da atividade de enzimas envolvidas em diferentes vias metabólicas das algas. Conseqüentemente, são identificados papéis diferenciados para cada metal. Também, esses metais tem a função da participação na estruturação de certas organelas celulares, como os ribossomos (LOURENÇO, 2006).

Para o acúmulo de diferentes produtos na célula microalgal, alterações na formulação do meio de cultura são necessários. Para a produção de biodiesel, por exemplo, alta concentração de lipídios é o componente mais desejável na célula,

enquanto que, para obtenção de biomassa para aplicação em produtos relacionados à alimentação e fármacos, deve-se manipular o meio de cultivo a fim de se obter uma biomassa rica em proteínas, ácidos graxos e vitaminas (SCRAGG et al., 2002).

2.4.2 Carbono no cultivo de microalgas

As microalgas podem apresentar diversos tipos de metabolismo e algumas espécies são capazes de alternar o tipo de metabolismo de acordo com as mudanças que podem ocorrer nas condições ambientais. O metabolismo do carbono pode ser dividido em quatro tipos, (1) fotoautotrófico, (2) heterotrófico, (3) fotoheterotrófico e (4) mixotrófico. No cultivo fotoautotrófico, a única fonte de energia para produção de biomassa é a luz, a qual é convertida em energia química através da fotossíntese e a única fonte de carbono são compostos inorgânicos. No cultivo heterotrófico, somente compostos orgânicos são utilizados como fonte de carbono e energia. No cultivo fotoheterotrófico a fonte de energia é a luz, necessária para que as microalgas possam utilizar compostos orgânicos como fonte de carbono. Em cultivos mixotróficos tanto o metabolismo autotrófico quanto o heterotrófico podem ser usados dependendo da concentração de compostos orgânicos e da intensidade de luz disponível (MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011; ANDRADE; COSTA, 2007; CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004).

A biomassa microalgal apresenta cerca de 50 % (em peso) de carbono na sua composição. Assim, o fornecimento deste nutriente aos cultivos representa um importante componente dos custos de produção. O carbono em cultivo de microalgas pode ser fornecido por adição de bicarbonato ao meio de cultura ou na injeção de dióxido de carbono. Entre os meios de cultivos sintéticos para cultivo de *Spirulina* sp., o mais frequentemente utilizado é o meio Zarrouk, que contém carbono na forma de bicarbonato de sódio, na concentração de 16,8 g.L⁻¹. Porém, fontes alternativas deste nutriente vêm sendo estudadas, como CO₂ de gás de combustão gerado em usinas termelétricas (RADMANN et al., 2011; MORAIS; COSTA, 2007a), CO₂ presente no biogás gerado em processos anaeróbios (KAO et al., 2012, CONVERTI et al., 2009), águas alcalinas (COSTA et al., 2002) e fontes orgânicas, como melaço (ANDRADE; COSTA, 2008), glicerol (CABANELAS et al., 2013) e glicose (CHEIRSILP; TORPEE, 2012).

Carbono inorgânico entra na célula através da assimilação direta de CO₂ pela membrana plasmática. A principal espécie química carbonada é o íon

bicarbonato, que entra na célula por transporte ativo. Conforme a necessidade de consumo celular, o bicarbonato acumulado é reconvertido em CO_2 através da ação da enzima anidrase carbônica e disponibilizado para as reações em cadeia envolvidas na fotossíntese, conforme a Equação 2 (MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011). Este CO_2 é incorporado no ciclo de Calvin produzindo moléculas orgânicas, tais como carboidratos, proteínas e lipídios (KAPLAN; REINHOLD, 1999).



Embora a dissolução do CO_2 em água resulte na acidificação, devido à formação de ácido carbônico (Equação 2), o processo fotossintético de fixação de CO_2 provoca um aumento gradual do pH devido à liberação de OH^- (MORAIS; COSTA, 2007a; GROBBELAAR, 2004).

O CO_2 dissolvido em água gera um sistema tampão bicarbonato-carbonato. Esse sistema tampão é o mais importante, geralmente, presente em águas naturais e processos anaeróbios. A distribuição entre as espécies de carbono inorgânico é uma função do pH. Em valores de pH próximos de 10,5, a espécie predominante é o bicarbonato, enquanto que em valores de pH mais elevados, predomina a formação de carbonato (CO_3^{2-}) (Figura 3).

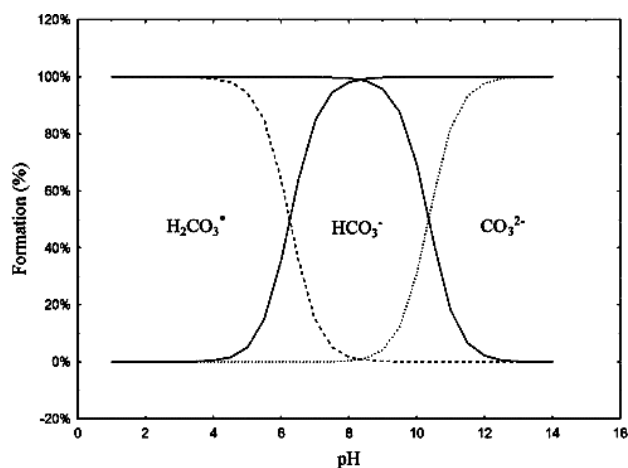
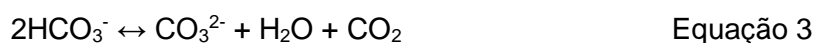


Figura 3 Espécies de carbono inorgânico formadas em função do pH (MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011).

Devido ao sistema tampão bicarbonato-carbonato, o carbono é fornecido para a realização da fotossíntese através das reações descritas nas Equações 3, 4 e 5:



Segundo Carmouze (1994), o carbono, independente da forma que seja fornecido (CO_2 , HCO_3^- ou CO_3^{2-}), uma vez dissolvido no meio de cultivo aquoso, participa do equilíbrio químico $\text{CO}_{2(\text{aq})} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_3^{2-}$, onde a soma de todas as espécies representa o carbono inorgânico total dissolvido. A concentração de cada espécie química no equilíbrio pode ser determinada através da alcalinidade total e do pH.

A concentração de CO_2 em equilíbrio é cerca de 650 vezes maior que a de H_2CO_3 . Assim, a soma das concentrações das duas espécies é representada por CO_2 . Nas Equações 6 e 7 tem-se as constantes de equilíbrio para as reações do sistema $\text{CO}_2 \leftrightarrow \text{H}_2\text{O} \xrightleftharpoons{K_1} \text{HCO}_3^- \xrightleftharpoons{K_2} \text{CO}_3^{2-}$.

$$K_1 = \frac{[\text{H}^+][\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2]} \quad \text{Equação 6}$$

$$K_2 = \frac{[\text{H}^+][\text{CO}_3^{2-}]}{[\text{HCO}_3^-]} \quad \text{Equação 7}$$

A 30 °C as constantes de equilíbrio recebem os valores $K_1 = 4,709 \cdot 10^{-7}$ e $K_2 = 5,128 \cdot 10^{-11}$. As concentrações de cada espécie (Eq. 8, 9, e 10) podem ser calculadas a partir das frações de ionização e da concentração total de carbono inorgânico (CT).

$$[\text{CO}_2] = \alpha_0 * C_T \quad \text{Equação 8}$$

$$[\text{HCO}_3^-] = \alpha_1 * C_T \quad \text{Equação 9}$$

$$[\text{CO}_3^{2-}] = \alpha_2 * C_T \quad \text{Equação 10}$$

As frações de ionização (α_0 , α_1 e α_2) de cada espécie química no equilíbrio são obtidas como uma função do pH e das constantes de ionização K_1 e K_2 (Eq. 11, 12 e 13).

$$\alpha_0 = \frac{1}{\left(1 + \left(\frac{K_1}{[H^+]}\right) + \frac{K_1 K_2}{[H^+]^2}\right)} \quad \text{Equação 11}$$

$$\alpha_1 = \frac{1}{\left(1 + \left(\frac{[H^+]}{K_1}\right) + \frac{K_2}{[H^+]}\right)} \quad \text{Equação 12}$$

$$\alpha_2 = \frac{1}{\left(1 + \left(\frac{[H^+]^2}{K_1 K_2}\right) + \frac{[H^+]}{K_2}\right)} \quad \text{Equação 13}$$

A concentração total de carbono inorgânico dissolvido (CT) não é um dado disponível, mas pode ser substituído pela alcalinidade total (Equação 14).

$$\text{Alc}_C = [HCO_3^-] + 2 * [CO_3^{-2}] = \alpha_1 * C_T + 2\alpha_2 * C_T \quad \text{Equação 14}$$

A concentração de cada espécie química de carbono no equilíbrio é obtida a partir das Equações 15, 16 e 17. A proporção entre as espécies em função do pH é apresentada na Figura 3.

$$[CO_2] = \alpha_0 * \frac{\text{Alc}_C}{(\alpha_1 + 2\alpha_2)} \quad \text{Equação 15}$$

$$[HCO_3^-] = \alpha_1 * \frac{\text{Alc}_C}{(\alpha_1 + 2\alpha_2)} \quad \text{Equação 16}$$

$$[CO_3^{-2}] = \alpha_2 * \frac{\text{Alc}_C}{(\alpha_1 + 2\alpha_2)} \quad \text{Equação 17}$$

2.4.3 Temperatura e luminosidade

A temperatura é um dos fatores que mais afeta a taxa metabólica dos organismos, apresentando grande influência na produção de biomassa, proteínas, lipídios e compostos fenólicos a partir de microalgas (COLLA et al., 2002). A temperatura do ambiente deve ser escolhida em função das necessidades das espécies presentes e da finalidade dos cultivos (LOURENÇO, 2006).

O crescimento microalgal depende diretamente da temperatura, exigindo um valor ideal para o máximo crescimento celular (BITOG et al., 2011). Segundo Belay (1997), a temperatura ótima para o crescimento de *Spirulina* está na faixa de 30 a 38 °C e este valor pode variar entre diferentes cepas. A taxa de crescimento da microalga *Spirulina* a 18 °C é somente 46 % da taxa de crescimento a 20 °C. No entanto, quando a microalga é submetida a temperaturas entre 22-32 °C a taxa de crescimento dobra, permanecendo a mesma até 40 °C. Porém, acima desta temperatura, essa taxa diminui drasticamente (RICHMOND, 1986).

A temperatura é um fator importante na dissociação de carbono no meio e na disponibilidade de carbono para a fotossíntese (KOMMAREDDY; ANDERSORN, 2005). Além disso, a temperatura apresenta maior influência na respiração e fotorrespiração celular do que na fotossíntese. No entanto, se o CO₂ ou a luz for limitante para a realização da fotossíntese, a influência da temperatura pode ser insignificante (BITOG et al., 2011; PULZ, 2001).

Colla et al. (2007) verificaram que cultivos de *Spirulina platensis* realizados a 35 °C apresentaram efeito negativo nos parâmetros cinéticos de crescimento da microalga, porém, foram obtidas maiores concentrações de lipídios e proteínas em relação a cultivos realizados a 30 °C.

Segundo Vonshak (1997), em baixas temperaturas ocorre um decréscimo da atividade fotossintética nas células de microalga *Spirulina*. Segundo o mesmo autor, o ótimo para o crescimento microalgal é 35 °C, porém, acima deste valor a concentração de pigmentos fotossintéticos e de proteínas em geral decresce, enquanto aumentam as concentrações de carboidratos e lipídios.

A intensidade de luz em cultivo de microalgas é um dos fatores mais importantes, pois está relacionada à atividade fotossintética (ONCEL; SUKAN, 2008) e exerce pouca influência no metabolismo respiratório, envolvendo a via glicolítica, o ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa mitocondrial (CHANG; YANG, 2003). A *Spirulina*, assim como outras microalgas fotoautotróficas, dependem da luz como a principal fonte de energia.

De acordo com a intensidade e qualidade da fonte luminosa, o conteúdo de pigmentos das microalgas pode sofrer variações (FÁBREGAS et al., 2001). Olaizola et al. (1991) submeteram cepas de *Spirulina* a diferentes intensidades luminosas e observaram que a quantidade de carotenoides era aumentada quando se aplicavam altas intensidades. Segundo Goodwin (1980); Siefermann (1980) e Krinsky

(1979) o aumento da concentração de carotenoides está relacionado a uma adaptação necessária da célula a fim de proteger as moléculas de clorofila.

A intensidade de luz no cultivo está diretamente relacionada com a densidade celular no meio. A presença de maiores concentrações celulares resultará na necessidade de altas intensidades luminosas na cultura (FAN et al., 2007). Cada espécie microalgal necessita de uma faixa ótima de luminosidade e quando esta se apresenta acima da requerida para a realização da fotossíntese, ocorre a diminuição da capacidade fotossintética (ONCEL; AKPOLAT, 2006; CAMACHO et al., 2003). Este fenômeno é conhecido como fotoinibição.

Um dos principais problemas encontrados em cultivos de microalgas é o fenômeno conhecido como fotolimitação. Ocorre devido à limitação do crescimento em culturas densas, onde ocorre sombreamento provocado pelas próprias células a medida que há o crescimento, impedindo que parte da cultura receba luz (MOHANTY et al., 1997). Vonshak et al. (1982) encontraram 0,40-0,50 g.L⁻¹ como ótima concentração celular para a máxima eficiência fotossintética em cultivos de *Spirulina* e nesta concentração é estimado que a 2-3 cm da superfície cerca de 80 % das células seja exposta a escuridão completa durante alguns instantes.

Sistemas de culturas microalgais podem ser iluminados pela luz artificial, luz solar ou ambas. Cultivos em larga escala, a melhor fonte de luz é a solar, no entanto, essa fonte de luz não pode ser controlada (BITOG et al., 2011). Geralmente são sistemas de grandes áreas superficiais, que incluem tanques abertos, placa plana e horizontal, biorreatores tubulares horizontais na forma de serpentina e biorreatores verticais (CHISTI, 2007a). Em escala laboratorial, a iluminação é realizada artificialmente, através de lâmpadas fluorescentes, halógenas, incandescentes e diodos emissores de luz (LEDs), as quais foram encontradas como o sistema mais eficiente e econômico de iluminação (KOMMAREDDY; ANDERSON, 2003).

2.5 Biorreatores para cultivo de microalgas

Biorreator é definido como um sistema em que uma conversão biológica é conduzida. Fotobiorreatores são usados para cultivar organismos fotoautotróficos e conduzir reações fotobiológicas (MATA et al., 2010).

Alguns critérios devem ser considerados no projeto de um fotobiorreator com o objetivo de obter elevadas produtividades e eficiências fotossintéticas. Os principais aspectos incluem a relação superfície e volume do fotobiorreator, inclinação,

sistema de mistura, prevenção de crescimento das microalgas nas paredes, controle de temperatura e tipo de material empregado na construção dos biorreatores (MORAIS; COSTA, 2008b; MOLINA et al., 2004).

O fator crítico no design de biorreatores é a superfície de exposição à luz por unidade de volume. A seleção do fotobiorreator depende da sua habilidade de maximizar a produtividade e a eficiência fotossintética. Cada tipo de fotobiorreator possui vantagens e desvantagens em termos de potencial utilização da energia solar, transferência de massa efetiva de oxigênio e dióxido de carbono, limpeza e aumento de escala (SUALI; SARBATLY, 2012).

O cultivo microalgal pode ser realizado em sistemas abertos ou fechados. Os sistemas abertos podem ser divididos em águas naturais (lagos e lagoas) ou tanques artificiais. Geralmente os biorreatores utilizados para o cultivo comercial de microalgas, como *Chlorella* e *Spirulina* em grande escala são abertos, do tipo *raceway*. Biorreator do tipo *raceway* é composto por canais que permitem a recirculação do cultivo. Geralmente essa recirculação é realizada por um motor com pás rotativas. Devido esse tipo de biorreator apresentar grande área de exposição à luz, diversos materiais podem ser utilizados na construção, como concreto e até mesmo terra compactada, que podem ser revestidos com material plástico. Apesar do menor custo, esse tipo de biorreator apresenta baixa produtividade de biomassa, baixo nível de controle, ocupam grandes áreas e não podem ser operados por longos períodos, devido a problemas de contaminação. Além disso, podem apresentar zonas de estagnação da cultura, onde as células não recebem luz, afetando o processo fotossintético e baixando a absorção de CO₂, bem como o crescimento celular (HO et al., 2011; MATA et al., 2010; SCHENK et al., 2008; CHISTI, 2007a; PULZ, 2001).

Os fotobiorreatores fechados têm sido testados para cultivo de biomassa microalgal nas seguintes configurações: sistemas tubulares verticais, horizontais e placas paralelas, os quais apresentam apropriada distribuição de luz (PIRES et al., 2012; HO et al., 2011; MATA et al., 2010; MORAIS; COSTA, 2008b). As vantagens dos fotobiorreatores fechados sobre os sistemas abertos são o melhor controle sobre as condições de cultivo como pH, agitação, temperatura, concentrações de CO₂ e O₂, maior contato entre a luz e o cultivo, menor evaporação da água do meio de cultivo e ocupam menor área que o *raceway* (PIRES et al., 2012; MORAIS; COSTA, 2008b; 2007a; ONO; CUELLO, 2004). Além disso, os fotobiorreatores fechados reduzem os problemas de contaminação das culturas por outros micro-organismos e possibilitam sustentar cultivos com concentrações celulares e produtividade de biomassa elevada

(HO et al., 2011; MATA et al., 2010; MORAIS; COSTA, 2007a). Porém, as principais limitações são a possibilidade de superaquecimento, acúmulo de oxigênio, difícil escalonamento e altos custos de construção e manutenção. O Quadro 2 apresenta as vantagens e desvantagens dos cultivos realizados em sistemas abertos e fechados.

Quadro 2 Comparação entre cultivos realizados em sistemas abertos e fechados.

Parâmetro	Sistemas abertos	Sistemas Fechados
Capacidade de fixar CO ₂	Baixo	Alto
Produtividade de biomassa	Baixo	Alto
Taxa específica de crescimento	Baixo	Alto
Risco de contaminação	Extremamente alto	Baixo
Perdas por evaporação	Alto	Baixo
Eficiência fotossintética	Alto	Baixo
Controle do processo	Difícil	Fácil
Custos de operação	Baixo	Alto
Aumento de escala	Fácil	Difícil
Espaço necessário	Alto	Baixo
Concentração biomassa	Baixo	Alto

Fonte: Adaptado de Pires et al. (2012) e Ho et al. (2011).

Em termos de produção global a *Spirulina* é a microalga mais importante e produzida geralmente em sistemas abertos. Esta microalga é produzida em tanques tipo *raceway* no Lago Texcoco no México, nos Estados Unidos (Hawaii, Califórnia), China, Taiwan e Japão. A microalga *Chlorella* é produzida em grande escala na Ásia (Japão, Taiwan, China) em biorreatores tipo *raceway* ou circular, na República Checa e Bulgária, em biorreatores com superfície inclinada e mais recentemente em biorreatores tubulares na Alemanha (PULZ, 2001).

2.6 Lipídios e ácidos graxos obtidos da biomassa microalgal e suas aplicações

Nos sistemas biológicos, os lipídios funcionam como componentes de membrana, produtos de reserva, metabólitos e como fonte de energia sendo que grande parte dos lipídios é constituída de ácidos graxos. De acordo com os seus constituintes, os lipídios se classificam em fosfolipídios, glicolipídios e triacilgliceróis. Os triacilgliceróis (TAG) podem ser considerados a principal fonte energética da maioria dos organismos (LEHNINGER, 2004).

Os lipídios são alguns dos principais componentes das microalgas e desempenham um importante papel nutricional como fonte de ácidos graxos essenciais. Esses ácidos graxos devem ser adicionados a dieta já que não podem ser sintetizados pelo metabolismo humano e contribuem para prevenção e atenuação de problemas cardíacos, controle de colesterol, ativação do sistema imunológico e crescimento celular. Além disso, os ácidos graxos de microalgas podem ser usados para produção de biodiesel. As vantagens do uso de microalgas para obter ácidos graxos para produção de biodiesel são sua alta produtividade, contínua produção, tolerância à variação das condições ambientais, sistema fotossintético que sustenta a cultura e uso de águas residuais ou salobras (BENEMANN, 1997).

Os ácidos graxos, que são os componentes hidrocarbônicos dos lipídios, são obtidos da hidrólise das gorduras e óleos. Esses ácidos graxos que ocorrem nas gorduras contém número par de átomos de carbono, por que eles são sintetizados em unidades de 2 carbonos, e são derivados de cadeia linear. A cadeia pode ser saturada ou insaturada. Os ácidos graxos saturados são preocupantes, pois elevam o nível de LDL e baixam o de HDL (MURRAY, 2002).

Ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) apresentam em sua cadeia três ou mais duplas ligações, contendo 18 ou mais carbonos e são classificados em ω -6 e ω -3, dependendo da posição da última ligação dupla próxima à extremidade metílica do ácido graxo. Estudos têm mostrado os benefícios na saúde de manter um equilíbrio dietético apropriado entre as duas formas (CHI et al., 2009).

PUFAs, em particular o ácido eicosapentaenoico (EPA: 22:5, ω -3) e o ácido docosahexaenoico (DHA: 22:6, ω -3) apresentam a última dupla ligação localizada no terceiro átomo de carbono do metil terminal e a configuração de todas as duplas ligações são *cis*. Além disso, são reconhecidos como componentes nutritivos extremamente importantes e ajudam a impedir doenças cardiovasculares. Assim como os ácidos graxos essenciais, a importância do EPA está relacionada aos eicosanoides.

Os eicosanoides dos ácidos graxos EPA e araquidônico (AA) são diferentes estruturalmente e funcionalmente e podem apresentar efeitos antagônicos, portanto é necessário que haja um balanço de EPA/AA para prevenir essa disfunção. O DHA, junto com o ácido araquidônico (ARA: 20:4, ω -6) são incorporados em alimentos infantis em muitos países devido o desenvolvimento neural e da retina (SINCLAIR et al., 2005; WEN; CHEN, 2003). Na Tabela 2 pode-se observar o conteúdo lipídico de algumas microalgas.

Tabela 2 Concentrações de óleo encontradas em diferentes espécies de microalgas.

Microalga	Conteúdo lipídico (%, massa seca)
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella vulgaris</i>	10-45
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16-37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochysis</i> sp.	25-33
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia</i> sp.	45-47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30
<i>Scenedesmus obliquus</i>	11-25
<i>Spirulina platensis</i>	11
<i>Spirulina máxima</i>	6-7
<i>Synechococcus</i> sp.	11
<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23

Fonte: Adaptado de Lam; Lee (2013); Lam et al. (2012) e Chisti (2007a).

Muitas microalgas são utilizadas para produção de alimentos devido a estas produzirem diversas substâncias como vitaminas, sais minerais, pigmentos, lipídios e ácidos graxos (MACEDO; ALEGRE, 2001). Dependendo da espécie, as microalgas produzem diferentes tipos de lipídios, hidrocarbonetos e outros óleos complexos (GUSCHINA; HARWOOD, 2006; METZGER; LARGEAU, 2005; BANERJEE et al., 2002). A composição e o perfil de ácidos graxos extraídos da biomassa microalgal podem ser influenciados por fatores como composição do meio, concentração de nitrogênio e dióxido de carbono, temperatura e intensidade luminosa (GUZMAN et al., 2010; OTA et al., 2009; COLLA et al., 2004).

Segundo Piorreck, et al. (1984), o nitrogênio tem uma forte influência no metabolismo de lipídios e ácidos graxos em várias algas. A deficiência de nitrogênio leva ao acúmulo de gordura. Recentes estudos envolvendo várias algas revelam que o metabolismo de ácidos graxos e lipídios é influenciado pelo conteúdo de nitrogênio do meio. Foi observado que a baixas concentrações de nitrogênio essas algas têm uma tendência a sintetizar lipídios neutros e ácidos graxos com um baixo grau de insaturação. Em altas concentrações de nitrogênio a alga sintetiza predominantemente lipídios polares como os monogalactosil diacilglicerol, digalactosil diacilglicerol entre outros. Em seus estudos, Piorreck et al. (1984) constataram que em baixas concentrações de nitrogênio, todas as algas verdes contêm relativamente grandes quantidades de lipídios totais (44-66 % do peso seco). Essas quantidades diminuem significativamente com o aumento da concentração de nitrogênio.

A fonte de nitrogênio, independente de qual seja, é incorporada no micro-organismo como nitrogênio orgânico para a síntese de proteínas. Desta forma, a diminuição desta fonte acarretaria na diminuição da síntese de aminoácidos e, conseqüentemente, do teor proteico (REINEHR, 2003).

Recentemente as microalgas vêm em destaque como um ótimo recurso para a bioenergia renovável, principalmente biodiesel, não só pelas altas taxas de remoção do dióxido de carbono da atmosfera, mas também por apresentarem teores mais elevados de lipídios na biomassa em relação aos vegetais (HALIM et al., 2012; SINGH; SINGH, 2010). Os óleos encontrados nas microalgas possuem características físico-químicas e químicas similares aos óleos vegetais. A sua extração pode ser realizada com solventes, exatamente como na indústria alimentícia. Estudos já mostraram que o rendimento de óleo depende da cultura e pode chegar a 85 %. De modo geral, na composição de lipídios produzidos por microalgas encontram-se ácidos graxos tais como: C14:0 (mirístico), C14:1 (miristoleico), C16:0 (palmítico), C16:1

(palmitoleico), C18:1 (oleico), C18:2 (linoleico), C18:3 (linolênico) e C20:5 (eicosapentaenoico) (QUINTELLA et al., 2009).

Radmann e Costa (2008) cultivaram as microalgas *Chlorella vulgaris* LEB-106 e *Spirulina* LEB-18 com os gases CO₂, SO₂ e NO e observaram que houve um incremento de ácidos graxos na biomassa, podendo estas serem utilizadas tanto para a alimentação, quanto para produção de biocombustíveis. Morais e Costa (2008a) relataram que, dependendo do gênero e espécie de microalga cultivada, a concentração de CO₂ e a adição de bicarbonato de sódio no meio podem ser variadas de modo a incrementar a biossíntese de ácidos graxos saturados ou insaturados, de acordo com a utilização que se pretende dar à biomassa formada. Os autores ainda reportam que, para a produção de biodiesel, em que são desejadas altas concentrações de ácidos graxos saturados, a microalga *Spirulina* sp., quando cultivada com 18 % de CO₂ apresentou 81,6 % de ácidos graxos saturados. Yoo et al. (2010) cultivaram as microalgas *Botryococcus braunii*, *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus* sp. adicionando CO₂ sintético e real e observaram que ocorreu um aumento na concentração lipídica na biomassa de *Botryococcus braunii*, obtendo-se até 55 % de ácido oleico entre os ácidos graxos avaliados.

2.7 Digestão anaeróbia

Digestão anaeróbia é o bioprocesso pelo qual a matéria orgânica na ausência de O₂ sofre uma série de reações sequenciais que são dependentes entre si como requisitos de energia (DHAKED et al., 2010; SCHMIDELL et al., 2007). Cada etapa é realizada por uma classe específica de micro-organismos que culminam com a formação de CH₄ e CO₂ (SCHMIDELL et al., 2007). A Figura 4 mostra a sequência de reações realizadas pelos micro-organismos.

A primeira etapa, chamada de hidrólise, as bactérias anaeróbias e anaeróbias facultativas denominadas formadoras de ácidos ou fermentativas dos gêneros *Clostridium*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Escherichea* hidrolisam polímeros complexos (polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, lipídios) em moléculas menores como açúcares, aminoácidos, ácidos graxos e glicerol (SCHMIDELL et al., 2007). Em geral as bactérias são incapazes de utilizar material orgânico particulado sem antes ocorrer a quebra deste material em unidades menores. A hidrólise da matéria orgânica insolúvel é necessária para converter estes materiais a um tamanho e forma que possam passar através da parede da célula bacteriana para utilização

como fonte de nutrientes ou energia (KIM et al., 2003). O processo de hidrólise requer a interferência das chamadas exo-enzimas que são excretadas pelas bactérias fermentativas. As proteínas são degradadas por meio de polipeptídios para formar aminoácidos. Os carboidratos se transformam em açúcares solúveis e os lipídios são convertidos em ácidos graxos de cadeia longa.

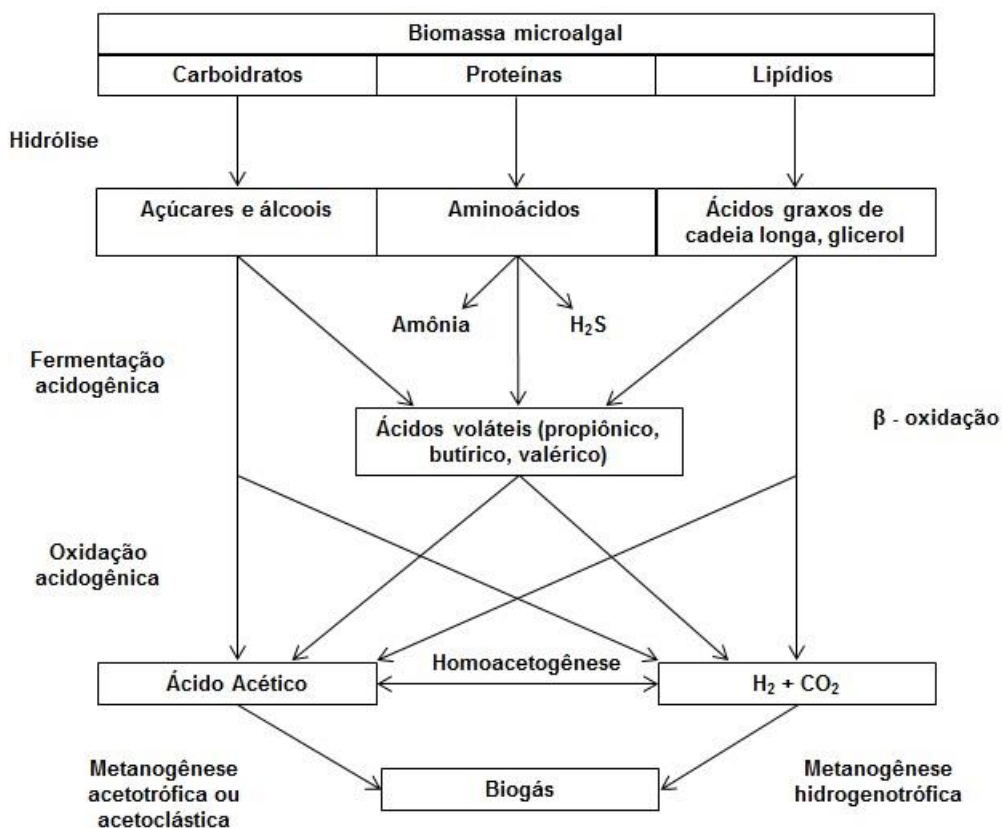


Figura 4 Etapas da transformação da biomassa para produção de biogás.

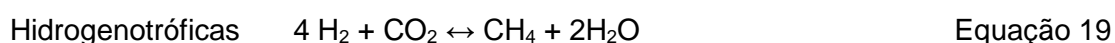
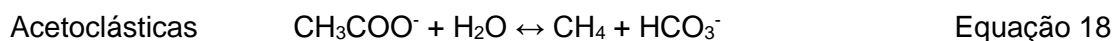
Fonte: Adaptado de Andrade (2009).

Na segunda etapa, a acidogênese, os produtos solúveis da hidrólise são metabolizados em diversos compostos mais simples no interior das células fermentativas, como *Clostridium*, e depois excretados. Tais compostos incluem ácidos graxos voláteis, alcoóis, ácido láctico, gás carbônico, hidrogênio, amônia e sulfeto de hidrogênio, além de novas células bacterianas.

Em seguida, na terceira etapa chamada acetogênese, as bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio, como *Syntrobacter*, *Syntrophomonas* e *Acetobacterium*, oxidam os produtos gerados na fase acidogênica em substrato para as bactérias metanogênicas. As bactérias acetogênicas convertem os compostos

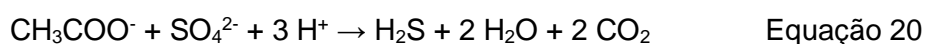
intermediários (butirato, propionato, etc) em acetato, dióxido de carbono e hidrogênio. Estas reações ocorrem naturalmente nos biorreatores anaeróbios em virtude da interação entre algumas espécies (AQUINO; CHERNICHARO, 2005).

A metanogênese consiste na produção de metano pelas bactérias metanogênicas acetoclásticas ou hidrogenotróficas, que convertem acetato, H₂ e CO₂ em CH₄ e CO₂. As bactérias acetoclásticas, como *Methanococcus* e *Methanotrix* (ou acetotróficas), produzem metano por meio da descarboxilação do acetato (Equação 18). As bactérias hidrogenotróficas, como *Methanospirillum*, *Methanobacterium* e *Methanobrevibacter*, convertem dióxido de carbono e hidrogênio a metano (Metanogênese hidrogenotrófica, Equação 19) (SCHMIDELL et al., 2007). Os micro-organismos acetoclásticos são os mais importantes, pois são os grandes responsáveis pela remoção da matéria orgânica existente no substrato, convertendo o acetato sintetizado na fase acetogênica em metano. Os micro-organismos hidrogenotróficos sintetizam o metano através do formiato, gás carbônico e hidrogênio, no caso dos dois últimos, em um processo conhecido como respiração anaeróbia (AQUINO; CHERNICHARO, 2005). Segundo Evans e Furlong (2003) a produção de metano envolvendo o sistema ácido/acetato é responsável por cerca de 75 % do biogás produzido, sendo o restante via dióxido de carbono e hidrogênio.



Dependendo da composição química do substrato, o processo pode ter ainda outra fase, a sulfetogênese em que há a redução de sulfato e formação de sulfetos. Durante este processo, sulfato, sulfito e outros compostos sulfurados são reduzidos a sulfeto, devido à ação de bactérias redutoras de sulfato.

A redução de sulfatos em biorreatores anaeróbios resulta na formação de gás sulfídrico ou ácido sulfídrico (H₂S), sendo este um composto inibidor para bactérias metanogênicas. As bactérias sulforredutoras possuem a característica de inibir ou favorecer a metanogênese, sendo que esta pode ser inibida quando as concentrações de sulfato são elevadas, pois as bactérias redutoras de sulfato competem com as metanogênicas pelo mesmo substrato, como o hidrogênio e o acetato, representada pela Equação 20 (CHERNICHARO, 1997).



Para um bom desempenho no processo anaeróbio, é imprescindível que os compostos orgânicos sejam convertidos em precursores imediatos do metano. Caso essa conversão não aconteça, a metanogênese não ocorrerá, acarretando no acúmulo dos produtos da fase de hidrólise e fermentação no reator, comprometendo o processo. Além disso, é importante que o biorreator anaeróbio seja inoculado com um lodo rico em micro-organismos metanogênicos, de alta qualidade, melhorando consideravelmente o sistema em relação à partida do mesmo (FORESTI, 2002).

O bioprocesso de digestão anaeróbia é utilizado para o tratamento de efluentes agroindustriais e municipais. Substratos para a digestão anaeróbia normalmente utilizados envolvem efluentes domésticos, excrementos de animais e resíduos sólidos, como ervas daninhas, resíduos de frutas e vegetais, folhas ou madeira. Atualmente pesquisadores vêm estudando digestão anaeróbia de biomassa de microalgas (ZAMALLOA et al., 2012; RAS et al., 2011; MUSSGNUM et al., 2010; SIALVE et al., 2009; COSTA et al., 2008), resíduos urbanos (KIM et al., 2011), resíduos industriais (RANI et al., 2012; AGLER et al., 2010) e dejetos suínos e bovinos (ALVAREZ; LIDÉN, 2009; AMON et al., 2007).

2.8 Biomassa metanogênica

A biomassa metanogênica é composta por micro-organismos presentes em alta concentração em reatores anaeróbios, aderidos uns aos outros, formando uma espécie de grânulos sedimentáveis, denominada de lodo anaeróbio. Além da forma granular, a aglomeração pode ocorrer na forma de flocos ou filmes. O grânulo anaeróbio é definido como uma biomassa com propriedades adequadas para sistemas anaeróbios, onde ocorre a metanogênese. Essa biomassa apresenta geralmente formato esférico, superfície bem definida, com diâmetros em torno de 5 mm, observada a olho nu (SCHMIDT; AHRING, 1996).

Os grânulos são formados por substâncias poliméricas extracelulares, principalmente carboidratos e proteínas (LIU et al., 2004), o que lhes confere resistência mecânica, são densos e sedimentam facilmente. A estrutura granular facilita a transferência de massa entre os micro-organismos, principalmente entre as bactérias produtoras e consumidoras de hidrogênio (DE BOK et al., 2004) e protege os mais sensíveis, como as bactérias metanogênicas, que se dispõem no interior do grânulo.

A flora microbiana presente nos grânulos é formada por diferentes grupos de micro-organismos funcional e filogeneticamente diferentes, que realizam uma série de processos complexos interligados paralela e sequencialmente. Os micro-organismos metanogênicos, componentes microbianos importantes dos grânulos anaeróbios, são afetados diretamente pela temperatura de operação. Quando a temperatura é diminuída para valores abaixo de 30 °C, a atividade dos micro-organismos metanogênicos é reduzida. Esta é a principal razão pela qual os reatores mesofílicos devem ser operados em temperaturas entre 30 °C a 35 °C para que se obtenha um bom desempenho no processo (LIU; TAY, 2004).

Reatores anaeróbios para produção de biogás contendo grânulos metanogênicos formam camadas densas desses grânulos, praticamente estacionárias no fundo do reator. Para um bom desempenho do processo é necessário a realização de agitação desses grânulos para evitar a formação de zonas mortas e para proporcionar o contato entre o substrato e a biomassa metanogênica (DI MONACO, 2007).

Veronez et al. (2005) estudaram as mudanças nas características dos grânulos presentes em biorreatores anaeróbios em escala de bancada, operados em modo contínuo, batelada e batelada alimentada. Os grânulos foram caracterizados pelas propriedades físicas e microbiológicas como tamanho médio, tempo de sedimentação e microscopia óptica e de fluorescência. Os ensaios em batelada e batelada alimentada foram realizados em reator anaeróbio operado em batelada sequencial (ASBR), utilizando tempos de ciclo de agitação de 8 e 6 h, respectivamente. Os ensaios realizados em modo contínuo foram realizados em biorreator de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) sem e com recirculação da fase líquida, utilizando-se tempos de retenção hidráulica de 8, 6 e 4 h. Os resultados indicaram que os grânulos do biorreator operado em batelada e batelada sequencial, com ou sem agitação mecânica, não sofreram mudanças físicas nem microbiológicas. No entanto, em função do tempo de operação, os grânulos no biorreator UASB formaram aglomerados e acúmulo de material viscoso, de provável origem microbiana. Dessa forma, os resultados indicaram características positivas do biorreator operado em modo batelada e batelada alimentada em relação ao modo de operação contínua, referente à estabilidade das características dos grânulos.

2.9 Biorreatores anaeróbios

Inicialmente os reatores anaeróbios foram concebidos para tratar resíduos semissólidos como estrume de animais, lixo doméstico e para estabilização de lodos provenientes dos tratamentos primários e secundário de efluentes. Esses reatores são constituídos de tanques simples, sem recirculação de lodo ou com agitação. São chamados de reatores convencionais, de baixa taxa.

A partir da década de setenta surgiu uma nova concepção de reatores anaeróbios para tratamento de efluentes líquidos, especialmente para tratamento de águas residuárias industriais. Eles se baseiam no princípio de acúmulo de biomassa dentro do reator, pela retenção ou recirculação. Atualmente existem vários tipos de reatores, como: reatores de leito granular expandido e fluidificado, reatores de leito fixo, reatores com recirculação interna, reatores de membrana e os reatores em batelada sequencial (RODRIGUES et al., 2006).

2.9.1 Biorreator anaeróbio operado em batelada sequencial (ASBR)

Os reatores anaeróbios operados em batelada sequencial (ASBR – Anaerobic Sequencing Batch Reactor), desenvolvidos por Dague et al. (1992) fazem parte das configurações recentes de sistemas anaeróbios de tratamento de efluentes. Este tipo de biorreator vem sendo amplamente estudado como alternativa aos sistemas contínuos, com algumas vantagens, como a eliminação da sedimentação secundária, maior retenção de biomassa, fácil operação e maior flexibilidade (RODRIGUES et al., 2003; SHIZAS; BAGLEY, 2002).

Segundo Ndon e Dague (1997), a retenção de biomassa granular é um importante aspecto no ASBR, possibilitando maior remoção de sólidos orgânicos com baixos tempos de retenção hidráulica. A característica básica do ASBR é de ser preenchido com substrato no início e esvaziado ao final do tempo previsto, repetindo-se a operação com nova batelada. O conteúdo no interior do reator é misturado com os grânulos metanogênicos, permitindo maior contato do substrato com os micro-organismos.

A operação convencional do ASBR é efetuada em um único reator, que compreende basicamente as seguintes etapas: alimentação com o substrato a ser digerido, tempo de reação, decantação do lodo anaeróbio e retirada do efluente líquido (Figura 5).

Na etapa de alimentação, um volume pré-determinado de substrato é adicionado no biorreator e misturado com os grânulos metanogênicos presentes no meio, para que na etapa seguinte, de reação, a matéria orgânica adicionada seja convertida em metano. Na etapa de decantação, a agitação é interrompida, permitindo que o próprio biorreator funcione como um decantador, permitindo a separação dos sólidos e do efluente líquido que será retirado na etapa seguinte. O volume de efluente líquido retirado é geralmente igual ao volume adicionado na alimentação. Inicia-se então um novo ciclo e, dessa maneira, a frequência dos ciclos dependerá do tempo gasto em cada etapa.

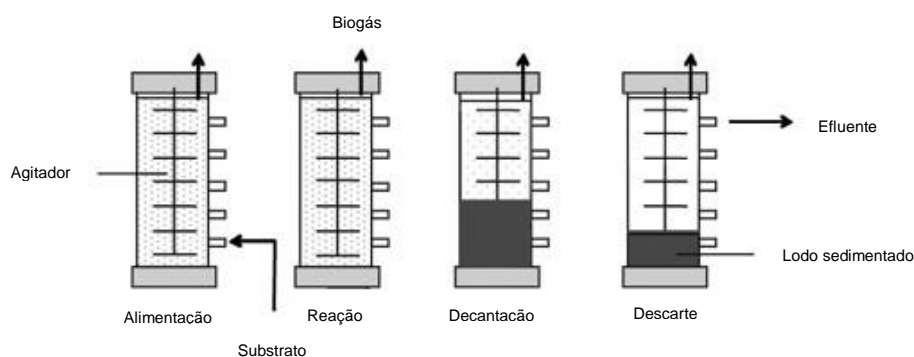


Figura 5 Etapas do ciclo operacional do reator anaeróbico operado em batelada sequencial (ASBR) (DAGUE et al., 1992).

2.10 Fatotes físico-químicos na digestão anaeróbia

2.10.1 Temperatura

A digestão anaeróbia está diretamente relacionada com a temperatura no processo, a qual é normalmente pré-definida e constante. No entanto, existem situações em que os biorreatores estão sujeitos a variações climáticas. Geralmente, biorreatores em grande escala de produção de biogás encontram-se propensos a flutuações de temperaturas durante o ano, principalmente em países com clima temperado (ALVAREZ; LIDÉN, 2008).

O processo de digestão anaeróbia é normalmente classificado em 3 diferentes temperaturas, as psicrófilas (< 20 °C), mesófilas (20-40 °C) e as termófilas (> 40 °C) (EL-MASHAD et al., 2004). A maioria das espécies de bactérias metanogênicas ocorre na faixa mesófila e na termófila (VAN HAANDEL; LETTINGA, 1994). Apesar da ocorrência de formação de metano variar de 0 a 97 °C (ZEEMAN et

al., 1988), a temperatura do processo deve ser controlada para que não afete e não prejudique o desempenho das bactérias metanogênicas. Embora a temperatura de 35 °C seja considerada ótima para tal etapa, mesmo não sendo este o nível ótimo para outras fases, como a hidrólise e a acidogênese (30 °C), alguns estudos relatam que 35 °C tem conduzido aos melhores resultados (ALVAREZ et al., 2006; KAPARAJU; RINTALA, 2003; OMER; FADALLA, 2003).

A temperatura influencia no metabolismo bacteriano, na atividade enzimática, nos equilíbrios químicos em meio líquido e na solubilidade de substratos, principalmente lipídios (ANDRADE, 2009). Segundo Dhaked et al. (2010) as variações da temperatura durante a metanogênese não afetam apenas a estrutura dos micro-organismos, mas também proporcionam mudanças na via de degradação da matéria orgânica. A velocidade de hidrólise é altamente dependente da temperatura, uma vez que a hidrólise é uma reação química catalisada por enzimas, sensíveis à temperatura. A temperatura de operação do biorreator tem um efeito substancial na conversão da matéria orgânica em biogás (MAHMOUD et al., 2003).

A temperatura influencia não somente os micro-organismos formadores de metano, mas também os formadores de ácidos. Portanto, flutuações na temperatura podem ser vantajosas para certos grupos e desvantajosas para outros. Desta forma, a alteração na atividade de diferentes grupos de micro-organismos formadores de ácidos voláteis resulta em alteração na quantidade relativa de ácidos orgânicos e álcoois, os quais são utilizados direta ou indiretamente como substrato, afetando o desempenho global do biorreator (GERARDI, 2003).

A atividade dos micro-organismos formadores de metano é afetada mais intensamente pela variação na temperatura que em relação à temperatura de operação constante. Para temperaturas inferiores a 32 °C deve-se analisar periodicamente a relação entre os ácidos voláteis e alcalinidade (GERARDI, 2003).

Um dos maiores problemas encontrados nos biorreatores anaeróbios operados sob baixa temperatura é a baixa produção de biogás, o que pode resultar em baixa intensidade de mistura e um deficiente contato entre a biomassa e o substrato. Segundo Lettinga et al. (2001), sob condições psicrófilas, as reações químicas e biológicas ocorrem mais lentamente do que sob condições mesófilas. A maioria das reações de biodegradação da matéria orgânica requer maior quantidade de energia para ocorrer a baixas temperaturas (< 20 °C) que sob temperaturas ótimas (35 °C). Entretanto, algumas reações, como redução hidrogenotrófica de sulfato, produção hidrogenotrófica de metano e formação de acetato a partir de hidrogênio e

bicarbonato, conforme mostrado no Quadro 3, liberam mais energia em menores temperaturas.

Quadro 3 Algumas conversões anaeróbias com os respectivos valores de Energia Livre de Gibbs.

Reações	ΔG (kJ.mol ⁻¹)	
	37 °C	10 °C
$4 \text{ H}_2 + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{HS}^- + 4\text{H}_2\text{O}$	-148,2	-157,1
$4 \text{ H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3 \text{ H}_2\text{O}$	-131,3	-140,9
$4 \text{ H}_2 + 2 \text{ HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + 4 \text{ H}_2\text{O}$	-98,7	-111,8

Fonte: Lettinga et al. (2001).

2.10.2 pH

Durante os processos que ocorrem na digestão anaeróbia, alguns fatores devem ser considerados muito importantes, dentre eles a fermentação ácida, que tende a causar o abaixamento do valor do pH. Nessa etapa, na qual ocorre a hidrólise e acidogênese, o pH ótimo encontra-se entre 5,5 e 6,5, devido à produção de ácidos graxos voláteis e outros produtos intermediários (KIM et al., 2003; YU; FANG, 2002). Entretanto, a metanogênese somente se desenvolve quando o pH apresentar um valor próximo ao ponto neutro (pH = 7). Segundo Omer e Fadalla (2003), o pH ótimo para a etapa da metanogênese apresenta-se entre 6,8 e 7,5.

Segundo Van Haandel e Lettinga (1994), se por algum motivo a taxa de remoção de ácidos voláteis por metanogênese não acompanhar a taxa de produção dos mesmos, poderá gerar uma instabilização no processo, devido a produção líquida de ácidos, resultando na diminuição do valor do pH. Tal fato pode reduzir a atividade metanogênica e aumentar a produção líquida de ácido, ocasionando o que se denomina de acidificação do meio, sendo a causa mais comum de falha operacional em sistemas de tratamento anaeróbio.

Quando o processo anaeróbio é afetado pelo pH, esse fenômeno pode causar mudanças drásticas nas diferentes espécies de micro-organismos presentes no reator (MU et al., 2006). O pH é fortemente dependente da capacidade de tamponamento no meio líquido. O componente mais importante no tamponamento para a manutenção de um pH ótimo para as bactérias metanogênicas, é o

bicarbonato. Além disso, a flora bacteriana também está diretamente relacionada com a concentração de ácidos voláteis presente no meio (HORI et al., 2006).

Valores de pH (acima de 8,3) muito distantes do ótimo para a metanogênese podem causar a desintegração dos grânulos metanogênicos (SANDBERG; AHRING, 1992), além de aumentar a toxicidade do nitrogênio amoniacal. Com isso, o processo tanto pode ser realizado em duas fases, uma correspondendo à hidrólise e acidogênese e outra de metanogênese, como também pode ocorrer em uma única etapa com pH favorável na faixa de 6,8 e 7,5 (OMER; FADALLA, 2003).

2.10.3 Alcalinidade

Os micro-organismos produtores de metano são anaeróbios estritos e são extremamente sensíveis a alterações na alcalinidade, pH e temperatura. Portanto, as condições operacionais devem ser periodicamente monitoradas e mantidas dentro de faixas ótimas para uma atividade satisfatória destes micro-organismos.

A alcalinidade é a capacidade tampão do sistema e é importante para suportar alterações na concentração de íons H^+ sem alterar o pH. Na digestão anaeróbia a alcalinidade é oriunda de diversas espécies químicas presentes no meio, mas principalmente do equilíbrio do carbono inorgânico $CO_{2(aq)} \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow HCO_3^- \leftrightarrow CO_3^{2-}$ e, em menor extensão, no equilíbrio do nitrogênio amoniacal $NH_3 + H^+ \leftrightarrow NH_4^+$ (ANDRADE, 2009).

Segundo Speece (1995), o aumento da alcalinidade no meio líquido durante processo anaeróbio é o resultado do metabolismo da matéria orgânica realizado pelos micro-organismos com a liberação de um cátion e um ânion. Na digestão anaeróbia de compostos orgânicos nitrogenados, o aumento da alcalinidade está relacionado com a quantidade de amônia liberada durante o processo.

A alcalinidade é um dos parâmetros de extrema importância para a digestão anaeróbia. Os ácidos graxos voláteis devem estar em equilíbrio com a alcalinidade do sistema. Alcalinidade e pH estão diretamente associados, porém alcalinidade elevada não é sinônimo de pH elevado (SCHMIDELL et al., 2007).

Embora a medida do pH seja uma importante informação sobre o estado do processo, a medida da alcalinidade informa sobre possíveis desequilíbrios na sequência de reações da digestão anaeróbia, uma vez que o acúmulo de ácidos voláteis causa um decréscimo na alcalinidade antes de alterar o pH (ANDRADE,

2009). A inibição de um processo anaeróbio por ácidos voláteis está associada ao pH do meio, pois baixos valores de pH estão geralmente relacionados a presença de altas concentrações de ácidos voláteis. Segundo Chernicharo (1997), o monitoramento da alcalinidade em biorreatores anaeróbios é mais importante que a verificação do valor do pH, pelo fato deste ser expresso em escala logarítmica.

Quando a alcalinidade do sistema está suficientemente elevada, ocorre o efeito de tamponamento do meio no reator, evitando assim que o acúmulo dos ácidos voláteis resulte na queda de pH. Faixa de alcalinidade entre 1000 a 5000 mg.L⁻¹ CaCO₃ é considerada ótima, no entanto se o processo for operado sem acúmulo de ácidos voláteis, é possível se obter uma faixa de alcalinidade entre 500 a 1000 mg.L⁻¹ CaCO₃ (SOARES; ZAIAT, 2007; SOUZA, 1984).

2.10.4 Nitrogênio amoniacal

O nitrogênio amoniacal (N-NH₄) é a soma dos compostos nitrogenados que participam do equilíbrio $\text{NH}_3 + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{NH}_4^+$. A distribuição das espécies de amônia presentes no meio aquoso depende da constante de equilíbrio (K), no qual o logaritmo do seu inverso é o pK (SILVA; JARDIM, 2007). A concentração de amônia está reacionado com a temperatura e pH do meio (Figura 6) (FERNANDES et al., 2012).

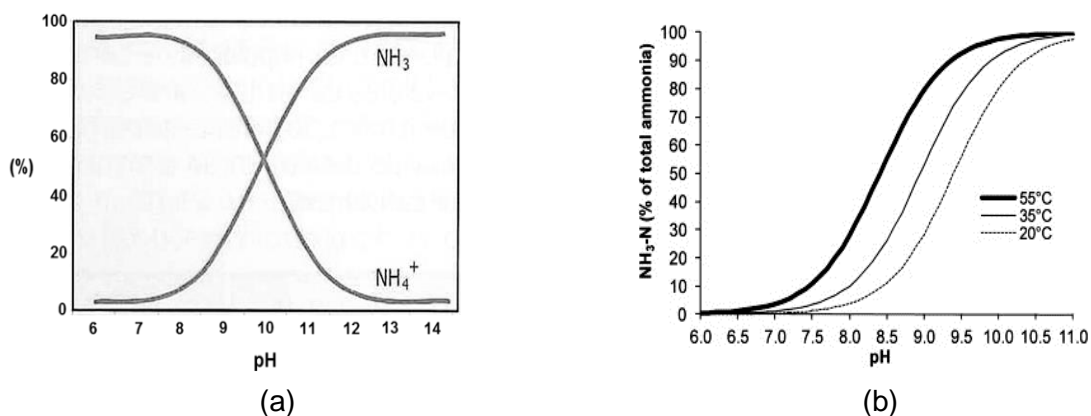


Figura 6 (a) proporção entre as formas de nitrogênio amoniacal em função do pH; (b) porcentagem de amônia presente em uma solução a 20, 35 e 55 °C variando o pH (FERNANDES et al., 2012; TISDALE et al., 1985).

Nitrogênio amoniacal é um dos inibidores mais comuns encontrados durante a digestão anaeróbia de substratos que contêm altas concentrações de proteínas (FERNANDES et al., 2012). O acúmulo de nitrogênio amoniacal no processo

anaeróbio é identificado como um dos principais problemas encontrados, pois pode afetar a produção de metano causando toxicidade para as bactérias metanogênicas (GUENDOOUZ et al., 2010). Segundo Kayhanian (1999), a amônia é a espécie de maior toxicidade para as bactérias metanogênicas. A amônia entra na célula por difusão através da membrana celular, inibindo o funcionamento das células, interrompendo o equilíbrio de prótons e potássio na célula, tornando, assim, a amônia como a principal forma inibitória para a metanogênese. Na literatura, as concentrações inibitórias de nitrogênio amoniacal para a digestão anaeróbia estão entre 1200 a 4000 mg N-NH₄ (KRYLOVA et al., 1997; ANGELIDAKI; AHRING, 1994; KOSTER; LETTINGA, 1984).

Segundo Obuli et al. (2012), o processo de degradação da proteína é considerado lento, portanto o nitrogênio amoniacal liberado na digestão anaeróbia tende a ficar acumulado no meio e não existe mecanismo específico para remoção, exceto por diluição. O processo de diluição pode ser realizado através de adição de água no processo, no qual parte do nitrogênio amoniacal é removido na retirada do efluente líquido que é igual ao volume adicionado.

2.11 Biogás

Biogás é o produto da biodigestão anaeróbia da matéria orgânica, constituído basicamente de 55-75 % de metano (CH₄), 20-45 % de dióxido de carbono (CO₂), traços de sulfeto de hidrogênio (H₂S) e ácidos orgânicos de baixo peso molecular (KAO et al., 2012; LAM et al., 2012; GE et al., 2011). Segundo Evans e Furlong (2003), o poder calorífico típico do biogás, consistindo de aproximadamente 60 % de CH₄ e 40 % de CO₂ varia de 5,5-6,5 kW.m⁻³, tornando a produção desse gás um atrativo como um meio de geração de energia renovável.

O biogás é considerado um combustível de alto potencial para geração de energia. No entanto, um dos principais problemas encontrados no biogás é a presença de gases indesejáveis, como o CO₂ e H₂S. Esses contaminantes, além de provocarem corrosão e vazamento em tubulações, compressores, tanques, equipamentos e acessórios em geral, diminuem a qualidade do combustível, podendo inviabilizar economicamente sua compressão para transporte a locais diferentes de onde é produzido (KAPDI et al., 2005). O H₂S é um gás tóxico e também uma das principais causas de odor na digestão anaeróbia. Dióxido de carbono é um gás inerte que diminui o poder calorífico do biogás, além disso, se o biogás for utilizado como

biocombustível pode aumentar a emissão de monóxido de carbono e de hidrocarbonetos (KAO et al., 2012).

A purificação do biogás pode ser feita por métodos físico-químicos como absorção física ou química, adsorção em superfícies sólidas, separação por membranas, separação criogênica e conversão química (KAPDI et al., 2005).

Um dos aspectos positivos da digestão anaeróbia de microalgas é o fato do biogás apresentar elevada concentração de metano (60-70 %) e mínimas concentrações de enxofre quando comparado ao gás oriundo de outros substratos (SIALVE et al., 2009).

Costa et al. (2008), estudaram a utilização de biomassa de *Spirulina* LEB-18 como substrato único para a produção de biogás sem a complementação do meio com nutrientes. Os autores constataram a produção de aproximadamente 78 % de metano a partir da decomposição da biomassa utilizada na alimentação, apresentando uma conversão do carbono da biomassa em biogás ($0,59 \text{ g.g}^{-1}$) superior a de substratos convencionais utilizados para a produção de biocombustíveis.

2.12 Remoção biológica do CO₂ presente no biogás a partir de microalgas

O suprimento de carbono no cultivo de microalgas representa uma parte considerável dos custos de operação do processo. A biofixação de dióxido de carbono por microalgas tem provado ser um método eficiente e econômico, principalmente devido à capacidade fotossintética desses micro-organismos para usar este gás como fonte de nutrientes (SCHMITZ et al., 2012). Segundo Wang et al. (2008), um processo que combine a fixação de CO₂, a produção de biocombustíveis e o tratamento de efluentes é apontado como uma alternativa promissora para as atuais estratégias de mitigação de CO₂.

Alguns autores já realizaram a injeção de gás em cultivo de microalgas para o consumo biológico do CO₂ contaminante do biogás. Porém, esses estudos foram realizados há mais de uma década. Rovirosa et al. (1995) injetaram o biogás em cultivos para produção de biomassa proteica para a alimentação de animais. Wang et al. (1991), estudaram a injeção de biogás com 30 % de CO₂ em cultivos de *Anabaena* e observaram aumento da produtividade da biomassa em 12,3 %. Travieso et al. (1993) obtiveram redução de 44-48 para 2,5-11 % no conteúdo de CO₂ e gás com 88-97 % de metano em cultivo de *Arthrospira platensis*.

Recentemente alguns estudos vêm sendo realizados quanto à remoção do CO₂ presente no biogás por meio de cultivos microalgais. Segundo Markou e Georgakakis (2011), o CO₂ pode ser fornecido às microalgas a partir da digestão anaeróbia de resíduos agroindustriais, que contém entre 30 e 45 % (v/v) de dióxido de carbono presente no biogás como contaminante, com duas finalidades: fornecer carbono às algas como fonte de nutriente para produção de biomassa e purificar o biogás, através da remoção do CO₂ presente.

Kao et al. (2012) estudaram a remoção biológica de dióxido de carbono em biorreatores tubulares utilizando a microalga *Chlorella* sp. MB-9. O biogás injetado nos cultivos apresentava aproximadamente 70 % (v/v) de CH₄ e 30 % (v/v) de CO₂. Os autores observaram 86 % do CO₂ injetado foi removido, obtendo-se biogás purificado nas concentrações entre 85 a 90 % (v/v).

Atualmente microalgas vêm sendo estudadas quanto à capacidade de biofixar CO₂ de gases de combustão proveniente de usinas termelétricas e indústrias. Porém, esses gases apresentam em sua composição NO_x, SO_x e particulados, os quais são componentes indesejados quando presentes em concentrações acima da suportada pela microalga para o crescimento celular. O Quadro 4 apresenta algumas espécies de microalgas usualmente utilizadas em estudos relacionados à biofixação de CO₂, as quais podem ser utilizadas também para a purificação de biogás.

Douskova et al. (2009) cultivaram a microalga *Chlorella vulgaris* utilizando como fonte de carbono CO₂ presente no gás efluente de uma planta de incineração de lixo urbano. O gás injetado nos cultivos apresentava concentrações de CO₂ entre 11-13 % (v/v), 8-10 % (v/v) de O₂, 79-80 % (v/v) de N₂ e pequenas quantidades de outros gases. Os autores obtiveram produtividades de 2,5 g.L⁻¹.d⁻¹ quando injetado o gás efluente, valor maior que o obtido em cultivo padrão (1,7 g.L⁻¹.d⁻¹), no qual foi utilizado uma mistura de CO₂ e ar, na concentração de 11 % (v/v) de CO₂.

Morais e Costa, (2007a) reportaram eficiência na biofixação de CO₂ de 53,29 %, em culturas de *Spirulina* em fotobiorreatores tubulares. Em cultivos realizados por Vonshak e Richmond (1988), em biorreatores tipo *raceway* com a microalga *Spirulina*, as máximas eficiências de conversão de CO₂ em biomassa foram de aproximadamente 80 %. No entanto, estes autores constataram que as altas eficiências eram raramente obtidas em sistemas de grande porte.

Quadro 4 Microalgas estudadas para biofixação de CO₂.

Microalgas	CO ₂ injetado (%, v.v ⁻¹)	CO ₂ fixado (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	Fotobiorreator	Referências
<i>Anabaena</i> sp.	10	1,01	Bolhas	Chiang et al. (2011)
<i>Chlorella</i> sp.	5	0,7	Tubular vertical	Ryu et al. (2009)
<i>Chlorella vulgaris</i>	5	0,16	Colunas em série	Lam e Lee (2013)
<i>Chlorella vulgaris</i>	10	0,25	Fermentador	Sydney et al. (2010)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	10	0,29	Erlenmeyer	Tang et al. (2011)
<i>Spirulina platensis</i>	10	0,32	Fermentador	Sydney et al. (2010)
<i>Spirulina platensis</i>	15	0,92	Membrana de fibra oca	Kumar et al. (2010b)
<i>Spirulina</i> sp. LEB-18	18	0,21	Raceway	Rosa et al. (2011)
<i>Spirulina</i> sp.	12	0,41	Tubular vertical em série	Morais e Costa (2007a)
<i>Synechococcus nidulans</i>	12	0,78	Tubular vertical em série	Radmann et al. (2011)

2.13 Efluente da produção de biogás e sua aplicação em cultivo de microalgas

Usar efluentes líquidos como fonte de nutrientes para o crescimento microalgal pode representar um considerável aumento na viabilidade da aplicação comercial de microalgas. O efluente líquido, além de ser tratado durante o processo, reduz a necessidade de meio de cultura sintético, pois possui em sua composição carbono, nitrogênio e fósforo (CAI et al., 2013; MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011; CHAIKLAHAN et al. 2010).

A composição dos efluentes líquidos obtidos na digestão anaeróbia pode variar de acordo com o substrato utilizado e com os fatores físico-químicos durante o processo. No entanto, independente de outros fatores, o efluente líquido contém

carbono inorgânico como HCO_3^- originado nas reações biológicas e na dissolução de CO_2 (ANDRADE, 2009).

Segundo Chen et al. (2008), a utilização de substrato proteico na digestão anaeróbia proporciona a formação de íons amônio (NH_4^+) no efluente, através da decomposição das proteínas. A fonte de nitrogênio nos meios de cultivo tipicamente empregados para o crescimento de *Spirulina* é o nitrato de sódio (ZARROUK, 1966). A substituição do nitrato por sais de amônio em cultivos de microalgas vem sendo estudada com o objetivo de reduzir custos de produção, uma vez que esses microorganismos apresentam a capacidade de utilizar amônia como fonte de nitrogênio (PARK et al., 2010; SASSANO et al., 2007).

Chang et al. (2013) cultivaram *Spirulina platensis* em meio contendo urina humana e ureia diluída como fonte de nitrogênio e fósforo para avaliar o tratamento de águas residuais e produção de biomassa microalgal. Os autores observaram que após 7 d de cultivo, 97 % do N-NH_4^+ , 96,5 % do fósforo total e 85,98 % da ureia na urina foram removidos pelas microalgas.

Segundo Markou e Georgakakis (2011), em estudos anteriores o bicarbonato de sódio foi adicionado em meios de cultivo para a microalga *Spirulina*, a partir da digestão anaeróbia de resíduos, nas concentrações de 9 a 17 g.L^{-1} . Porém, após estudos recentes, a adição de 2 a 4 g.L^{-1} de bicarbonato durante o cultivo com efluentes do processo anaeróbio é considerada suficiente. Lincoln et al. (1996), estudaram o cultivo de *Spirulina* em efluente da digestão anaeróbia de dejetos suínos e bovinos suplementado com bicarbonato de sódio e observaram que a adição de 0,5 % de bicarbonato no meio de cultivo é o suficiente para o crescimento da microalga.

Chaiklahan et al. (2010) estudaram o cultivo da microalga *Spirulina platensis* em efluente da digestão anaeróbia de dejetos suínos. O efluente foi diluído (20 %, v/v) e suplementado com bicarbonato de sódio (4,5 g.L^{-1}) e ureia (0,2 g.L^{-1}). Os autores observaram que o meio de cultivo contendo o efluente e os sais adicionados, apresentou as maiores produtividades e redução de custos de 4,4 vezes quando comparado com o meio de cultivo Zarrouk tradicional.

Mezzomo et al. (2010) avaliaram o cultivo da microalga *Spirulina platensis* em efluente de suínos com diferentes diluições, rico em fósforo e nitrogênio inorgânicos. Os autores verificaram que as maiores concentrações celulares e taxas de crescimento foram encontradas quando a microalga foi cultivada em concentrações de efluentes no meio de 5 e 8,5 %.

Segundo Andrade (2009), o efluente da produção de biometano pode ser utilizado como fonte de carbono e nitrogênio no cultivo da microalga *Spirulina*, reduzindo a concentração de meio de cultivo necessária e contribuindo para a redução de custos com seu tratamento para descarte. A injeção de CO₂ (30 % v/v) complementando o efluente como fonte de carbono incrementou em 33 % a produtividade em biomassa. Quando este autor utilizou o efluente como fonte de nitrogênio os resultados de crescimento celular foram iguais aos obtidos com meio de cultivo Zarrouk, porém em maior concentração de proteínas (66,08 %) na biomassa.

CAPÍTULO III: DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

3 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

O trabalho foi dividido em 3 artigos. O primeiro artigo é intitulado **PRODUÇÃO DE BIOGÁS UTILIZANDO BIOMASSA MICROALGAL EM ESCALA PILOTO**, onde foi estudada a conversão da biomassa da microalga *Spirulina* LEB-18 em biogás, por digestão anaeróbia em escala piloto a temperatura ambiente, que variou entre 12-38 °C. O segundo artigo foi intitulado **CULTIVO DE *Spirulina* sp. LEB-18 UTILIZANDO EFLUENTE DA DIGESTÃO ANAERÓBIA**, apresentando o estudo do crescimento, a composição da biomassa e o perfil de ácidos graxos da microalga *Spirulina* sp. LEB-18 cultivada em modo semicontínuo, em meio Zarrouk (16,8 g.L⁻¹ NaHCO₃) e meio Zarrouk modificado substituído por 20 % (v/v) de efluente oriundo da produção de biogás, com concentrações reduzidas de NaHCO₃ (2,8 e 5,3 g.L⁻¹). No terceiro artigo, intitulado **PURIFICAÇÃO DE BIOGÁS EM FOTOBIORREATOR TUBULAR VERTICAL EM SÉRIE**, foi avaliada a capacidade da microalga *Spirulina* sp. LEB-18 em biofixar o CO₂ presente no biogás. Os cultivos foram realizados em meio Zarrouk sem a fonte de carbono, a qual foi suprida pela injeção de biogás sintético simulando o biogás produzido na digestão anaeróbia em escala piloto (75 % CH₄ (v/v) e 25 % CO₂ (v/v)). Simultaneamente, foram realizados cultivos idênticos, porém sem CH₄, injetando apenas CO₂ sintético, na mesma concentração presente no biogás (25 % (v/v)). A Figura 7 mostra o biosistema para conversão de *Spirulina* em biogás e geração de biomassa microalgal utilizando como fonte de carbono bicarbonato do efluente líquido do processo anaeróbio e o CO₂ do biogás produzido.

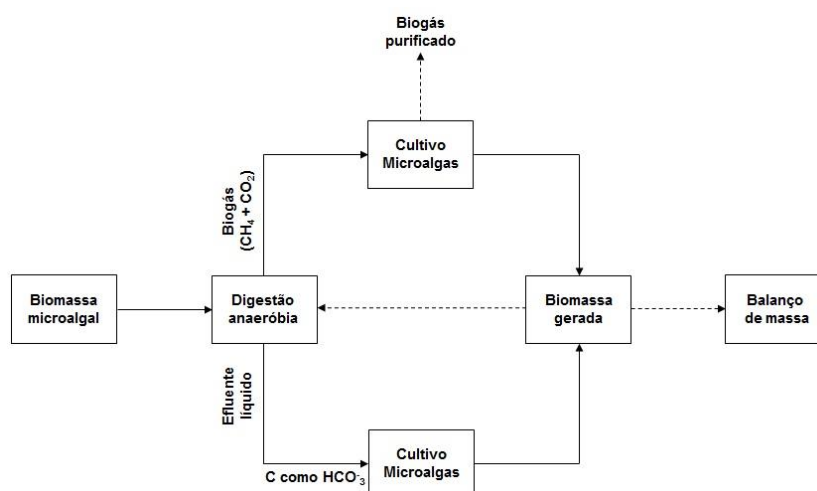


Figura 7 Biosistema para produção de biogás e biomassa microalgal utilizando efluentes do processo anaeróbio.

3.1 ARTIGO 1
PRODUÇÃO DE BIOGÁS UTILIZANDO BIOMASSA MICROALGAL EM ESCALA
PILOTO

PRODUÇÃO DE BIOGÁS UTILIZANDO BIOMASSA MICROALGAL EM ESCALA PILOTO

3.1.1 Resumo

Mudanças climáticas devido ao uso de combustíveis fósseis têm impulsionado a busca por novas fontes de energia com menor impacto ambiental. Biogás é um combustível produzido pela digestão anaeróbia da fração orgânica de biomassa, constituído principalmente por metano e dióxido de carbono. Este trabalho teve como objetivo estudar a conversão de biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB-18 em biogás, por digestão anaeróbia em biorreator em escala piloto (310 L) sob temperatura ambiente, que variou entre 12-38 °C. A maior conversão da fração orgânica da biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18 em metano foi 0,30 g.g⁻¹ e a decomposição da fração orgânica da biomassa foi maior que 80 %. A concentração de metano no gás aumentou com o aumento da temperatura ambiente, obtendo-se 74,4 % quando o processo foi conduzido em temperaturas entre 26-38 °C e 72,2 % de CH₄ no gás, quando submetido a baixas temperaturas (12-21 °C). Os resultados foram comparados com outros obtidos em escala de bancada (35 °C) e a decomposição da biomassa e decomposição da fração orgânica da biomassa em escala piloto sob temperaturas de 26 a 38 °C foram semelhantes aos de escala laboratorial em condições ótimas, não apresentando diferença significativa, demonstrando potencialidade de aplicação da biomassa de *Spirulina* para produzir biogás sob condições ambientais.

Palavras – chave: biomassa, biorreator, cianobactéria, digestão anaeróbia, metano.

PRODUCTION OF BIOGÁS USING MICROALGAE BIOMASS IN PILOT SCALE

Abstract

Climate changes due to the usage of fossil fuel have boosted the search for new sources of energy with less environmental impact. Biogas is a fuel produced by the anaerobic digestion of the biomass's organic fraction, consisting mainly by methane and carbon dioxide. This task had as objective to study the microalgae *Spirulina* sp. LEB-18's biomass conversion into biogas by anaerobic digestion with bioreactor in pilot scale (310 L) under ambient temperature, that varied between 12-38 °C. The major conversion of the biomass's organic fraction of *Spirulina* sp. LEB-18 in methane was 0.30 g.g⁻¹ and the decomposition of biomass organic fraction was over 80 %. The concentration of methane on the gas increased with the increase of the ambient temperature, obtaining 74.4 % when the process was conducted in temperatures between 26–38 °C and 72.2 % of CH₄ on the gas when subjected to low temperatures (12–21 °C). The results were compared to other obtained ones in bench scale (35 °C) and the biomass decomposition and biomass's organic fraction decomposition in pilot scale under temperatures of 26 to 38 °C were similar to the laboratory scale ones in great conditions, not showing signifying difference, demonstrating application potentiality of *Spirulina*'s biomass to produce biogas under ambient conditions.

Keywords: anaerobic digestion, biomass, bioreactor, cyanobacterium, methane.

3.1.2 Introdução

A geração de energia a partir de combustíveis fósseis representa cerca de 60 % do total mundial de emissões de gases de efeito estufa (IEA, 2009). O desafio tem sido o desenvolvimento de pesquisas de novas fontes de energia direcionadas para a redução das emissões de gases causadores do efeito estufa, que poderão, no futuro, desempenhar o papel que os combustíveis fósseis desempenharam até o momento. Vários países, destacam-se por apresentarem alto potencial de recursos naturais geradores de energia, entre eles, eólica, solar, pequenas centrais hidrelétricas e, principalmente, a biomassa, que é uma das fontes para produção de energia com maior potencial de crescimento nos próximos anos.

Uma alternativa para produção de biocombustíveis é a utilização de biomassa como matéria-prima para a produção de biogás por meio da digestão anaeróbia. Biogás pode ser produzido a partir de resíduos sólidos ou líquidos, bem como por biomassa microalgal. As microalgas são substrato adequado para o processamento anaeróbio, devido à sua elevada concentração de proteínas, lipídios, carboidratos e à ausência de lignina (SIALVE et al., 2009; SCHENK et al., 2008).

Microalgas vêm sendo fonte sustentável de matérias-primas para as indústrias alimentícia e química, agentes biológicos para mitigação de CO₂ e para produção de biocombustíveis (WIJFFELS; BARBOSA, 2010; CHISTI, 2007a; SPOLAORE et al., 2006). Após a extração do produto de interesse, a biomassa ou a sua fração residual, também pode ser utilizada como substrato para produção de biogás por digestão anaeróbia (ZAMALLOA et al., 2011; SIALVE et al., 2009). Como produto final da digestão anaeróbia, obtém-se biogás, que é uma mistura de metano, dióxido de carbono, traços de outros gases e ácidos orgânicos de baixo peso molecular (GE et al., 2011; LIANHUA et al., 2010).

Um dos aspectos positivos da digestão anaeróbia de microalgas é o fato de produzir biogás com elevada concentração de metano (60-70 %) e menores concentrações de enxofre quando comparado ao gás oriundo de outros substratos (SIALVE et al., 2009). Além disso, o CO₂ produzido durante o processo, pode ser utilizado como fonte de carbono para cultivos de microalgas, aumentando assim, a pureza do biogás (KAO et al., 2012).

Estudos sobre digestão anaeróbia em escala piloto de diversos substratos vêm sendo realizados (RAZAVIARANI et al., 2013; LIU et al., 2012; KIM et al., 2011; SALOMONI et al. 2011; ALVAREZ; LIDÉN, 2009). No entanto, não há registros da

produção de biogás a partir de microalgas em escala piloto. Nesse tipo de escala, normalmente a temperatura deixa de ser controlada, sendo o aquecimento realizado pela energia solar e pelo próprio calor liberado no processo. Assim, alguns desafios devem ser superados para aplicação da digestão anaeróbia em escala piloto sob condições ambientais naturais. Oscilações na temperatura podem apresentar grande influência no metabolismo bacteriano, na atividade enzimática, nos equilíbrios químicos em meio líquido e na solubilidade de substratos (MCKEOWN et al., 2012).

Este estudo integra um biosistema de produção e purificação de biogás utilizando microalgas que está sendo desenvolvido no Extremo Sul do Brasil. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de biogás em escala piloto sob temperatura ambiente através de digestão anaeróbia de biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB-18.

3.1.3 Material e Métodos

Inóculo

O inóculo utilizado foi uma cultura mista de micro-organismos anaeróbios proveniente de um reator anaeróbio para tratamento de água de parboilização de arroz da Empresa Nelson Wendt Alimentos (Pelotas – RS, Brasil). O inóculo foi adaptado à biomassa de microalga *Spirulina* sp. LEB-18 sob temperatura média ambiente de 29 °C, até atingir o equilíbrio no processo quanto à produção de biogás (15 d).

Substrato

Como substrato para alimentação do biorreator foi utilizado biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB-18, cultivada em uma unidade piloto de produção de *Spirulina*, em Santa Vitória do Palmar – RS, Brasil (33°30'S, 53°08'W) (MORAIS et al., 2008). A microalga foi cultivada em 3 biorreatores abertos tipo *raceway* de 15 m³, agitados por pás rotativas a 17 rpm e cobertos por uma estufa de filme transparente com proteção UV (MORAIS et al., 2010). Como meio de cultivo para produção da biomassa foi utilizada água da Lagoa Mangueira complementada com meio Zarrouk (ZARROUK, 1966).

A biomassa foi separada por filtração (200 mesh) e o meio de cultivo filtrado retornou ao biorreator. Após a colheita, a biomassa foi lavada com água

destilada para remoção dos sais, seca a 40 °C, moída em moinho de bolas e conservada sob refrigeração a 4 °C para posterior alimentação do biorreator anaeróbio.

A biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18 foi caracterizada quanto ao teor de proteínas, umidade e cinzas segundo metodologia oficial (AOAC, 2000) e lipídios pelo método de Folch (FOLCH et al., 1957). Carboidratos foram calculados por diferença. A Tabela 1 apresenta a composição centesimal da biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18 utilizada como substrato para produção de biogás.

Tabela 1 Composição centesimal da biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18 utilizada como substrato para produção de biogás.

Componente	Concentração % (p/p)
Proteínas	60,4 ± 1,3
Carboidratos	22,2 ± 1,8
Lipídios	10,4 ± 0,8
Cinzas	7,0 ± 0,9

Para efeito de comparação, os resultados obtidos neste trabalho em biorreatores de escala piloto, sem controle de temperatura, foram relacionados com dados obtidos em biorreatores em escala de bancada, operados sob condições ótimas de temperatura (35 °C). Tais dados de operação em condições ótimas foram coletados do trabalho de Andrade (2009), cuja produção de biogás em escala de bancada foi realizada em biorreator de 14 L, com volume útil de 10 L. O biorreator foi operado em batelada sequencial com ciclos diários de alimentação (biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18, 7,0 g.L⁻¹), reação (6 h), decantação (18 h) e esvaziamento de 10 % do volume. A agitação foi intermitente, realizada a cada hora, durante o ciclo de reação. O biorreator foi mantido em estufa termostatizada (indoor), sob temperatura constante (35 °C) durante 50 d após estabilização do volume diário de biogás produzido.

Biorreatores e Condições Operacionais

Produção de biogás em escala piloto sob temperatura variável

Os ensaios foram realizados em biorreator de 310 L, com volume útil 280 L (Figura 1). O biorreator foi operado em batelada sequencial com ciclos diários de

alimentação (biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18, 7,0 g.L⁻¹), reação (6 h), decantação (18 h) e esvaziamento de 10 % do volume. Durante o tempo de reação, a agitação foi realizada através de recirculação do meio líquido, por bomba submersa com vazão de 2 m³.h⁻¹. O Ensaio 1 foi mantido sob condições ambientais não controladas (outdoor), durante os meses janeiro e fevereiro, quando as temperaturas no meio líquido variaram entre 26-38 °C. No Ensaio 2, o biorreator foi operado durante os meses julho e agosto com temperaturas no meio líquido variando entre 12-21 °C (outdoor). Cada ensaio foi operado durante 50 d após estabilização do volume diário de biogás produzido.

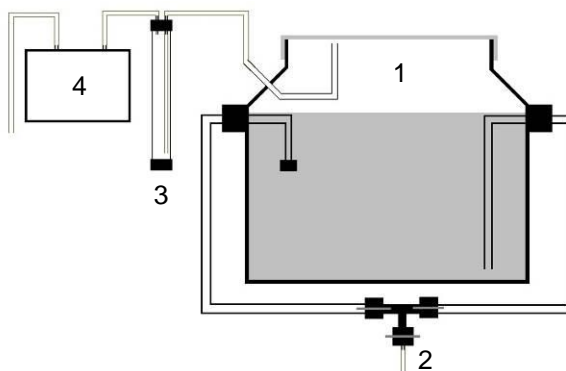


Figura 1 Aparato experimental utilizado para a produção de biogás a partir de *Spirulina* sp. LEB-18 (1) biorreator anaeróbico de 310 L; (2) tubulação de alimentação de biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18 e saída de efluente; (3) frasco de segurança; (4) fluxômetro.

Determinações Analíticas

A cada 84 h o efluente dos biorreatores foi analisado quanto ao pH, alcalinidade, sólidos totais e voláteis conforme metodologia oficial (APHA, 1998) e amônia pelo método de Nessler (NESSLER, 1856). O volume de biogás produzido foi medido diariamente por fluxômetro (G0,6, LAO, Brasil) acoplado ao biorreator (Figura 1). As temperaturas máximas e mínimas do meio nos Ensaio outdoor (1 e 2) foram medidas através de termômetro de mercúrio imerso no líquido. Após a estabilização do volume diário de biogás produzido, a composição do gás (CH₄, CO₂, H₂S e H₂) foi determinada por cromatografia gasosa (GC CP3800 Varian, NDL).

Respostas Avaliadas

A decomposição da biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18 alimentada (X_T) e a decomposição da fração orgânica dessa biomassa (X_{Org}) foram calculadas pelo balanço de massa de sólidos, considerando a entrada e a saída de biomassa nos biorreatores.

A produção específica de biogás (P_E , d^{-1}) foi determinada pela razão entre o volume de biogás produzido por dia ($V_{gás}$, $L \cdot d^{-1}$) e o volume útil do biorreator ($V_{biorreator}$, L), através da Equação 1:

$$P_E = \frac{V_{gás}}{V_{biorreator}} \quad \text{Equação (1)}$$

A conversão da fração orgânica da biomassa em metano ($Y_{CH_4/Org}$) foi determinada pela razão entre a massa de metano produzido (m_{CH_4} , g) e a massa da fração orgânica da biomassa decomposta (m_{Org} , g), segundo a Equação 2:

$$Y_{\frac{CH_4}{Org}} = \frac{m_{CH_4}}{m_{Org}} \quad \text{Equação (2)}$$

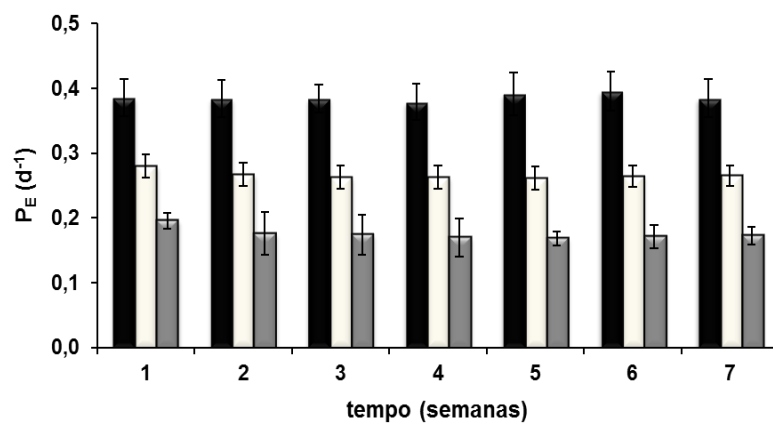
Análise Estatística

As médias dos resultados obtidos nas diferentes condições experimentais foram comparadas através da Análise de Variância (ANOVA) utilizando o teste de Tukey, com 95 % de significância estatística (α), $p < 0,05$.

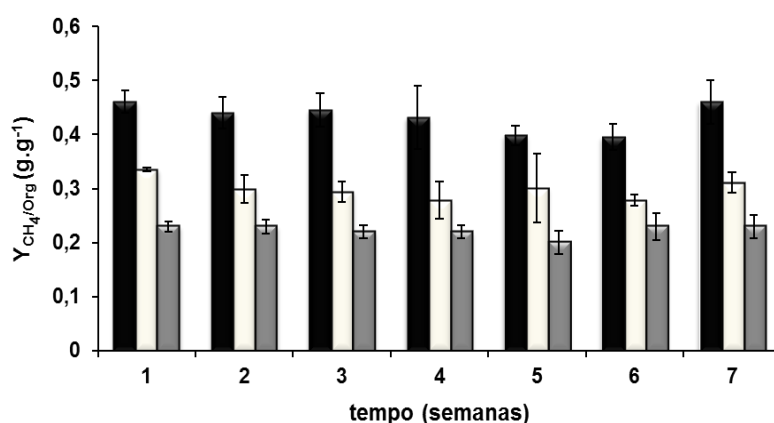
3.1.4 Resultados e Discussão

A Figura 2 apresenta a produção específica de biogás (P_E) e a conversão da fração orgânica da biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18 em metano ($Y_{CH_4/Org}$). As produções específicas de biogás nos Ensaios 1 e 2 foram, respectivamente, $0,27 d^{-1}$ e $0,19 d^{-1}$. Quando esses resultados são comparados aos de escala bancada ($0,38 d^{-1}$), estes produziram, respectivamente, 29,9 % e 50 % menos biogás ($p < 0,05$) (Tabela 2). Entre os Ensaios em escala piloto, o Ensaio 1 produziu um total de 29,6 % a mais de biogás durante os 50 d (Figura 2). No entanto, em ambos os testes em escala

piloto, ocorreu produção de biogás aproximadamente constante durante as 7 semanas (Figura 2a), demonstrando aclimação dos micro-organismos às condições impostas.



(a)



(b)

Figura 2 (a) Produção específica de biogás (P_E) e (b) conversão de biomassa (fração orgânica) em biometano ($Y_{CH_4/Org}$) nos ensaios: escala de bancada a 35 °C (■), escala piloto com temperaturas entre 26-38 °C (□) e escala piloto com temperaturas entre 12-21 °C (■). Os desvios padrões são apresentados sobre cada coluna.

A produção específica de metano no Ensaio 1, submetido a temperaturas entre 26-38 °C, foi 0,27 d^{-1} , valor superior ao encontrado por Ras et al. (2011) e Yen e Brune (2007) que obtiveram 0,17 d^{-1} na digestão anaeróbia de biomassa da microalga *Chlorella vulgaris* e 0,14 d^{-1} quando produziram biogás através da digestão anaeróbia de cultura mista das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus* sp., respectivamente. No Ensaio 2, o qual foi submetido a condições ambientais naturais durante baixas temperaturas, a produção específica de metano (0,19 d^{-1}) foi semelhante à encontrada por Ras et al. (2011) e Yen e Brune (2007) que produziram

biogás sob condições ideais de temperatura (35 °C). Os resultados de P_E obtidos neste trabalho demonstraram que quando o processo foi submetido a condições ambientais (Ensaio 1 e 2), apresentou valores abaixo que em condições ideais (escala de bancada) (0,38 d⁻¹), porém, quando comparado o P_E (0,19 d⁻¹) do Ensaio 2 com resultados obtidos por Ras et al. (2011), estes foram iguais. A baixa produção específica de biogás durante o Ensaio 2 pode ter ocorrido devido a hidrólise da matéria orgânica ocorre mais lentamente quando a digestão anaeróbia é submetida a baixas temperaturas, porém, existe uma certa adaptação das bactérias às condições psicrófilas que ocorre depois de um certo tempo de adaptação (Lettinga, 2001).

Tabela 2 Decomposição da biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18 (X_T , %), decomposição da fração orgânica da biomassa (X_{Org} , %) e conversão da fração orgânica da biomassa em CH₄ ($Y_{CH_4/Org}$, g.g⁻¹) obtidas durante a produção de biogás a partir de *Spirulina* sp. LEB-18, em escala de bancada e nos Ensaio 1 e 2.

	Escala de bancada*	Ensaio 1 (26-38 °C)	Ensaio 2 (12-21 °C)
X_T (%)	75,7 ± 3,1 ^a	73,2 ± 1,3 ^a	59,8 ± 3,6 ^b
X_{Org} (%)	83,9 ± 2,4 ^a	82,2 ± 1,5 ^a	69,3 ± 4,2 ^b
$Y_{CH_4/Org}$ (g.g ⁻¹)	0,41 ± 0,03 ^a	0,30 ± 0,03 ^b	0,22 ± 0,02 ^c

Letras iguais dentro de cada linha referem-se a médias estatisticamente iguais ($p > 0,05$).

*Dados para comparação (Andrade, 2009).

A conversão da biomassa em biogás foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) para cada ensaio (Figura 2b, Tabela 2). Segundo a equação proposta por Briand e Morand (1997), que relaciona a composição química de um determinado substrato e a produção máxima teórica de biogás a partir dele, a biomassa de *Spirulina* LEB-18 teria conversão de sólidos em metano de 0,38 L.g⁻¹. No entanto, expressando-se a conversão $Y_{CH_4/Org}$ em volume (na CNTP), as conversões nos testes 1 e 2 correspondem, respectivamente, a 0,34 e 0,22 L.g⁻¹.

Rani et al. (2012) estudaram a digestão anaeróbia de resíduos lácteos e relataram produção de metano 0,22 L.g⁻¹. Ras et al. (2011) em testes realizados utilizando biomassa de *Chlorella vulgaris* atingiram produção de metano de 0,24 L.g⁻¹. Em outro estudo, Zamalloa et al. (2012) avaliaram a digestão anaeróbia da microalga de água doce *Scenedesmus obliquus* e da alga marinha *Phaeodactylum tricornutum*

em diferentes temperaturas e alcançaram 0,13 e 0,27 L.g⁻¹, respectivamente, sob condições mesófilas e 0,17 e 0,29 L.g⁻¹, respectivamente, sob condições termófilas.

A decomposição de biomassa (X_T , %) e a decomposição da fração orgânica da biomassa (X_{Org} , %) obtida no Ensaio 1 não apresentou diferença significativa quando comparada com os resultados em escala de bancada (Tabela 2). Mesmo quando o processo foi realizado em escala piloto e temperaturas variáveis (26–38 °C), a decomposição da biomassa da microalga *Spirulina* no Ensaio 1 (73,2 % ± 1,3 %) foi igual à obtida em escala de bancada (75,7 % ± 3,1 %) e temperatura constante de 35 °C. Quando o processo foi realizado em escala piloto e baixas temperaturas (12-21 °C), X_T (aproximadamente 60 %) foi superior aos encontrados por Ras et al. (2011) que estudaram a digestão anaeróbia da microalga *Chlorella vulgaris* a 35 °C, obtendo decomposição de 51 % da biomassa. Segundo Sialve et al. (2009) um dos fatores limitantes na digestão anaeróbia de microalgas está na resistência da parede celular do substrato. Porém os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com Ong et al. (2002) e Costa et al. (2008), que estudaram a digestão anaeróbia da microalga *Spirulina* e notaram que a biomassa de *Spirulina* apresenta compostos de fácil hidrólise, e que, uma vez hidrolisada a matéria orgânica, os grânulos a processam até a metanogênese.

Embora a temperatura ambiente tenha variado entre 15 °C e 43 °C durante o Ensaio 1, a temperatura do meio manteve-se entre 26 °C e 38 °C (Figura 3a). Para a produção de biogás durante o Ensaio 2, a temperatura ambiente variou entre 3 e 33 °C e, no interior do biorreator, entre 12 e 21 °C. Os maiores picos de produção de biogás foram obtidos em dias em que foram registradas as maiores temperaturas em ambos experimentos (Figura 3a e 3b).

A produção específica de biogás alcançada neste trabalho sob temperaturas variáveis 26-38 °C (Ensaio 1) e 12-21 °C (Ensaio 2) foi superior à encontrada na literatura para produção de biogás a partir de outros substratos. Alvarez e Lidén (2009) estudaram a digestão anaeróbia de dejetos bovinos/ovinos e obtiveram P_E de 0,27 d⁻¹ quando a digestão anaeróbia foi realizada a 25 °C e P_E de 0,16 d⁻¹ quando a temperatura utilizada durante o processo foi de 18 °C. Os resultados obtidos neste trabalho e pelos autores citados demonstram que a temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes na digestão anaeróbia, uma vez que afeta os processos biológicos de diferentes maneiras.

Dentre os principais efeitos da temperatura incluem-se as alterações na velocidade do metabolismo das bactérias, no equilíbrio iônico e na solubilidade dos

substratos, principalmente de lipídios. O parâmetro cinético diretamente afetado pela temperatura é a velocidade específica de consumo do substrato. Entre 20 °C e 25 °C, esse parâmetro pode assumir valores inferiores à metade daqueles a 35 °C. É possível, no entanto, que a baixa velocidade específica de consumo de substratos solúveis não seja o parâmetro limitante do processo na digestão anaeróbia. A temperaturas inferiores a 20 °C, a solubilização da matéria orgânica é lenta, podendo se constituir na etapa limitante do processo. Caso esses constituintes não sejam solubilizados, poderão ficar acumulados junto à superfície do biorreator (SOUZA, 1984).

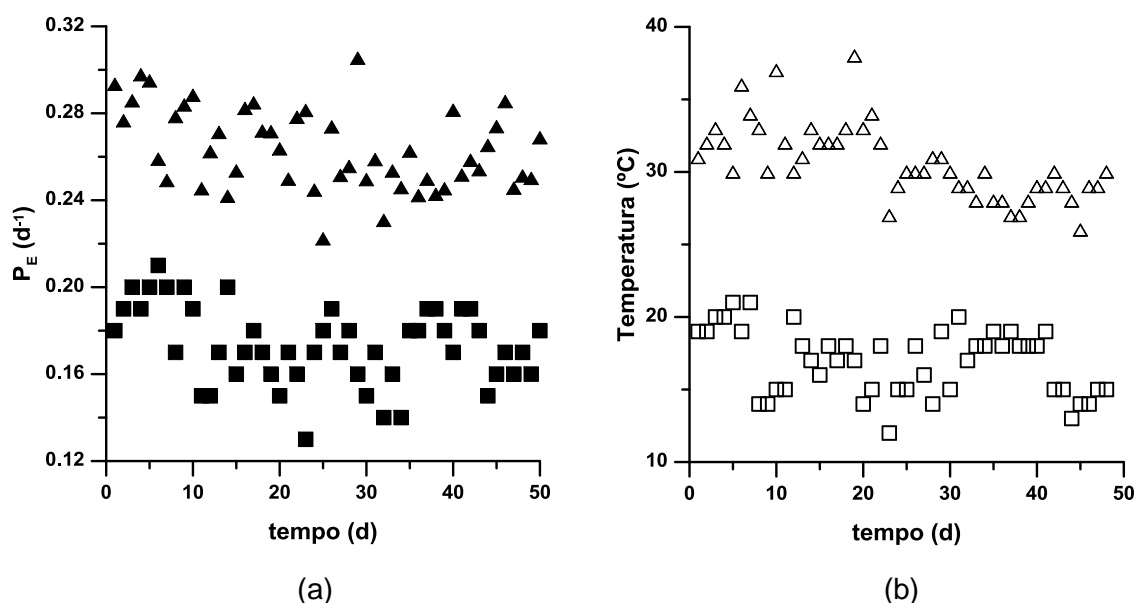


Figura 3 (a) Produção específica de biogás (P_E , d^{-1}) para o Ensaio 1 (\blacktriangle) e Ensaio 2 (\blacksquare). (b) Temperaturas registradas durante o Ensaio 1 (\triangle) e Ensaio 2 (\square).

As concentrações de CH_4 no biogás produzido no presente trabalho foram diferentes ($p < 0,05$) nos diferentes ensaios (Tabela 3) e encontram-se no intervalo 69-75 %, também observadas em outros estudos em que biomassa de microalga foi usada como substrato, destacando a potencialidade da biomassa para fornecer biogás com alto teor de metano. Zamalloa et al. (2012) estudaram digestão anaeróbia utilizando como substrato as microalgas *Scenedesmus obliquus* e *Phaeodactylum tricorutum* e obtiveram 74,3 % (v/v) e 75,1 % (v/v) de metano no biogás, respectivamente. Costa et al. (2008) utilizaram biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18 como substrato para produção de biogás a 35 °C, e obtiveram 77,67 % (v/v) de CH_4 no biogás. Comparando o teor de metano no gás obtido da digestão anaeróbia da

microalga (69-75 %) e de outros substratos, como resíduos sólidos urbanos (57-68 %, KIM et al., 2011) e dejetos bovinos e ovinos a baixas temperaturas (18-25 °C) (47-55 %, ALVAREZ; LIDÉN, 2009), observa-se que os teores de metano encontrados no presente trabalho (Tabela 3) são superiores, mesmo quando o processo foi submetido a baixas temperaturas (12-21 °C, Ensaio 3).

Tabela 3 Composição do biogás produzido na digestão anaeróbia da biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18 em escala de bancada e nos Ensaio 1 e 2.

Composição do biogás (% v/v)	Escala de bancada*	Ensaio 1 (26-38 °C)	Ensaio 2 (12-21 °C)
CH ₄	77,8 ± 0,6 ^a	74,4 ± 0,7 ^b	72,2 ± 0,5 ^c
CO ₂	22,1 ± 0,1 ^a	25,4 ± 0,1 ^b	27,6 ± 0,3 ^c
H ₂ S	0,05 ± 0,00 ^a	0,04 ± 0,00 ^a	0,05 ± 0,01 ^a
H ₂	0,01 ± 0,00 ^a	0,09 ± 0,03 ^b	0,11 ± 0,01 ^b

Letras iguais dentro de cada linha referem-se a médias estatisticamente iguais ($p > 0,05$).

*Dados para comparação (Andrade, 2009).

A composição do biogás também depende da quantidade de CO₂ dissolvido na fase líquida do sistema, através do equilíbrio $\text{CO}_{2(\text{aq})} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_3^{2-}$, que está fortemente relacionada com o pH. Segundo Sialve et al. (2009) o pH é um fator importante para que o biogás apresente elevado teor de metano. Se o pH é elevado, devido à alta alcalinidade e à liberação de NH₃, isso acarretará maior dissolução de CO₂ na fase líquida e maior concentração de CH₄ no gás.

As concentrações de CO₂ no gás diferiram significativamente ($p < 0,05$) nos 3 ensaios (Tabela 3). No Ensaio 2, realizado sob as menores temperaturas (12-21 °C), a concentração de CO₂ no gás foi maior em relação ao Ensaio 1 e escala de bancada. A temperatura é um importante fator físico-químico na digestão anaeróbia, influenciando o metabolismo bacteriano, a atividade enzimática e a solubilidade dos gases. Os melhores resultados de produção de metano são geralmente verificados a 35 °C, temperatura ótima para as bactérias metanogênicas, as mais sensíveis à temperatura no processo (ALVAREZ et al., 2006). Segundo Fernandes e Oliveira (2006), temperaturas na região psicrófila (< 20 °C) podem afetar o consumo de acetato, H₂ e CO₂ e a produção de metano pelas bactérias metanogênicas.

Uma alternativa para reduzir a concentração de CO₂ e aumentar o teor de metano no biogás é sua injeção em cultivos de algas, pois além de aumentar seu

poder calorífico, evita a emissão do CO₂ presente no mesmo para a atmosfera, devido a biofixação; e produz biomassa potencialmente aproveitável. Travieso et al. (1993) estudaram a capacidade da microalga *Arthrospira* sp. purificar biogás resultante da digestão anaeróbia de melaço. O biogás injetado continha 55-71 % (v/v) de CH₄ e, após a passagem pela cultura, o teor de metano aumentou até 88-97 % (v/v), enquanto a concentração de dióxido de carbono diminuiu para 2,5-11,5 % (v/v). Kao et al. (2012) injetaram biogás sintético contendo 71 % (v/v) CH₄ e 20 % (v/v) CO₂ em cultivo da microalga *Chlorella* sp. e obtiveram biogás com 87,4 % (v/v) de metano após passagem pelo cultivo.

As concentrações de H₂S foram iguais ($p > 0,05$) nos 3 ensaios (Tabela 3), e menores que valores encontrados na produção de biogás com outros substratos, como dejetos suínos (0,2–0,3 %, Feng et al., 2008). Biogás produzido utilizando a microalga *Spirulina* como substrato dificilmente apresentará maior concentração de H₂S quando comparado a outros substratos orgânicos, devido à biomassa microalgal apresentar mínimas quantidades de aminoácidos sulfurados (BECKER, 1988). Segundo Andrade (2009), a baixa concentração de enxofre na biomassa de *Spirulina* (0,44 %) e a forma reduzida em que se encontra em suas biomoléculas é um aspecto favorável para sua utilização como substrato para o bioprocessamento anaeróbio. Briand e Morand (1997) estudaram a produção de biogás utilizando a macroalga *Ulva*, que contém de 2,8 a 4,4 % de enxofre na biomassa, e obtiveram biogás com 2 % de H₂S, valores superiores ao encontrado no presente trabalho.

Assim como para a remoção de CO₂, uma das alternativas para a remoção de H₂S do biogás seria a injeção do gás em biorreatores com cultivos de microalgas. Travieso et al. (1993) estudou a injeção do biogás em cultivo de *Arthrospira* sp. e observaram redução de 1 % para 0,3-0,4 % (v/v) no teor de H₂S.

Como comentado anteriormente, o pH influencia na composição do biogás, cujos resultados obtidos neste trabalho estão apresentados na Tabela 4. O pH em todos os ensaios permaneceu dentro da faixa ótima para as bactérias metanogênicas que, segundo Omer e Fadalla (2003), está entre 6,8-7,5. Quedas do pH ocorrem devido à taxa de consumo de ácidos voláteis não acompanhar a taxa de produção dos mesmos, causando acúmulo de ácidos seguido de diminuição da atividade metanogênica.

Em contrapartida, a alcalinidade do meio atua na capacidade de tamponamento e neutralização dos ácidos em solução, sendo um fator de segurança a possíveis quedas de pH. Ela é oriunda principalmente do carbono inorgânico

dissolvido que estabelece o equilíbrio químico: $\text{CO}_{2(\text{aq})} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_3^{2-}$ e do nitrogênio amoniacal: $\text{NH}_4^+ \leftrightarrow \text{NH}_3 + \text{H}^+$.

Tabela 4 pH, alcalinidade e nitrogênio amoniacal durante a digestão anaeróbia da biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18 em escala de bancada e nos Ensaios 1 e 2.

	Escala de bancada*	Ensaio 1 (26-38 °C)	Ensaio 2 (12-21 °C)
pH	7,3 ± 0,1 ^a	6,9 ± 0,1 ^b	6,9 ± 0,2 ^b
Alcalinidade (mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	2247,6 ± 176,9 ^a	2248,1 ± 171,1 ^a	1706,0 ± 195,6 ^b
Nitrogênio amoniacal (mg.L ⁻¹)	740,7 ± 53,9 ^a	661,7 ± 68,7 ^b	479,3 ± 48,2 ^c

Letras iguais dentro de cada linha referem-se a médias estatisticamente iguais ($p > 0,05$).

*Dados para comparação (Andrade, 2009).

Zamalloa et al. (2012) estudaram a digestão anaeróbia da microalga *Scenedesmus obliquus* em condições mesófilas (33 °C ± 2 °C) e termófilas (54 °C ± 2 °C) e obtiveram pH na faixa de 7,2 e 7,4, respectivamente. Porém, para a digestão anaeróbia de biomassa de *Spirulina* LEB-18 nos Ensaios 1 e 2 expostos a diferentes temperaturas, o pH manteve-se em 6,9, independente da temperatura registrada, não diferindo significativamente ($p > 0,05$).

A alcalinidade no Ensaio 1 não apresentou diferença significativa quando comparada com o ensaio em escala de bancada. Já o Ensaio 2, apresentou menores valores que o Ensaio 1 e escala de bancada (Tabela 4). A diferença entre os Ensaios 1 e 2 ocorreu devido a alguns distúrbios provocados pela variação da temperatura (12-38 °C) durante a digestão anaeróbia. Mesmo assim, a alcalinidade obtida nos ensaios realizados no presente trabalho foi semelhante à obtida na digestão anaeróbia de resíduo municipal (1578-2004 mg.L⁻¹ CaCO₃) estudada por Coelho et al. (2011). Segundo Chernicharo (2007), os principais indicadores de distúrbios nos processos anaeróbios são o aumento na concentração de ácidos voláteis, acréscimo da porcentagem de CO₂ no biogás, diminuição do pH, queda na produção total de gás e diminuição na eficiência do processo. A função da alcalinidade é manter o sistema em equilíbrio, para que não varie o pH mesmo com a produção de H⁺ no meio. O principal fator de tamponamento na digestão anaeróbia é o sistema gás carbônico/bicarbonato. Uma alcalinidade adequada previne quedas de pH que, abaixo de 6,0 ocorre a rápida formação de ácidos voláteis devido ao retardo da metanogênese (como por exemplo, o resultado de uma queda de temperatura) (CHERNICHARO, 2007).

Além de ser resultante do equilíbrio químico do carbono inorgânico dissolvido a alcalinidade é resultante também da degradação de proteínas e seu aumento é proporcional à quantidade de amônia liberada (SIALVE et al., 2009). A combinação dos valores de pH e alcalinidade nos ensaios indica que a biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18 proporciona condições favoráveis para as bactérias participantes de todas as etapas envolvidas na produção do biogás. O equilíbrio na atividade da flora microbiana no sistema anaeróbio nas diferentes condições estudadas pode ser atribuído à composição da biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18. A biomassa apresenta os macronutrientes necessários ao crescimento das bactérias, como carbono, nitrogênio, fósforo e minerais, como cálcio, magnésio, ferro, zinco, cobre, cromo, manganês e potássio. Além disso, a biomassa microalgal contém vitaminas somando-se à ausência de compostos tóxicos (TOKOSOGLU; UNAL, 2003).

A concentração de nitrogênio amoniacal foi diferente nos três ensaios ($p < 0,05$) (Tabela 4). Resultados obtidos neste trabalho foram semelhantes aos alcançados por outros autores, que estudaram digestão anaeróbia de biomassa microalgal. Ras et al. (2011) durante a digestão anaeróbia da biomassa da microalga *Chlorella vulgaris* observaram concentrações de nitrogênio amoniacal de 820 mg.L⁻¹. Costa et al. (2008) utilizaram biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18 como substrato para produção de biogás e relataram concentração de nitrogênio amoniacal de 670,79 mg.L⁻¹ ± 76,46 mg.L⁻¹.

Substratos com alto teor proteico podem ser um desafio para a produção de biogás devido ao efeito inibitório do nitrogênio amoniacal (SIALVE et al., 2009). A inibição da atividade bacteriana causada pela amônia (NH₃) depende da concentração de nitrogênio amoniacal total (N-NH₄⁺) que representa a soma de NH₃ e NH₄⁺ em equilíbrio no líquido e do pH do meio. No entanto, apesar da biomassa de *Spirulina* apresentar alta concentração de proteínas (60,4 %), a concentração de nitrogênio amoniacal (479,3-740,7 mg.L⁻¹) permaneceu abaixo de valores inibitórios relatados por Angelidaki e Ahring (1993). Segundo estes autores concentrações de 3000 a 4000 mg.L⁻¹ N-NH₄, dependendo do pH, não prejudicam o processo.

3.1.5 Conclusão

A biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB-18 pode ser utilizada como substrato para produzir biogás em escala piloto e temperaturas variáveis. A digestão anaeróbia em escala piloto e operação em temperaturas não controladas entre 26-38

°C conduziram a resultados de decomposição de biomassa (73,2 %) e decomposição da fração orgânica da biomassa (82,2 %) significativamente igual aos obtidos em escala de bancada (75,7 e 83,9 %) submetido à temperatura ótima. A conversão dos sólidos voláteis da biomassa em CH₄ para ambos os ensaios (26-38 °C e 12-21 °C) foram 0,30 e 0,22 g.g⁻¹ e a concentração de metano no gás foi 74,4 % e 72,2 %, respectivamente.

A produção de biogás a partir de *Spirulina* sp. LEB-18 em ambas as temperaturas estudadas resultou em fatores físico-químicos como pH (6,9), alcalinidade (1706,0-2248,0 mg.L⁻¹ CaCO₃) e concentração de nitrogênio amoniacal (479,3-661,7 mg.L⁻¹) dentro da faixa adequada e segura para o desenvolvimento do processo anaeróbio.

Com os resultados obtidos no presente trabalho da digestão anaeróbia da biomassa de *Spirulina* em escala piloto, mesmo que em temperaturas abaixo do ótimo, foi possível levantar dados de grande importância para digestão sob condições mesofílicas e psicofílicas, demonstrando potencial para aplicação de biomassa microalgal em processos sob estas condições.

Agradecimento: Os autores agradecem à FAPERGS – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul e ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

3.1.6 Referências Bibliográficas

ANDRADE, M. R. Biosistema para produção de biomassa microalgal e biometano. Tese de Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos – FURG, Rio Grande, 2009.

ANGELIDAKI, I., AHRING, B. K. Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 38, p. 560-564, 1993.

ALVAREZ, R., LIDÉN, G. Low temperature anaerobic digestion of mixtures of llama, cow and sheep manure for improved methane production. *Biomass and Bioenergy*. v. 33, p. 527-533, 2009.

ALVAREZ, R., VILLCA, S., LIDÉN, G. Biogas production from llama and cow manure at high altitude. *Biomass and Bioenergy*. v. 30, p. 66-75, 2006.

AOAC - Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 17th ed., HORWITZ, W. ed. Maryland: Association of Official Analytical Chemists, 2000.

APHA (American Public Health Association). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. APHA-AWWAWPCF, 20th ed., Washington, DC, 1998.

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

BOUGRIER, C., ALBASI, C., DELGENÈS, J. P., CARRÈRE, H. Effect of ultrasonic, thermal and ozone pretreatments on waste activated sludge solubilisation and anaerobic biodegradability. *Chemical Engineering and Processing*. v. 45, p. 711-718, 2006.

BRIAND, X., MORAND, P. Anaerobic digestion of *Ulva* sp. 1. Relationship between *Ulva* composition and methanisation. *Journal of Applied Phycology*. v. 9, p. 511-524, 1997.

CHEN, P. H., OSWALD, W. J. Thermochemical treatment for algal fermentation. *Environment International*. v. 24, p. 889-897, 1998.

CHERNICHARO, C. A. L. *Reatores Anaeróbios*. V. 5, 2^a ed.. Editora Belo Horizonte: UFMG, 2007.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. v. 25, p. 294-306, 2007a.

COELHO, N. M. G., DROSTE, R. L., KENNEDY, K. J. Evaluation of continuous mesophilic, thermophilic and temperature phased anaerobic digestion of microwaved activated sludge. *Water Research*. v. 45, p. 2822-2834, 2011.

COSTA, J. A. V., SANTANA, F. B., ANDRADE, M. R., LIMA, M. B., FRANCK, D. T. Microalga biomass and biomethane production in the South of Brazil. *Journal of Biotechnology*. v. 4, p. 73, 2008.

FENG, C., SHIMADA, S., ZHANG, Z., MAEKAWA, T. A pilot plant two-phase anaerobic digestion system for bioenergy recovery from swine wastes and garbage. *Waste Management*. v. 28, n. 10, p. 1827-1834, 2008.

FOLCH, J., LEES, M., STANLEY, G. H. S. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. v. 226, p. 497-509, 1957.

GE, H., JENSEN, P. D., BATSTONE, D. J. Temperature phased anaerobic digestion increases apparent hydrolysis rate for waste activated sludge. *Water Research*. v. 45, p. 1597-1606, 2011.

IEA, International Energy Agency. CO₂ Emissions from fuel combustion. International Energy Agency, 2009. <http://www.iea.org/Textbase/nptoc/CO2_TOC.pdf>.

KAO, C.-Y., CHIU, S.-Y., HUANG, T.-T., DAI, L., WANG, G.-H., TSENG, C.-P., CHEN, C.-H., LIN, C.-S. A mutant strain of microalga *Chlorella* sp. for the carbon dioxide capture from biogas. *Biomass and Bioenergy*. v. 36, p. 132-140, 2012.

KAPARAJU, P., BUENDIA, I., ELLEGAARD, L., ANGELIDAKIA, I. Effects of mixing on methane production during thermophilic anaerobic digestion of manure: Lab-scale and pilot-scale studies. *Bioresource Technology*. v. 99, p. 4919-4928, 2008.

KIM, H.-W., NAM, J.-Y., SHIN, H.-S. A comparison study on the high-rate co-digestion of sewage sludge and food waste using a temperature-phased anaerobic sequencing batch reactor system. *Bioresource Technology*. v. 102, p. 7272-7279, 2011.

LIANHUA, L., DONG, L., YONGMING, S., LONGLONG, M., ZHENHONG, Y., XIAOYING, K. Effect of temperature and solid concentration on anaerobic digestion of rice straw in South China. *Int. J. Hydrogen Energy*. v. 35, p. 7261-7266, 2010.

LIU, X., GAO, X., WANG, W., ZHENG, L., ZHOU, Y., SUN, Y. Pilot-scale anaerobic co-digestion of municipal biomass waste: Focusing on biogas production and GHG reduction. *Renewable Energy*. v. 44, p. 463-468, 2012.

McKEOWN, R., HUGHES, D., COLLINS, G., MAHONY, T., O'FLAHERTY, V. Low-temperature anaerobic digestion for wastewater treatment. *Environmental Biotechnology*. v. 23, p. 444-451, 2012.

MORAIS, M. G., STILLINGS, C., DERSCH, R., RUDISILE, M., PRANKE, P., COSTA, J. A. V., WENDORFF, J. Preparation of nanofibers containing the microalga *Spirulina* (*Arthrospira*). *Bioresource Technology*. v. 101, p. 2872-2876, 2010.

NESSLER, J. A. Colorimetric determination of ammonia by Nessler reagent, *Chemisches Zentralblatt*. v. 27, p. 529-541, 1856.

OMER, A. M., FADALLA, Y. Biogas technology in Sudan. *Renewable Energy*. v. 28, p. 499-507, 2003.

ONG, H. K., GREENFIELD, P. F., PULLAMMANAPPALLIL, P. C. Effect of mixing on biomethanation of cattle-manure slurry. *Environmental Technology*. v. 23, p. 1081-1090, 2002.

RANI, R. U., KUMAR, S. A., KALIAPPAN, S., YEOM, I.-T., BANU, J. R. Low temperature thermo-chemical pretreatment of dairy waste activated sludge for anaerobic digestion process. *Bioresource Technology*. v. 103, p. 415-424, 2012.

RAS, M., LARDON, L., SIALVE, B., BERNET, N., STEYER, J. Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*. v. 102, p. 200-206, 2011.

RAZAVIARANI, V., BUCHANAN, I. D., MALIK, S., KATALAMBULA, H. Pilot scale anaerobic co-digestion of municipal wastewater sludge with biodiesel waste glycerin. *Bioresource Technology*. v. 133, p. 206-212, 2013.

SALOMONI, C., CAPUTO, A., BONOLI, M., FRANCIOSO, O., RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T., PALENZONA, D. Enhanced methane production in a two-phase anaerobic digestion plant, after CO₂ capture and addition to organic wastes. *Bioresource Technology*. v. 102, p. 6443-6448, 2011.

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

SCHENK, P. M., THOMAS-HALL, S. R., STEPHENS, E., MARX, U. C., MUSSGNUG, J. H., POSTEN, C., KRUSE, O., HANKAMER, B. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy Research*. v. 1, p. 20-43, 2008.

SIALVE, B., BERNET, N., BERNARD, O. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances*. v. 27, p. 409-416, 2009.

SOUZA, M. E. Fatores que influenciam na digestão anaeróbia. *Revista DAE*. v. 4 (137), p. 8-94, 1984.

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

- TRAVIESO, L., SANCHEZ, E. P., BENITEZ, F., CONDE, J. L. *Arthrospira* sp. intensive cultures for food and biogas purification. *Biotechnology Letters*. v. 15, p. 1091-1094, 1993.
- TOKOSOGLU, O., UNAL, M. K. Biomass nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris* and *Isochrysis galbana*. *Journal of Food Science*. v. 68, n. 4, p. 1144-1148, 2003.
- WIJFFELS, R., BARBOSA, M. An outlook on microalgal biofuels. *Science*. v. 329 p. 796-799, 2010.
- YEN, H. W., BRUNE, D. E. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. *Bioresource Technology*. v. 98, p. 130-134, 2007.
- ZAMALLOA, C., BOON, N., VERSTRAETE, W. Anaerobic digestibility of *Scenedesmus obliquus* and *Phaeodactylum tricornutum* under mesophilic and thermophilic conditions. *Applied Energy*, v. 92, p. 733-738, 2012.
- ZAMALLOA, C., VULSTEKE, E., ALBRECHT, J., VERSTRAETE, W. The techno-economic potential of renewable energy through the anaerobic digestion of microalgae. *Bioresource Technology*. v. 102, p. 1149-1158, 2011.
- ZARROUK, C. Contribution a Letude Dune Cyanophycee, Influence de Divers Facteurs physiques et Chimiques sur la Croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* geitler. Ph.D. Thesis University of Paris. 1966.

3.2 ARTIGO 2

**CULTIVO DE *SPIRULINA* SP. LEB-18 UTILIZANDO EFLUENTE DA DIGESTÃO
ANAERÓBIA**

Artigo publicado na revista Brazilian Journal of Chemical Engineering

CULTIVO DE *Spirulina* sp. LEB-18 UTILIZANDO EFLUENTE DA DIGESTÃO ANAERÓBIA

3.2.1 Resumo

A fonte de carbono é o principal componente dos custos de produção de *Spirulina*, e efluentes de digestão anaeróbia contém este nutriente como HCO_3^- . O objetivo deste trabalho foi estudar a cinética de crescimento, a composição e o perfil de ácidos graxos da microalga *Spirulina* sp. LEB-18 cultivada em meio Zarrouk (NaHCO_3 16,8 g.L^{-1}) e em meio Zarrouk modificado substituído por 20 % (v/v) de efluente com concentrações reduzidas de NaHCO_3 (5,3 e 2,8 g.L^{-1}). A utilização de efluente e menores concentrações de HCO_3^- é uma alternativa para diminuição dos custos de produção de *Spirulina*, pois não houve diferenças significativas nos parâmetros de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$ 0,324-0,354 d^{-1} ; $P_{\text{máx}}$ 0,280-0,297 $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), nos diferentes meios utilizados. Lipídios variaram entre 4,9 e 5,0 % com proporção de ácido linoleico maximizada nos meios com efluente e ácido alfa linolênico reduzida nesses meios em comparação ao meio padrão.

Palavras – chave: fonte de carbono para *Spirulina*, perfil de ácidos graxos, microalga.

Spirulina sp. LEB-18 CULTURE USING EFFLUENT FROM THE ANAEROBIC DIGESTION

Abstract

The carbon source is the most expensive nutrient for *Spirulina* production; effluents from anaerobic digestion contain this nutrient in the form of HCO_3^- . The aim of this study was to assess the growth kinetics, composition and fatty acid profile of *Spirulina* sp. LEB-18 grown in Zarrouk medium (NaHCO_3 16.8 g L^{-1}) and in Zarrouk medium modified replaced with 20 % (v/v) effluent with reduced concentrations of NaHCO_3 (5.3 and 2.8 g L^{-1}). The use of effluent and lower concentrations of HCO_3^- was found to be an alternative to reduce the costs of *Spirulina* production, because there were no significant differences in growth parameters (μ_{max} 0.324-0.354 d^{-1} ; P_{max} 0.280-0.297 $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$), in the different culture medium used. Lipids ranged between 4.9 and 5.0 %; the media with effluent had higher levels of linoleic acid compared to the standard medium.

Keywords: carbon source for *Spirulina*, fatty acid profile, microalga.

3.2.2 Introdução

Microalgas são micro-organismos fototróficos, incluindo as bactérias procarióticas fotossintéticas, denominadas cianobactérias (TOMASELLI, 2004). Esses micro-organismos têm sido explorados devido ao seu potencial para enriquecer alimentos, biofixar dióxido de carbono (MORAIS; COSTA, 2007), tratar efluentes domésticos e industriais (VALDERRAMA et al., 2002) e gerar biocombustíveis. Os biocombustíveis de microalgas, comparados com os combustíveis de primeira e segunda geração, têm a vantagem de não contribuir com o desmatamento, com o consumo excessivo de água e não competir com áreas que poderiam ser utilizadas para a produção de alimentos (COSTA; MORAIS, 2011).

Spirulina é uma cianobactéria com forma espiralada e, devido suas propriedades e alto valor nutricional da biomassa, constitui-se como uma das microalgas mais estudadas atualmente. Sua produção comercial é normalmente realizada em biorreatores abertos de até 5 hectares, com utilização de luz solar como fonte luminosa.

A produção de biogás a partir da digestão anaeróbia da biomassa de *Spirulina* é facilitada pela sua alta concentração de matéria orgânica (COSTA et al., 2008). No processo de digestão anaeróbia da biomassa é produzido um efluente contendo importantes nutrientes, como carbono, nitrogênio e fósforo, que podem ser recuperados para a produção de biomassa da microalga (CONVERTI et al., 2009).

Dentre as necessidades nutricionais para o crescimento de *Spirulina* a fonte de carbono é a principal, já que as células da microalga possuem em torno de 50 % (p/p) deste elemento em sua composição. Assim, a fonte de carbono é o principal componente dos custos de produção de *Spirulina*, e para o crescimento autotrófico, que é mais adequado para cultivos abertos em grande escala, carbono pode ser fornecido como CO₂, carbonato ou bicarbonato. Se for utilizado como bicarbonato, este representa 60 % do custo com nutrientes (ALAVA et al., 1997), o que motiva o estudo dos efeitos da redução na concentração da fonte de carbono (ANDRADE et al., 2008) e da utilização de fontes alternativas do nutriente, como melaço (ANDRADE; COSTA, 2008, 2007), CO₂ residual (FERREIRA et al., 2012) e CO₂ sintético (ROSA et al., 2011).

A concentração de carbono inorgânico dissolvido no efluente anaeróbio encontra-se em menor quantidade do que a indicada na formulação de meios de cultivo padrão para a produção de biomassa de microalgas do gênero *Spirulina*, como

o meio Zarrouk (ZARROUK, 1966). No entanto, o efluente geralmente precisa ser diluído devido aos efeitos tóxicos de altas concentrações de amônia, requerendo suplementação com carbono. Em estudos realizados com culturas de *Spirulina*, com adição de 2 g.L⁻¹ de NaHCO₃ a 2 % (v/v) de efluente anaeróbio (OLGUÍN et al., 2001), 4,5 g.L⁻¹ de NaHCO₃ em 20 % (v/v) de efluente anaeróbio (CHAIKLAHAN et al., 2010), 4–10 g.L⁻¹ de NaHCO₃, em concentrações de 0 a 100 % (v/v) de efluente anaeróbio, os melhores resultados para o crescimento microalgal foram obtidos com adição de 8 g.L⁻¹ de NaHCO₃ e 10 % (v/v) de efluente (CHEUNBARN; PEERAPORNPISAL, 2010). Porém, Radmann et al. (2007) e Andrade et al. (2008) encontraram maiores produtividades para esta microalga em meios de cultivo diluídos, abrindo assim a possibilidade de se testar baixas concentrações de carbono como complemento em meios de cultivo com efluente.

Há estudos na literatura sobre o cultivo de microalgas, tais como *Chlorella* sp. (WANG et al., 2010), *Chlorella vulgaris* (KUMAR et al., 2010a), *Scenedesmus* sp. (PARK et al., 2010) e um consórcio de microalgas (SINGH et al., 2011) em efluentes anaeróbios, mas não existem estudos sobre cultivo de microalgas em efluentes proveniente da digestão anaeróbia de sua própria biomassa. Contudo, qualquer alteração nas condições de crescimento de microalgas, como por exemplo, a fonte de nutrientes ou sua concentração no meio podem implicar em diferentes respostas cinéticas e de composição da biomassa (VONSHAK; TORZILLO, 2004). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento, composição (química e elementar) e o perfil de ácidos graxos da microalga *Spirulina* sp. LEB-18 cultivada em efluente da digestão anaeróbia.

3.2.3 Material e Métodos

Efluente de processo anaeróbio

O efluente foi obtido de um biorreator anaeróbio (310 L) para produção de biogás a partir de biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18, operado em batelada sequencial com ciclos diários de alimentação (biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18, 7,0 g.L⁻¹), reação (6 h), decantação (18 h) e esvaziamento de 10 % do volume. O efluente foi coletado diariamente e armazenado em garrafas de polietileno mantidas sob congelamento (-18 °C) até posterior utilização. Após descongelamento e

homogeneização, o efluente foi centrifugado por 30 min a 4700 xg (HITACHI CT6EL, Taiwan) para remoção de sólidos, e caracterizado.

O pH do efluente foi medido em pHmetro digital (QUIMIS Q400H, Brasil). A alcalinidade foi determinada através da titulação potenciométrica com solução de HCl (APHA, 1998). A concentração de bicarbonato foi determinada a partir dos valores de pH e alcalinidade (ANDRADE et al., 2008). O teor de nitrogênio amoniacal foi determinado pelo método de Nessler, e fosfato segundo o método do ácido ascórbico (APHA, 1998), utilizando o reagente *PhosVer 3 Phosphate Reagent Powder Pillow*.

Cultivo de *Spirulina* sp. LEB-18

Micro-organismo

O micro-organismo utilizado foi a microalga *Spirulina* sp. LEB-18 isolada da Lagoa Mangueira em Santa Vitória do Palmar, extremo Sul do Brasil (33°30'13"S; 53°08'59"W), adaptada em meio Zarrouk (ZARROUK, 1966) e em meio Zarrouk substituído por 30 % (v/v) de efluente.

Meios de cultivo

Foi realizado cultivo da *Spirulina* em meio Zarrouk (16,8 g.L⁻¹ de NaHCO₃), para efeito de comparação (Ensaio 1). Para os ensaios com uso do efluente e redução na concentração da fonte de carbono, o meio de cultivo foi composto por 20 % (v/v) de efluente e 80 % (v/v) de meio Zarrouk modificado com concentração da fonte de carbono (NaHCO₃) reduzida, para 5,3 g.L⁻¹ (Ensaio 2) e 2,8 g.L⁻¹ (Ensaio 3) de NaHCO₃ (Tabela 1).

Tabela 1 Composições dos meios de cultivo utilizadas nos experimentos.

	Ensaio		
	1	2	3
Concentração da fonte de carbono (g.L ⁻¹ NaHCO ₃)	16,8	5,3	2,8
Efluente (% v/v)	0	20	20
Meio Zarrouk (% v/v)	100	80	80

Biorreatores e condições operacionais

Foram utilizados biorreatores abertos do tipo *raceway* (Figura 1), construídos em acrílico transparente com volume total 6 L, volume útil 4 L, área superficial 0,08 m² e altura 0,05 m. A agitação foi realizada mecanicamente por pás rotativas a 17 rpm. Os biorreatores foram dispostos em estufa de filme transparente e os cultivos foram mantidos por 19 d, em modo semicontínuo com concentração celular de corte de 1,0 g.L⁻¹ e taxa de renovação de meio de 50 %.

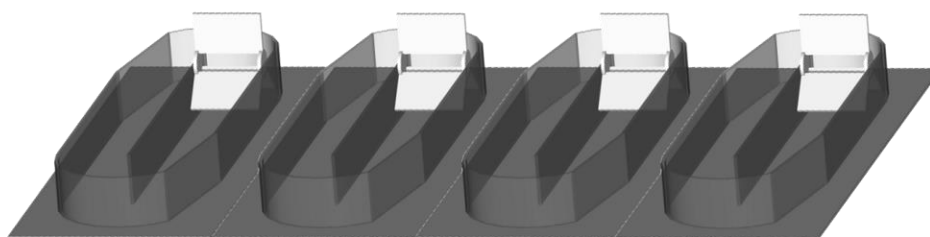


Figura 1 Desenho esquemático do biorreator tipo *raceway* de 6 L.

Determinações analíticas

A concentração de biomassa (g.L⁻¹) foi determinada diariamente por medida da densidade ótica do meio líquido em espectrofotômetro (FEMTO 700 Plus, Brasil) a 670 nm (COSTA et al., 2000), o pH foi medido em pHmetro digital (Quimis Q400H, Brasil) e a alcalinidade medida por titulação potenciométrica com solução de HCl (APHA, 1998). A temperatura ambiente e do meio foram medidas com termômetros de mercúrio.

Parâmetros de crescimento

A partir da concentração de biomassa determinada experimentalmente foram obtidas a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) por regressão exponencial da fase logarítmica da curva de crescimento (BAILEY; OLLIS, 1986); a produtividade volumétrica (P_V , g.L⁻¹.d⁻¹) (Equação 1), em que X_t (g.L⁻¹) é a concentração de biomassa no tempo t (d) e X_0 (g.L⁻¹) é a concentração de biomassa inicial no tempo t_0 (d) (SCHMIDELL et al., 2001); e a produtividade areal P_A (g.m⁻².d⁻¹) (Equação 2), que é um importante fator para a produção de biomassa em grande

escala. Na Equação 2, P_V ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) é a produtividade volumétrica, e “h” (m) é a altura da coluna de líquido no reator.

$$P_V = \left(\frac{X_t - X_0}{t - t_0} \right) \quad \text{Equação 1}$$

$$P_A = P_V * h \quad \text{Equação 2}$$

Caracterização da biomassa produzida

A biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18 produzida foi separada do meio líquido por centrifugação durante 20 min a 4700 xg (HITACHI CT6EL, Taiwan), lavada com água destilada para remoção de sais do meio de cultivo, seca a 40 °C por 48 h em estufa com circulação forçada de ar (Quimis Q314D242, Brasil) e moída para posterior caracterização.

Ao final dos cultivos, os teores de proteínas e cinzas da biomassa foram determinados conforme metodologia oficial (AOAC, 2000). Lipídios foram determinados pelo método de Folch e carboidratos foram calculados por diferença. A composição elementar (CHN) foi determinada em analisador elementar (Perkin Elmer 2400, USA) utilizando como padrão acetanilida (71,09 % carbono, 6,71 % hidrogênio e 10,36 % nitrogênio). O perfil de ácidos graxos foi determinado em cromatógrafo gasoso modelo Varian STAR 3400CX (USA) equipado com detector de ionização de chama e coluna de sílica fundida contendo fase estacionária de polietileno glicol com 30 m de comprimento e 0,32 mm de diâmetro. O gás de arraste foi nitrogênio a 0,5 mL.min⁻¹. As temperaturas do injetor e do detector foram 250 e 280 °C, respectivamente. A temperatura inicial da coluna foi 100 °C a seguir houve aumento de 8 °C.min⁻¹ até 230 °C permanecendo por 20 min. Os ácidos graxos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção com padrões e quantificados por normalização de áreas.

Os padrões de ácidos graxos utilizados (Sigma Supelco; Belle-fonte, EUA) foram ácido caproico (C6:0); ácido caprílico (C8:0); ácido cáprico (C10:0); ácido undecanoico (C11:0); ácido láurico (C12:0); ácido mirístico (C14:0); ácido miristoleico (C14:1); ácido palmítico (C16:0); ácido palmitoleico (C16:1); ácido margárico (C17:0); ácido margaroleico (C17:1); ácido esteárico (C18:0); ácido elaídico (C18:1 trans); ácido oleico (C18:1); ácido linoleico (C18:2); ácido α - linolênico (C18:3 n-3); ácido γ -

linolênico (C18:3 n-6); ácido araquídico (C20:0); ácido gadoleico (C20:1); ácido eicosadienoico (C20:2); ácido eicosatrienoico (C20:3); ácido araquidônico (C20:4); ácido eicosapentaenoico (C20:5); ácido beênico (C22:0); ácido erúcico (C22:1); ácido docosadienoico (C22:2); ácido docosahexaenoico (C22:6); ácido lignocérico (C24:0); ácido lignoceroleico (C24:1).

Análise estatística

Os efeitos causados pela utilização das diferentes concentrações de carbono sobre o crescimento e caracterização da biomassa produzida foram analisados por análise de variância (ANOVA), sendo utilizado o teste de Tukey em $p \leq 0,05$ para avaliar as diferenças significativas entre os resultados.

3.2.4 Resultados e Discussão

Caracterização do efluente anaeróbio

Efluentes de processo anaeróbio são constituídos principalmente de compostos inorgânicos, e a presença e concentração desses compostos dependem das características dos substratos e das condições de operação do processo. O alto teor de proteínas do substrato utilizado no processo de digestão anaeróbia (biomassa de *Spirulina*) resultou em baixa relação C/N no efluente (Tabela 2).

Tabela 2 Caracterização do efluente de processo anaeróbio utilizado para os cultivos de *Spirulina* sp. LEB-18.

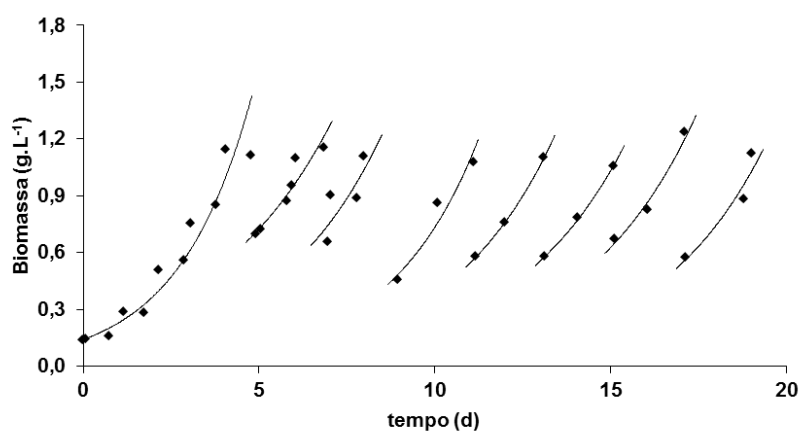
	Valor
pH	7,80 ± 0,19
Alcalinidade (mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	1427,13 ± 176,59
Bicarbonato (expresso como mg.L ⁻¹ HCO ₃ ⁻)	2383,10 ± 301,42
Nitrogênio amoniacal (mg.L ⁻¹ N-NH ₄ ⁺)	361,35 ± 61,01
Fosfato (mg.L ⁻¹ PO ₄ ³⁻)	86,01 ± 3,17
C/N (p/p)	5,49
Carbono orgânico	67,63 ± 0,99

Os valores de pH, alcalinidade e nitrogênio amoniacal determinados no efluente (Tabela 2) foram semelhantes aos encontrados por Chaiklahan et al. (2010) em efluente da digestão anaeróbia de dejetos suínos utilizado para o cultivo de *Spirulina platensis* (pH 7,97; alcalinidade 1040 mg.L⁻¹ CaCO₃ e nitrogênio amoniacal 144 mg.L⁻¹ N-NH₄), enquanto a concentração de fosfato encontrada (Tabela 2) corresponde a 32 % da concentração no meio Zarrouk. A alcalinidade no efluente deve-se principalmente à presença de carbonatos (CO₃²⁻) e bicarbonatos (HCO₃⁻) que, em cultivos de microalgas, são absorvidos a partir da conversão destes a CO₂. Carbono orgânico foi encontrado no efluente em baixa concentração (67,63 mg.L⁻¹, Tabela 2), o que é típico de efluentes anaeróbios. No entanto, com a diluição do efluente (20 %, v/v) em meio Zarrouk para a preparação dos meios de cultivo, a concentração de carbono orgânico no meio resultou na concentração de 0,07 g.L⁻¹. Devido à grande diferença entre a concentração de carbono orgânico e as concentrações da fonte de carbono inorgânico utilizado (NaHCO₃ 2,8, 5,3 e 16,8 g.L⁻¹), foi considerado neste estudo apenas o crescimento heterotrófico da microalga. A concentração de nitrogênio amoniacal no efluente corresponde à soma das espécies NH₃ e NH₄⁺ presentes. A concentração de cada espécie depende da constante de equilíbrio da reação: NH₃ + H⁺ ↔ NH₄⁺, e da temperatura e pH do meio. A forma não ionizada (NH₃), em altas concentrações, pode inibir o crescimento microalgal. Esse composto pode ser convertido a nitrato e assim ser consumido pelas microalgas. No entanto, a taxa de absorção de nitrogênio amoniacal geralmente é inferior à do nitrato devido à toxicidade da amônia (GROBBELAAR, 2004).

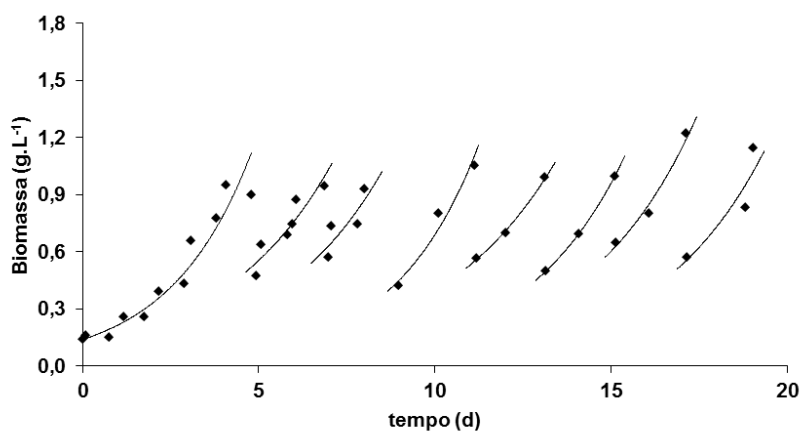
Microalgas assimilam os compostos inorgânicos de carbono (carbonatos/bicarbonatos), nitrogênio e fósforo, sendo cada vez mais objetos de estudo como alternativa para o tratamento de efluentes de processo anaeróbio. Em estudos para biorremediação de águas residuais por cianobactérias, Forlani et al. (2011) relataram a capacidade de remoção de 50 % de gêneros fosfato anti-corrosivos por culturas de *Spirulina*. Park et al. (2010) observaram crescimento semelhante de *Scenedesmus* sp. utilizando nitrogênio amoniacal e nitrato em estudo para remoção de amônia de efluente de processo anaeróbio (pH 8,4; alcalinidade 5562 mg.L⁻¹ CaCO₃ e nitrogênio amoniacal 1196 mg.L⁻¹ N-NH₄⁺).

Crescimento de *Spirulina* sp. LEB-18

Tanto no cultivo em meio Zarrouk (Figura 2a) quanto nos cultivos com utilização de efluente (Figuras 2b e 2c), a microalga apresentou crescimento imediatamente após o início dos ensaios. Não houve diferenças significativas entre os resultados de velocidade específica máxima de crescimento e produtividade máxima dos ensaios em meio Zarrouk e em meio Zarrouk modificado com efluente e redução na concentração de carbono (Tabela 3).



(a)



(b)

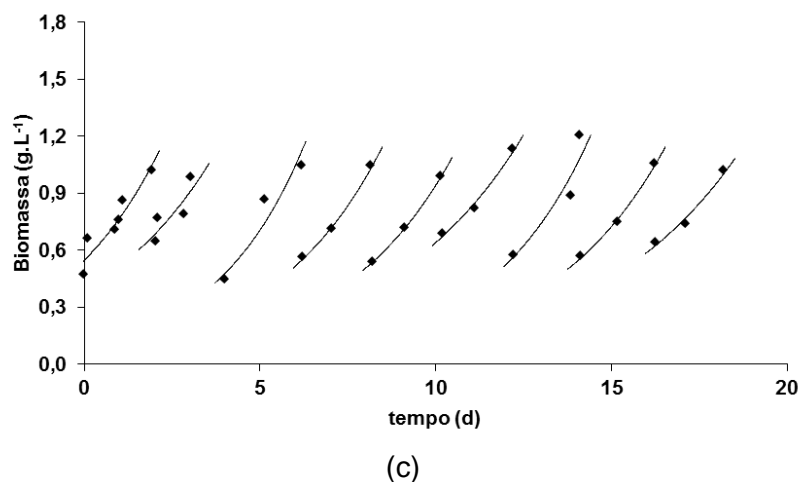


Figura 2 Curvas de crescimento de *Spirulina* sp. LEB-18 em: (a) meio Zarrouk; (b) meio Zarrouk modificado contendo 20 % (v/v) de efluente e 5,3 g.L⁻¹ de NaHCO₃; e (c) meio Zarrouk modificado contendo 20 % (v/v) de efluente e 2,8 g.L⁻¹ de NaHCO₃.

Comparando os parâmetros cinéticos de crescimento de *Spirulina* sp. LEB-18 (Tabela 3) com os resultados obtidos em outros trabalhos que utilizaram efluentes anaeróbios e/ou redução na concentração da fonte de carbono para cultivo da microalga, verificou-se que as produtividades volumétricas P_V obtidas neste trabalho (0,280 g.L⁻¹.d⁻¹) foram maiores. Andrade et al. (2008) cultivaram *Spirulina* sp. LEB-18 em meio Zarrouk contendo 2,8 g.L⁻¹ de bicarbonato e obteve produtividade volumétrica P_V de 0,145 g.L⁻¹.d⁻¹. As microalgas *Chlorella sorokiniana*, *Scenedesmus bijuga* e *Chlorella minutissima* foram cultivadas em 6 % (v/v) de efluente proveniente de estrume de galinha diluído em água deionizada, e foram obtidas P_V entre 0,063-0,076 g.L⁻¹.d⁻¹ (SINGH et al., 2011); *Spirulina* sp. foi cultivada em 2 % (v/v) de efluente do processo anaeróbio de dejetos suíno e obteve-se P_V de 0,182 g.L⁻¹.d⁻¹ (OLGUÍN et al., 1997); cultivo de diferentes microalgas em esgotos municipais utilizados para produção de biocombustíveis, foram obtidos valores de P_V entre 0,120-0,275 g.L⁻¹.d⁻¹ (ZHOU et al., 2011).

A produtividade areal (P_A) obtida neste trabalho foi de aproximadamente 14,00-14,85 g.m⁻².d⁻¹, apresentando-se menor que em estudos anteriores. *Spirulina platensis* cultivada em modo semicontínuo, em meio contendo 20 % (v/v) de efluente, 4,5 g.L⁻¹ de NaHCO₃ e 0,2 g.L⁻¹ de ureia forneceu $P_{A \text{ máx}}$ 19,9 g.m⁻².d⁻¹ (CHAIKLAHAN et al., 2010). Para o cultivo descontínuo de *Spirulina platensis*, Mezzomo et al. (2010) utilizaram efluente suíno encontrando $\mu_{\text{máx}}$ 0,415 d⁻¹ em meio 8,5 % (v/v) de efluente e 6,5 g.L⁻¹ de NaHCO₃. Sem utilizar efluentes anaeróbios, o cultivo descontínuo de

Spirulina platensis em meio Schlösser modificado (sem NaHCO_3 e Na_2CO_3) e CO_2 como única fonte de carbono, forneceu $P_{A \text{ máx}}$ $22,3 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ e $\mu_{\text{máx}}$ $0,25 \text{ d}^{-1}$ (BINAGUI et al., 2003).

Tabela 3 Parâmetros cinéticos nos cultivos da microalga *Spirulina* sp. LEB-18.

Ensaio	$\mu_{\text{máx}} \text{ (d}^{-1}\text{)}$	$P_{V \text{ máx}} \text{ (g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}\text{)}$	$P_{A \text{ máx}} \text{ (g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}\text{)}$
1	$0,325 \pm 0,064^a$	$0,297 \pm 0,071^a$	$14,85 \pm 3,55^a$
2	$0,354 \pm 0,060^a$	$0,280 \pm 0,054^a$	$14,45 \pm 2,70^a$
3	$0,324 \pm 0,055^a$	$0,280 \pm 0,064^a$	$14,00 \pm 3,20^a$

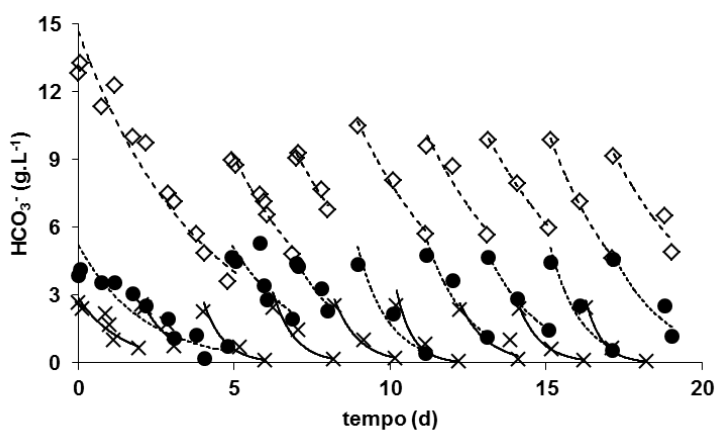
$\mu_{\text{máx}}$: Velocidade específica máxima de crescimento; $P_{V \text{ máx}}$: produtividade máxima volumétrica; $P_{A \text{ máx}}$: produtividade máxima areal. Ensaio 1: Cultivo em meio Zarrouk; 2: Cultivo em meio Zarrouk modificado contendo 20 % (v/v) de efluente e $5,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaHCO_3 ; 3: Cultivo em meio Zarrouk modificado contendo 20 % (v/v) de efluente e $2,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaHCO_3 . Letras sobrescritas iguais na mesma coluna indicam que os resultados não apresentam diferença significativa a $p \leq 0,05$.

De acordo com Lee (2001) produtividades areais de $40 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ foram encontradas em cultivos experimentais, porém, normalmente, são relatadas $P_{A \text{ máx}}$ entre $20\text{-}25 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ em biorreatores *raceway*. No entanto, a altura da coluna de líquido nos biorreatores *raceway* utilizados em escala experimental (50 mm), são bem menores que as alturas da coluna de líquido em reatores deste tipo para cultivo em grande escala, que alcançam 400-500 mm, resultando em maiores produtividades areais. Em resultados citados por Lee (2001), *Spirulina maxima* alcançou $P_{V \text{ máx}}$ $0,18 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (menor que os resultados encontrados neste trabalho), e $P_{A \text{ máx}}$ $27 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ (maior que os resultados encontrados neste trabalho).

A temperatura e o pH são alguns dos fatores que podem influenciar o crescimento e a composição das microalgas, além da disponibilidade de nutrientes, salinidade e intensidade da luz (HU, 2004). Os valores de pH nos cultivos com utilização de efluente no meio (Ensaio 2 e 3) tiveram maiores faixas de variação (9,3-11,5 e 9,5-11,8, respectivamente) que no cultivo em meio Zarrouk (Ensaio 1) que variou entre 9,2-10,5 (Figura 3b). A temperatura ambiente variou entre 26 e 44 °C, enquanto as temperaturas do meio líquido nos cultivos variaram entre 25 e 37 °C, contemplando o intervalo ótimo para o crescimento de *Spirulina*, que, de acordo com Tomaselli (1997), está entre 30 e 35 °C. Richmond e Grobbelaar (1986) relatam valores de pH ideais para a microalga entre 9,5 e 10,5. Tais valores são ratificados por estudos sobre os efeitos desses dois fatores na produção de *Spirulina*, nos quais

foram observadas maiores concentrações de biomassa em pH 10,0 (ÇELEKLI et al., 2009) e temperatura de 30 °C (OGBANDA et al., 2007). Rafiqul et al. (2005) também estudaram os efeitos desses dois fatores, encontrando maior crescimento de *Spirulina platensis* em pH 9,0 e temperatura de 32 °C.

Embora o pH nos cultivos com utilização de efluente (Ensaio 2 e 3) tenha atingido valores superiores (11,5 e 11,8) aos valores ótimos encontrados na literatura (9,5-10,5), o crescimento da microalga nesses ensaios foi semelhante ao ensaio em meio de cultivo padrão. À medida que ocorre o aumento da concentração de biomassa (Figura 2), a concentração de bicarbonato diminui (Figura 3a), devido ao seu consumo pela microalga, e há um aumento nos valores de pH (Figura 3b). Esse aumento ocorre devido ao consumo de carbono pelas microalgas ser realizado essencialmente a partir do CO_2 , que é a espécie química com menor resistência à difusão através das membranas celulares (GIORDANO et al., 2005; MILLER; COLMAN, 1980). Como as espécies químicas de carbono inorgânico em meio aquoso participam do equilíbrio $\text{CO}_{2(\text{aq})} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_3^{2-}$, o consumo de CO_2 faz com que o sistema reaja no sentido de sua formação, consumindo íons H^+ do meio e, conseqüentemente, aumentando o pH. Assim, quanto mais elevada a atividade fotossintética, maior incremento nos valores de pH, fato observado nos cultivos com utilização de efluente e concentrações reduzidas de carbono (Ensaio 2 e 3). Os altos valores de pH também implicam em menores perdas de carbono inorgânico para a atmosfera, pois para valores de pH acima de 10,5 a espécie química dominante no equilíbrio passa a ser o CO_3^{2-} , havendo menor concentração de CO_2 no meio e, portanto, menor o gradiente de concentração de CO_2 entre o meio e a atmosfera, que impulsiona a perda do gás (ANDRADE et al., 2008).



(a)

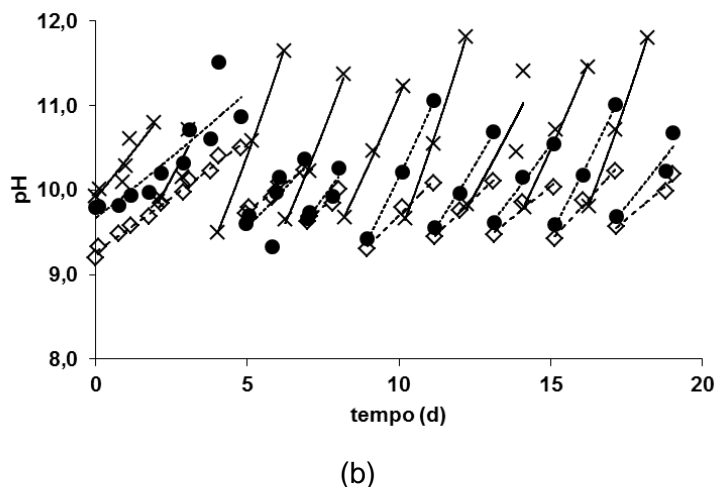


Figura 3 Variação da concentração de HCO_3^- (a) e pH (b) dos cultivos de *Spirulina* sp.

LEB-18 em: meio Zarrowk (◇); meio Zarrowk modificado contendo 20 % (v/v) de efluente e $5,3 \text{ g.L}^{-1}$ de NaHCO_3 (●); e meio Zarrowk modificado contendo 20 % (v/v) de efluente e $2,8 \text{ g.L}^{-1}$ de NaHCO_3 (x).

Em relação à caracterização da biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18, não houve diferença no teor de proteínas na biomassa cultivada, sendo acima de 60 % em todas as condições experimentais (Tabela 4). A concentração de proteínas pode atingir até 74 % do peso seco da microalga *Spirulina* (COHEN, 1997). Em estudo para remoção de nutrientes de águas residuais por meio de microalgas imobilizadas, Ruíz-Marín et al. (2010) relatam, inclusive, um aumento no teor de proteínas da biomassa de *Scenedesmus obliquus* cultivada em modo semicontínuo (30 %), quando comparado à biomassa da microalga cultivada em modo descontínuo (16 %). Os altos teores de proteínas nos ensaios com efluente são superiores aos encontrados por Colla et al. (2007) (57,6 %) e Rafiqul et al. (2005) (58,6 %) ao produzirem *Spirulina platensis* em meio Zarrowk e temperaturas de 30 e 32 °C, respectivamente. No entanto, Olgúin et al. (2001) observaram um decréscimo de 46 % no teor de proteínas de *Spirulina* sp. cultivada com 2 % de efluente de processo anaeróbico em relação à biomassa produzida em meio Zarrowk.

Embora a concentração da fonte de carbono nos cultivos com efluente (Ensaio 2 e 3) tenha sido reduzida para 31,6 % e 16,7 % da concentração no meio Zarrowk (Ensaio 1), a concentração de carbono elementar na biomassa foi 95,1 % e 91,6 %, respectivamente, da concentração encontrada na biomassa cultivada em meio Zarrowk (Tabela 4).

Tabela 4 Caracterização da biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18 produzida.

Biomassa	Proteínas (%)	Lipídios (%)*	Carboidratos (%)	Cinzas (%)	C (%)*	H (%)*	N (%)*
1	62,3 ± 0,8 ^{a,b}	4,9	21,6 ± 1,5	11,2 ± 1,2 ^b	45,3	9,4	9,8
2	63,6 ± 0,3 ^a	5,0	15,2 ± 0,4	16,2 ± 0,3 ^a	43,1	9,2	8,9
3	60,3 ± 2,6 ^b	5,0	19,1 ± 2,6	15,6 ± 0,2 ^a	41,5	8,7	8,7

1: Cultivo em meio Zarrouk; 2: Cultivo em meio Zarrouk modificado contendo 20 % (v/v) de efluente e 5,3 g.L⁻¹ de NaHCO₃; 3: Cultivo em meio Zarrouk modificado contendo 20 % (v/v) de efluente e 2,8 g.L⁻¹ de NaHCO₃. *: Determinação realizada sem réplicas. Letras sobrescritas iguais na mesma coluna indicam que os resultados não apresentam diferença significativa a $p \leq 0,05$.

A alta concentração de matéria orgânica na biomassa microalgal produzida (88,8 %, Ensaio 1; 83,8 %, Ensaio 2; 84,4 %, Ensaio 3) possibilita a sua utilização para a produção de biogás, processo pelo qual micro-organismos anaeróbios decompõem a fração orgânica da biomassa produzindo CH₄ e CO₂. No entanto, outro fator a ser considerado na digestão anaeróbia é a relação C/N, em que os valores adequados para o processo estão entre 20 e 30 (YANG et al., 2009). Essa relação na biomassa produzida variou entre 4,62 (p/p) (Ensaio 1) e 4,84 (p/p) (Ensaio 2), sendo estes valores característicos de biomassas com alto teor de proteínas. Ainda assim, Costa et al. (2008), utilizando biomassa de *Spirulina* com razão C/N 4,37, produziram biogás com 78 % de CH₄.

O teor lipídico (Tabela 4) foi semelhante em todas as condições experimentais. O teor de lipídios em biomassa de *Spirulina* produzida em condições ótimas varia entre 6 e 13 % (COHEN, 1997) e pode ser manipulado através da concentração de nitrogênio no meio, temperatura e salinidade (COLLA et al., 2004). Olgúin et al. (2001) produziram *Spirulina* sp. em água do mar enriquecida com 2 % (v/v) de efluente de dejetos suínos e iluminância de 66 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, obtendo 28,6 % de lipídios, enquanto o cultivo em meio Zarrouk forneceu 8,0 % de lipídios.

O perfil de ácidos graxos da biomassa produzida (Tabela 5) apresentou predominância de ácido palmítico (C16:0) (37,77 %, Ensaio 1; 38,48 %, Ensaio 2; 36,70 %, Ensaio 3). Nas três condições experimentais, foi detectada a presença dos ácidos graxos linoleico (C18:2c ω -6) e γ -linolênico (C18:3 ω -6) sendo encontrados maiores teores de ácido linoleico nos ensaios com utilização de efluente (Ensaio 2 e 3). Resultados semelhantes foram encontrados por Olgúin et al. (2001) que detectaram 44,0 % de ácido palmítico em *Spirulina* sp. cultivada em meio Zarrouk e

43,4 % em meio com efluente; altas proporções de ácido γ -linolênico e queda deste valor em meio com efluente (28,1 %) comparado ao valor encontrado em meio Zarrouk (31,2 %).

Tabela 5 Perfil de ácidos graxos (%) da biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18 produzida em meio Zarrouk (1), 20 % (v/v) de efluente e 5,3 g.L⁻¹ de NaHCO₃ (2) e 20 % (v/v) de efluente e 2,8 g.L⁻¹ de NaHCO₃ (3).

	Ensaio		
	1	2	3
Ácidos graxos saturados			
C10:0	2,90	5,32	1,72
C12:0	ND	ND	0,28
C13:0	ND	ND	0,73
C14:0	1,27	ND	1,48
C15:0	0,33	ND	0,55
C16:0	37,77	38,48	36,70
C20:0	1,28	ND	0,50
Ácidos graxos monoinsaturados			
C14:1	ND	ND	0,22
C15:1	1,86	ND	1,69
C16:1	9,8	7,73	9,33
C18:1c	1,01	3,36	1,90
C18:1t	1,74	4,93	2,66
Ácidos graxos poli-insaturados			
C18:2c (ω -6)	10,83	14,24	12,94
C18:2t (ω -6)	7,24	12,88	12,10
C18:3 (ω -6)	6,00	5,34	5,76
C18:3 (ω -3)	11,97	5,78	7,53
C20:2	1,77	ND	0,60
C20:3 (ω -6)	0,86	ND	0,61
C20:3 (ω -3)	1,25	ND	0,93
C20:4 (ω -6)	ND	ND	0,29
C22:2	1,67	1,93	1,47

C10:0, ácido decanoico (cáprico); C12:0, ácido duodecanoico (láurico); C13:0, ácido tridecanoico; C14:0, ácido tetradecanoico (mirístico); C15:0, ácido pentadecanoico; C16:0, ácido hexadecanoico (palmítico); C20:0, ácido eicosanoico (araquídico); C14:1, ácido *cis*-9-

tetradecaenoico (miristoleico); C15:1, ácido *cis*-9-pentadecaenoico; C16:1, ácido *cis*-9-hexadecaenoico (palmitoleico); C18:1c, ácido *cis*-9-octadecaenoico (oleico); C18:1t, ácido *trans*-9-octadecaenoico (elaídico); C18:2c ω -6, ácido *cis*-9, *cis*-12-octadecadienoico (linoleico); C18:2t ω -6, ácido *trans*-9, *trans*-12-octadecadienoico (linolelaídico); C18:3 ω -6, ácido 6,9,12-octadecatrienoico (γ -linolênico); C18:3 ω -3, ácido 9,12,15-octadecatrienoico (α -linolênico); C20:2, ácido 8,11-eicosadienoico; C20:3 ω -6, ácido 5,8,11-eicosatrienoico; C20:3 ω -3, ácido 8,11,14-eicosatrienoico; C20:4 ω -6, ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico (araquidônico); C22:2, ácido docosadienóico; ND: não detectado.

A microalga *Spirulina* é uma conhecida fonte de ácidos graxos essenciais, principalmente do ácido γ -linolênico. Nos ensaios com efluente (Ensaio 2 e 3) 19,6 e 18,7 % dos ácidos graxos foi composto pela soma dos ácidos graxos linoleico e γ -linolênico.

No grupo dos ácidos graxos ω -6 (ômega-6), o principal ácido graxo é linoleico (C18:2c), pois a partir deste os mamíferos sintetizam outros ácidos graxos como o γ -linolênico (C18:3 ω -6) e araquidônico (C20:4 ω -6); enquanto no grupo dos ω -3 (ômega-3), o ácido graxo essencial responsável pela síntese de outros ácidos graxos de cadeia mais longa é o α -linolênico (C18:3 ω -3). Esse bioprecursor de ácidos graxos ω -3 está presente em peixes, plantas e algas, e nos mamíferos é o precursor dos ácidos EPA (C20:5 ω -3) e DHA (C22:6 ω -3). O ácido α -linolênico foi o ácido graxo em maior proporção na biomassa produzida em meio Zarrouk (Ensaio 1) (Tabela 5). Ácido araquidônico foi detectado (0,29 %) na biomassa de *Spirulina* produzida com efluente e a menor concentração da fonte de carbono testada (2,8 g.L⁻¹ NaHCO₃, Ensaio 3).

As proporções de ácidos graxos ômega-6 (ω -6) e ômega-3 (ω -3) encontradas no óleo da biomassa foram de 2:1 (Ensaio 1), 6:1 (Ensaio 2) e 4:1 (Ensaio 3). Segundo a WHO (World Health Organization) e a FAO (Food and Agriculture Organization) WHO/FAO (1995), a proporção recomendada de ω -6: ω -3 para nutrição humana está entre 5:1 e 10:1.

A utilização de meio Zarrouk substituído por 20 % de efluente e 2,8 g.L⁻¹ de NaHCO₃ (Ensaio 3) resultou em maior concentração de ácidos graxos insaturados (AGI, 58,03 %) e poli-insaturados (AGPI, 42,23 %). Esses resultados foram superiores aos encontrados por Radmann e Costa (2008), com 53,51 % de AGI e 29,37 % de AGPI na biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18 cultivada com os gases CO₂, SO₂ e NO em fotobiorreatores tubulares em série; e por Morais e Costa (2008a), com 37,50 % de AGI e 9,60 % de AGPI, ao cultivar a microalga substituindo a fonte de carbono padrão (NaHCO₃) por 6 % (v/v) de CO₂.

Embora os ácidos graxos insaturados apresentem grande importância nutricional, a presença de ácidos graxos insaturados é indesejada para a produção de biodiesel devido às suas características de alta volatilidade, pouca estabilidade à oxidação e tendência à formação de gomas (HALIM et al., 2011). Ao contrário da maioria dos óleos vegetais, óleos de microalgas, geralmente contêm maiores concentrações de ácidos graxos insaturados e baixa estabilidade oxidativa dos ácidos graxos insaturados com menor número de ligações duplas (por exemplo, ácido linoleico e linolênico) (CHISTI, 2007a). A biomassa de *Spirulina* produzida nas diferentes condições apresentou entre 56,00 % (Ensaio 1) e 58,03 % (Ensaio 3) de ácidos graxos insaturados no perfil. Apenas um ácido graxo insaturado com quatro ligações duplas foi encontrado (0,29 % C20:04 ω -6; ensaio 3). Resultados semelhantes foram obtidos por Halim et al. (2011), que avaliaram o perfil de ácidos graxos da microalga *Chlorococcum* sp. para produção de biodiesel, encontrando C18:1 (63 %), C16:0 (19 %), C18:2 (4 %), C16:1 (4 %) e C18:0 (3 %).

No presente trabalho, a biomassa de *Spirulina* produzida apresentou baixa concentração de lipídios (5,0 %). Segundo a literatura, outras microalgas apresentam maior teor de lipídios como *Scenedesmus obliquus* (58,3 %) (MANDAL; MALLICK, 2009), *Choricystis minor* (60,0 %) (SOBCZUK; CHISTI, 2010), *Nannochloropsis oculata* NCTU-3 (50,4 %) (CHIU et al., 2009) e *Chlorella protothecoides* (55,2 %) (XU et al., 2006). Além do teor de lipídios, outros fatores devem ser considerados na escolha da microalga para a produção de biodiesel, como a produtividade, a capacidade de crescer em condições ambientais específicas, facilidade de recuperação da biomassa a partir do meio líquido e a composição do óleo (AMARO et al., 2011). A obtenção de lipídios de microalgas para produção de biodiesel vem sendo amplamente estudada, com foco na redução dos custos de produção da biomassa e manipulação das condições de cultivo para maximização do teor lipídico. Neste contexto, a utilização do efluente anaeróbico para o cultivo de microalgas é uma alternativa para redução de custos com nutrientes para produção de *Spirulina*.

3.2.5 Conclusão

A redução na concentração da fonte de carbono (NaHCO_3) e a complementação do meio com efluente anaeróbico para o cultivo semicontínuo de *Spirulina* sp. LEB-18 é uma alternativa para redução dos custos com nutrientes e

obtenção de biomassa com cinética de crescimento e composição semelhante às obtidas em meio Zarrouk.

Os cultivos semicontínuos de *Spirulina* sp. LEB-18 com 20 % (v/v) de efluente anaeróbio e redução na concentração da fonte de carbono (NaHCO_3 2,8 e 5,3 g.L^{-1}) apresentaram velocidade específica máxima de crescimento entre 0,324 e 0,354 d^{-1} , produtividade volumétrica entre 0,280 e 0,297 $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e produtividade areal entre 14,00 e 14,85 $\text{g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$, sem diferenças significativas entre as condições estudadas. A biomassa de *Spirulina* produzida com efluente e a maior redução na concentração de carbono (NaHCO_3 2,8 g.L^{-1}) apresentou 5,0 % de lipídios, alto teor proteico (60,3 %), perfil de ácidos graxos com 41,96 % de ácidos graxos saturados, 42,23 % de poli-insaturados, e 12,94 % de ácido graxo essencial linoleico.

Os resultados obtidos no presente trabalho contemplam a capacidade de utilização da biomassa de *Spirulina* produzida como fonte de biocombustíveis, com destaque para o biogás devido à alta concentração de matéria orgânica encontrada, para a produção de biodiesel, e para a extração de ácidos graxos. Embora a alta concentração de proteínas na biomassa, seu uso como fármacos e alimento deve atender à legislação, incluindo análises de composição e microbiológica.

Agradecimento: Os autores agradecem ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, à FAPERGS - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, à CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e ao PROBIC-FURG - Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica - pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

3.2.6 Referências Bibliográficas

ALAVA, D., MELLO, P. C., WAGENER, K. The relevance of the CO_2 partial pressure of sodium bicarbonate solutions for the mass cultivation of the microalga *Spirulina*. Journal of the Brazilian Chemical Society. v. 8 (5), p. 447-450, 1997.

AMARO, H. M., GUEDES, A. C., MALCATA, F. X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. Applied Energy. v. 88 (10), p. 3402-3410, 2011.

ANDRADE, M. R., CAMERINI, F. V., COSTA, J. A. V. Perda química de carbono e cinética do crescimento celular em cultivos de *Spirulina*. Química Nova. v. 31 (8), p. 2031-2034, 2008.

ANDRADE, M. R., COSTA, J. A. V. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. Ciência e Agrotecnologia. v. 32 (5), p.1551-1556, 2008.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists), Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 17th ed., Horwitz, W., Maryland, 2000.

APHA (American Public Health Association), Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. APHA-AWWAPCF, 20th ed., Washington, 1998.

BAILEY, J. E., OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals, 2th ed., Singapore: McGraw-Hill, 1986.

BELAY, A. Mass Culture of *Spirulina* Outdoors – The Earthrise farms experience. In: Vonshak, A., *Spirulina platensis (Arthrospira)* Physiology, cell-biology and biotechnology, Ed. Taylor & Francis, London, 1997.

BINAGHI, L., DEL BORGHI, A., LODI, A., CONVERTI, A., DEL BORGHI, M. Batch and fed-batch uptake of carbon dioxide by *Spirulina platensis*. Process Biochemistry. v. 38 (9), p. 1341-1346, 2003.

CHAIKLAHAN, R., CHIRASUWAN, N., SIANGDUNG, W., PAITHOONRANGSARID, K., BUNNAG, B. Cultivation of *Spirulina platensis* using pig wastewater in a semi-continuous process. Journal of Microbiology and Biotechnology. v. 20 (3), p. 609-614, 2010.

CHEUNBARN, S., PEERAPORNPISAL, Y. Cultivation of *Spirulina platensis* using anaerobically swine wastewater treatment effluent. International Journal of Agriculture & Biology. v. 12 (4), p. 586-590, 2010.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances. v. 25, p. 294-306, 2007a.

CHIU, S. Y., KAO, C. Y., TSAI, M. T., ONG, S. C., CHEN, C. H., LIN, C. S. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. Bioresource Technology. v. 100, p. 833-838, 2009.

COHEN, Z. The chemicals of *Spirulina*. In: Vonshak, A., *Spirulina platensis (Arthrospira)* Physiology, cell-biology and biotechnology, Ed. Taylor & Francis, London, 1997.

COLLA, L. M., REINEHR, C. O., REICHERT, C., COSTA, J. A. V. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresource Technology*. v. 98, p. 1489-1493, 2007.

COLLA, L. M., BERTOLIN, T. E., COSTA, J. A. V. Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. *Zeitschrift Für Naturforschung* v. 59, p. 55-59, 2004.

CONVERTI, A., OLIVEIRA, R. P. S., TORRES, B. R., LODI, A., ZILLI, M. Biogas production and valorization by means of a two steps biological process. *Bioresource Technology*. v. 100, p. 5771-5776, 2009.

COSTA, J. A. V., MORAIS, M. G. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. *Bioresource Technology*. v. 102, p. 2-9, 2011.

COSTA, J. A. V., SANTANA, F. B., ANDRADE, M. R., LIMA, M. B. AND FRANCK, D. T. Microalga biomass and biomethane production in the south of Brazil. *Journal of Biotechnology*. v. 136, p. S430, 2008.

COSTA, J. A. V., LINDE, G. A., ATALA, D. I. P., MIBIELLI, G. M., ARRIECHE, L., KRÜGER, R. T. Modelling of growth conditions for cyanobacterium *Spirulina platensis* in microcosms. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. v. 16 (1), p. 15-18, 2000.

ÇELEKLI, A., YAVUZATMACA, M., BOZKURT, H. Modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of phosphate concentrations and pH regimes. *Bioresource Technology*. v. 100, p. 3625-3629, 2009.

FERREIRA, L. S., RODRIGUES, M. S., CONVERTI, A.; SATO, S., CARVALHO, J. C. M. *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivation in tubular photobioreactor: use o no-cost CO₂ ethanol fermentation. *Applied Energy*. v. 92, p. 379-385, 2012.

FORLANI, G., PREARO, V., WIECZOREK, D., KAFARSKI, P., LIPOK, J. Phosphonate degradation by *Spirulina* strains: Cyanobacterial biofilters for the removal of anticorrosive polyphosphonates from wastewater. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 48 (3), p. 299-305, 2011.

GIORDANO, M., BEARDALL, J., RAVEN, J. A. CO₂ concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental, modulation, and evolution. *Annual Review of Plant Biology*. v. 56, p. 99-131, 2005.

- GROBBELAAR, J. U. Algal Nutrition: mineral nutrition. In: Richmond, A., Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. USA: CRC Press. p. 577, 2004.
- HALIM, R., GLADMAN, B., DANQUAH, M. K., WEBLEY, P. A. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. Bioresource Technology. v. 102, p. 178-185, 2011.
- HU, Q. Environmental effects on cell composition. In: Richmond, A., Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. USA: CRC Press. p. 577, 2004.
- KUMAR, M. S., MIAO, Z. H., WYATT, S. K. Influence of nutrient loads, feeding frequency and inoculum source on growth of *Chlorella vulgaris* in digested piggery effluent culture medium. Bioresource Technology. v. 101, p. 6012-6018, 2010a.
- KUMAR, A., YUAN, X., SAHU, A. K., ERGAS, S. J., VAN LANGENHOVE, H., DEWULF, J. A hollow fiber membrane photo-bioreactor for CO₂ sequestration from combustion gas coupled with wastewater treatment: a process engineering approach. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. v. 85, p. 387-394, 2010b.
- LEE, Y. K. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. Journal of Applied Phycology. v. 13 (4), p. 307-315, 2001.
- MANDAL, S., MALLICK, N. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. Applied Microbiology and Biotechnology. v. 84 (2), p. 281-291, 2009.
- MEZZOMO, N., SAGGIORATO, A. G., SIEBERT, R., TATSCH, P. O., LAGO, M. C., HEMKEMEIER, M., COSTA, J. A. V., BERTOLIN, T. E., COLLA, L. M. Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater. Ciência e Tecnologia de Alimentos. v. 30 (1), p. 173-178, 2010.
- MILLER, A. G., COLMAN, B. Evidence for HCO₃⁻ transport by the blue-green alga (Cyanobacterium) *Coccochloris peniocystis*. Plant Physiology. v. 65 (2), p. 397-402, 1980.
- MORAIS, M. G., COSTA, J. A. V. Perfil de ácidos graxos de microalgas cultivadas com dióxido de carbono. Ciência e Agrotecnologia. v. 32, (4), p. 1245-1251, 2008a.
- 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. Biotechnology Letters. v. 29 (9), p. 1349-1352, 2007.

OGBONDA, K. H., AMINIGO, R. E., ABU, G. O. Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina* sp. *Bioresource Technology*. v. 98, p. 2207-2211, 2007.

OLGUÍN, E. J., GALICIA, S., ANGULO-GUERRERO, O., HERNÁNDEZ, E. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on digested pig waste. *Bioresource Technology*. v. 77, p. 19-24, 2001.

OLGUÍN, E. J., GALICIA, S., CAMACHO, R., MERCADO, G., PÉREZ, T. J. Production of *Spirulina* sp. in sea water supplemented with anaerobic effluents in outdoor raceways under temperate climatic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 48 (2), p. 242-247, 1997.

PARK, J., JIN, H. F., LIM, B. R., PARK, K. Y., LEE, K. Ammonia removal from anaerobic digestion effluent of livestock waste using green alga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*. v. 101, p. 8649-8657, 2010.

RADMANN, E. M., COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. *Química Nova*. v. 31 (7), p. 1609-1612, 2008.

RADMANN, E. M., REINEHR, C. O., COSTA, J. A. V. Optimization of the repeated batch cultivation of microalga *Spirulina platensis* in open raceway ponds. *Aquaculture*. v. 265, p. 118-126, 2007.

RAFIQUL, I. M., JALAL, K. C. A., ALAM, M. Z. Environmental factors for optimization of *Spirulina* biomass in laboratory culture. *Biotechnology*. v. 4 (1), p. 19-22, 2005.

RICHMOND, A., GROBBELAAR, J. U. Factors affecting the output rate of *Spirulina platensis* with reference to mass cultivation. *Biomass*. v. 10, p. 253-264, 1986.

ROSA, A. P. C., CARVALHO, L. F., GOLDBECK, L., COSTA, J. A. V. Carbon dioxide fixation by microalgae cultivated in open bioreactors. *Energy Conversion and Management*. v. 52, p. 3071-3073, 2011.

RUÍZ-MARÍN, A., MENDOZA-ESPINOSA, L. G., STEPHENSON, T. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology*. v. 101, p. 58-64, 2010.

SCHMIDELL, W., LIMA, A. U., AQUARONE, E., BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial*, 2, São Paulo: Edgard Blücher LTDA. p. 535, 2001.

SINGH, M., REYNOLDS, D. L., DAS, K. C. Microalgal system for treatment of effluent from poultry litter anaerobic digestion. *Bioresource Technology*. v. 102, p. 10841-10848, 2011.

SOBCZUK, T. M., CHISTI, Y. Potential fuel oils from the microalga *Choricystis minor*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. v. 85, p. 100-108, 2010.

TOMASELLI, L. The Microalgal Cell. In: Richmond, A., *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. USA: CRC Press. p. 577, 2004.

TOMASELLI, L. Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira (Spirulina)*. In: Vonshak, A., *Spirulina platensis (Arthrospira) Physiology, cell-biology and biotechnology*. London: Taylor & Francis, 1997.

VALDERRAMA, L. T., DEL CAMPO, C. M., RODRIGUEZ, C. M., BASHAN, L. E., BASHAN, Y. Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemma minuscula*. *Water Research*. v. 36, p. 4185-4192, 2002.

VONSHAK, A., TORZILLO, G. Environmental Stress Physiology. In: Richmond, A., *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. USA: CRC Press. p. 577, 2004.

WANG, L., LI, Y., CHEN, P., MIN, M., CHEN, Y., ZHU, J., RUAN, R. R. Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp. *Bioresource Technology*. v. 101, p. 2623-2628, 2010.

WHO/FAO, WHO and FAO joint consultation: fats and oils in human nutrition. *Nutrition Reviews*. v. 53 (7), p. 202-205, 1995.

XU, H., MIAO, X., WU, Q. High quality biodiesel production from a microalgae *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal Biotechnology*. v. 126, p. 499-507, 2006.

YANG, S., LI, J., ZHENG, Z., MENG, Z. Characterization of *Spartina alterniflora* as feedstock for anaerobic digestion. *Biomass and Bioenergy*. v. 33, p. 597-602, 2009.

ZARROUK, C. Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthèse de *Spirulina maxima* Geitler. Ph.D. Thesis, University of Paris, Paris, 1966.

ZHOU, W., LI, Y., MIN, M., HU, B., CHEN, P., RUAN, R. Local bioprospecting for high-lipid producing microalgal strains to be grown on concentrated municipal wastewater for biofuel production. *Bioresource Technology*. v. 102, p. 6909-6919, 2011.

3.3 ARTIGO 3
PURIFICAÇÃO DE BIOGÁS EM FOTOBIORREATOR TUBULAR VERTICAL EM
SÉRIE

PURIFICAÇÃO DE BIOGÁS EM FOTOBIORREATOR TUBULAR VERTICAL EM SÉRIE

3.3.1 Resumo

O biogás em sua forma bruta apresenta entre 25-45 % (v/v) de CO₂ como principal contaminante. As microalgas já demonstraram eficiência na biofixação de CO₂ de gases de combustão. Esta característica é um potencial a ser aproveitado para a purificação de biogás. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade da microalga *Spirulina* sp. LEB-18 em remover CO₂ de biogás para obtenção de metano purificado. Foram realizados cultivos da microalga em fotobiorreatores tubulares em série, sendo testadas diferentes fontes de carbono: NaHCO₃ (3 g.L⁻¹), ar enriquecido com 25 % (v/v) CO₂ e biogás sintético contendo 25 % (v/v) CO₂ e 75 % (v/v) CH₄ em meio Zarrouk modificado. As máximas concentrações celulares e produtividades de biomassa variaram, respectivamente, entre 1,12-1,24 g.L⁻¹ e 0,11-0,14 g.L⁻¹.d⁻¹, não apresentando diferenças significativas entre os ensaios, mostrando que adicionar carbono no cultivo como NaHCO₃, CO₂ puro ou presente no biogás não altera os parâmetros cinéticos de crescimento microalgal. A maior fixação diária total de dióxido de carbono obtida foi 58,01 % (v/v) quando cultivada com adição de biogás contendo 25 % (v/v) CO₂. O cultivo microalgal mostrou-se como uma alternativa para obtenção de biogás purificado, pois aproximadamente 45 % do CO₂ presente no biogás foi removido pela microalga *Spirulina* sp. LEB-18, obtendo-se biogás com 89,5 % (v/v) de CH₄.

Palavras – chave: biofixação, dióxido de carbono, fotobiorreator, metano, microalga.

BIOGAS REFINING IN VERTICAL TUBULAR PHOTOBIOREACTOR IN SERIES

Abstract

The biogas in its raw form shows around 25-45 % (v/v) of CO₂ as its main contaminant. Microalgae had already shown efficiency on biofixation of CO₂ in combustion gases. This technical feature is a potential to be availed in biogas refinement. The objective of this task was to evaluate the capacity of *Spirulina* sp. LEB-18 microalgae in removing CO₂ from biogas to obtain refined methane. Cultivation of microalgae was performed in tubular photobioreactors in series, being tested different sources of carbon: NaHCO₃ (3.0 g.L⁻¹), enriched air with 25 % (v/v) CO₂ and synthetic biogas containing 25 % (v/v) CO₂ and 75 % (v/v) CH₄ in modified Zarrouk medium. The maximum cellular concentration and productivities of biomass vary, respectively, around 1.12-1.24 g.L⁻¹ and 0.11-0.14 g.L⁻¹.d⁻¹, not showing signifying differences between essays, showing that adding carbon into the culture as NaHCO₃, raw CO₂ or present in biogas do not change kinetic parameters of microalgae growth. The major total daily fixation of carbon dioxide obtained was 58.01 % (v/v) when cultivated with the addition of biogas containing 25 % (v/v) CO₂. The microalgae cultivation showed to be an alternative into obtaining raw biogas, because approximately 45 % of the present CO₂ in biogas was removed by the microalgae *Spirulina* sp. LEB-18, obtaining biogas with 89.5 % (v/v) of CH₄.

Keywords: biofixation, carbon dioxide, photobioreactor, methane, microalgae.

3.3.2 Introdução

O estudo para o desenvolvimento de biocombustíveis e novas fontes de energia renovável é cada vez mais difundido entre pesquisadores como forma de minimizar os efeitos da utilização de recursos naturais e da poluição produzida pela população. Biocombustíveis como biomassa, biogás, biodiesel e bioetanol podem ser produzidos a partir de produtos agrícolas, resíduos orgânicos e agroindustriais, o que muitas vezes representa uma alternativa para o destino de compostos que causariam poluição se descartados no meio ambiente.

Nesse contexto, as microalgas são capazes de produzir energia mediante a conversão de carbono inorgânico na presença de fonte luminosa. Além de auxiliar na diminuição do aquecimento global com a retirada de CO₂ da atmosfera, esses microorganismos produzem biomassa que pode ser aplicada na produção de outros biocombustíveis, alimentos, biopolímeros para produção de nanofibras e uma variedade de outros biocompostos (COSTA; MORAIS, 2011; DEMIRBAS, 2010; MORAIS et al., 2010).

Entre as microalgas, a cianobactéria *Spirulina* é uma das mais estudadas devido a sua facilidade de recuperação do meio de cultivo e sua composição rica em proteínas, ácidos graxos poli-insaturados e vitaminas. No que diz respeito ao aporte de substratos para esta microalga, carbono é necessário em maior quantidade, representando a maior parcela dos custos com nutrientes, sendo o bicarbonato de sódio a fonte usualmente utilizada (ZARROUK, 1966). No entanto, estudos relatam a capacidade de biofixação do dióxido de carbono por microalgas, que podem ter parâmetros cinéticos incrementados a partir da injeção desse gás no meio de cultivo (RADMANN et al., 2011; ROSA et al., 2011; MORAIS; COSTA, 2007a).

Os principais constituintes do biogás, gerado a partir da digestão anaeróbia, são CH₄ e CO₂, podendo conter também, dependendo da composição da biomassa decomposta, traços de H₂S (KAO et al., 2012a). A presença de CO₂ no biogás inviabiliza sua compressão e estocagem, fazendo com que, na maioria das instalações, a combustão do gás ocorra no mesmo local onde é produzido. Portanto, usos mais nobres, como, em substituição ao GNV (Gás Natural Veicular) de origem fóssil dependem de técnicas de purificação, preferencialmente de baixo custo. Dentre as formas de se obter biogás purificado está a remoção biológica de CO₂ por microalgas, com a vantagem, em comparação a outros métodos, de produzir biomassa potencialmente aproveitável.

Um dos sistemas que podem ser utilizados na purificação do biogás é o cultivo com microalgas em fotobiorreatores verticais. Esse tipo de sistema mantém o CO₂ em contato com o meio de cultivo por mais tempo, aumentando a eficiência de utilização desse gás como fonte de carbono. Outra maneira de se obter maior eficácia na purificação do metano através da biofixação de CO₂ é o cultivo microalgal em fotobiorreatores em série, no qual o dióxido de carbono que não foi removido no primeiro fotobiorreator, passa a ser nutriente para a microalga no fotobiorreator subsequente. Este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade da *Spirulina* sp. LEB-18 em remover biologicamente o CO₂ contaminante no biogás e estudar a cinética de absorção do gás e de crescimento da microalga.

3.3.3 Material e Métodos

Micro-organismo e meio de manutenção

O micro-organismo utilizado foi a microalga *Spirulina* sp. LEB-18 isolada da Lagoa Mangueira em Santa Vitória do Palmar, extremo Sul do Brasil (33°30'13"S; 53°08'59"W) (MORAIS et al., 2008). A microalga foi adaptada em dois meios de manutenção, meio Zarrouk modificado quanto à concentração da fonte de carbono (2,8 g.L⁻¹ NaHCO₃) (Zarrouk, 1966) e em meio Zarrouk modificado sem fonte de carbono, a qual foi substituída por CO₂ (10 %, v/v) injetado durante 1 min a cada hora da fase clara (12 h) por 7 d.

Biogás

Foi utilizado biogás sintético (White Martins, Brasil) nos cultivos de *Spirulina* sp. LEB-18 cuja composição foi definida a partir do biogás real produzido na digestão anaeróbia em escala piloto submetida a temperaturas entre 26-38 °C (Tabela 3, Artigo 1).

Fotobiorreatores e condições operacionais

Os cultivos foram realizados em duplicatas, em fotobiorreatores tubulares verticais (FBRTs), construídos de acrílico transparente com volume de 2 L, volume útil 1,8 L, em série de 3 FBRTs (Figura 1).

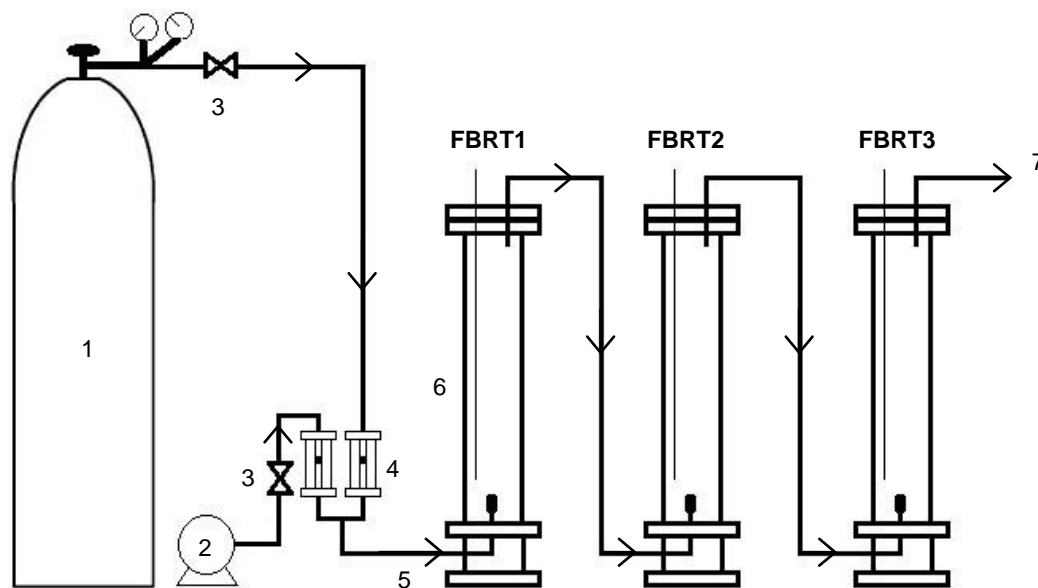


Figura 1 Desenho esquemático dos cultivos da microalga *Spirulina* sp. LEB-18 nos FBRTs de 2 L em série: (1) cilindro de CO₂ ou biogás; (2) bomba pneumática; (3) válvulas solenoide; (4) rotômetros; (5) entrada do gás e/ou ar; (6) FBRTs em série; (7) saída do gás e/ou ar.

Os fotobiorreatores foram mantidos em estufa termostatizada a 30 °C com fotoperíodo 12 h claro/escuro (REICHERT et al., 2006) durante 8 d. A concentração inicial de *Spirulina* nos cultivos foi 0,22 g.L⁻¹ ± 0,02 g.L⁻¹. A agitação foi realizada por injeção de ar por bomba pneumática (BOYU – ACQ003) distribuído por aspensor sinterizado fixado na base dos FBRTs, com vazão de 90 mL.min⁻¹ medida através de rotômetros (Cole-Parmer, USA) e controlada por válvula solenoide (Danfoss, Denmark) (Figura 1). A injeção dos gases (CO₂ ou biogás) foi realizada através de cilindro industrial (White Martins, Brasil). A vazão de gás (90 mL.min⁻¹) foi medida por rotômetros e controlada por válvulas solenoide. A injeção de gás foi realizada 2 min a cada 30 min durante o período claro (12 h). Iluminância de 3,2 klux foi fornecida aos cultivos através de lâmpadas fluorescentes tipo luz do dia de 40 W.

No Ensaio 1 (E1) a agitação foi realizada por injeção de ar (0,05 min⁻¹) durante todo o cultivo. Como fonte de carbono, foi utilizado NaHCO₃, alimentado por pulsos diários de 20 mL de solução estoque (150 g.L⁻¹ NaHCO₃) no meio líquido em cada FBRT. A concentração de NaHCO₃ utilizada neste ensaio foi definida através da concentração de carbono injetada nos ensaios E2 e E3. A Tabela 1 apresenta as condições experimentais testadas nos cultivos da microalga *Spirulina* sp. LEB-18.

Tabela 1 Condições experimentais dos cultivos com a microalga *Spirulina* sp. LEB-18.

Ensaio	Fonte de Carbono	Concentração
E1	NaHCO ₃	3 g.d ⁻¹
E2	CO ₂ sintético	Ar enriquecido 25 % (v/v) CO ₂
E3	Biogás sintético	25 % (v/v) CO ₂ e 75 % (v/v) CH ₄

No Ensaio 2 (E2) a agitação foi realizada através da injeção de ar (0,05 min⁻¹) durante 30 min. Após, a agitação foi interrompida durante 1 min e logo após iniciou-se a injeção de 90 mL.min⁻¹ de ar enriquecido com 25 % (v/v) CO₂ sintético durante 2 min. Após adição da mistura, aguardou-se 1 min para iniciar novamente a agitação nos cultivos através da injeção de ar.

No Ensaio 3 (E3) o procedimento de agitação dos cultivos foi idêntico ao Ensaio 2 (0,05 min⁻¹ durante 30 min). Após agitação, aguardou-se 1 min para iniciar a injeção do biogás (90 mL.min⁻¹ durante 2 min) com mistura primária de 25 % (v/v) CO₂ e 75 % (v/v) CH₄. Após adição do biogás, esperou-se 1 min para se iniciar novamente a agitação nos cultivos através da injeção de ar.

Para efeito de comparação, em todas as condições experimentais (E1, E2 e E3) a concentração diária de carbono adicionada aos cultivos foi a mesma (0,44 g.d⁻¹).

Determinações analíticas

A concentração da biomassa de *Spirulina* nos cultivos (g.L⁻¹) foi determinada diariamente através da medida da densidade ótica do meio líquido em espectrofotômetro (Quimis Q798DRM, Brasil) a 670 nm (COSTA et al., 2000). O pH foi determinado através de pHmetro digital (Lutron PH-221, Taiwan) e a alcalinidade, por titulação potenciométrica com solução de HCl (APHA, 1998).

Caracterização da biomassa produzida

A biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18 produzida foi separada do meio líquido por centrifugação durante 30 min a 18782 xg (HITACHI CR22GIII, Taiwan), lavada com água destilada (3 vezes) para remoção de sais do meio de cultivo, seca a 40 °C por 48 h em estufa com circulação forçada de ar (Quimis Q314D242, Brasil) e moída em gral e pistilo para determinação da composição elementar (CHN).

A composição elementar da biomassa foi determinada em analisador elementar CHN (Perkin Elmer 2400, USA), utilizando como padrão acetanilida (71,09 % carbono, 6,71 % hidrogênio e 10,36 % nitrogênio).

Tratamento de dados

Parâmetros de crescimento

A partir da concentração de biomassa determinada experimentalmente foi calculada a produtividade da biomassa ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), definida como a massa celular formada em determinado volume na unidade de tempo (SCHMIDELL et al., 2001), segundo a Equação 1:

$$P = \left(\frac{X_t - X_0}{t - t_0} \right) \quad \text{Equação 1}$$

onde:

X_t : concentração celular (g.L^{-1}) no tempo t (d);

X_0 : concentração celular inicial (g.L^{-1}) no tempo t_0 (d).

Remoção de CO_2

Foi determinada a fixação diária máxima (FDM) e a fixação média (FM) de CO_2 em cada FBRT e na série e acúmulo de CO_2 fixado, segundo Morais e Costa (2007a). Os cálculos de fixação foram baseados no volume do fotobiorreator, na quantidade de CO_2 adicionada, na concentração celular da microalga e na concentração de carbono obtida na análise de CHN da biomassa. O acúmulo de CO_2 fixado em cada FBRT (FA, g CO_2) foi determinado segundo a Equação 2:

$$FA = (X_t - X_0) * m_{\text{cbm}} * V_{\text{FBRT}} * \left(\frac{M_{\text{CO}_2}}{M_C} \right) \quad \text{Equação 2}$$

onde:

X_t : concentração celular (g.L^{-1}) no tempo t (d);

X_0 : concentração celular (g.L^{-1}) inicial;

m_{cbm} : fração mássica de carbono na biomassa microalgal (g.g^{-1});

V_{FBRT} : volume de meio no fotobiorreator (L);

M_{CO_2} : massa molar do dióxido de carbono (g.mol^{-1});

M_{C} : massa molar do carbono (g.mol^{-1}).

A fixação diária de CO_2 em cada FBRT (FD, $\text{g CO}_2 \text{ fixado.g}^{-1} \text{ CO}_2 \text{ injetado.d}^{-1}$) e a fixação total diária de CO_2 na série (FDT, $\text{g CO}_2 \text{ fixado.g}^{-1} \text{ CO}_2 \text{ injetado.d}^{-1}$) foram obtidas através das Equações 3 e 4:

$$\text{FD} = \frac{(FA_{(t+1)} - FA_t)}{m_{\text{CO}_2\text{d}}} \quad \text{Equação 3}$$

$$\text{FDT} = \frac{(FA1_{(t+1)} + FA2_{(t+1)} + FA3_{(t+1)}) - (FA1_{(t)} + FA2_{(t)} + FA3_{(t)})}{m_{\text{CO}_2\text{d}}} \quad \text{Equação 4}$$

onde:

$FA_{(t+1)}$: acúmulo de CO_2 fixado (g CO_2) no tempo $t+1$ (d);

FA_t : acúmulo de CO_2 (g CO_2) no tempo t (d);

$m_{\text{CO}_2\text{d}}$: massa de CO_2 (g) injetada diariamente;

$FA1_{(t+1)}$: acúmulo de CO_2 fixado (g CO_2) no FBRT1 no tempo $t+1$ (d);

$FA2_{(t+1)}$: acúmulo de CO_2 fixado (g CO_2) no FBRT2 no tempo $t+1$ (d);

$FA3_{(t+1)}$: acúmulo de CO_2 fixado (g CO_2) no FBRT3 no tempo $t+1$ (d);

$FA1_t$: acúmulo de CO_2 (g CO_2) no FBRT1 no tempo t (d);

$FA2_t$: acúmulo de CO_2 (g CO_2) no FBRT2 no tempo t (d);

$FA3_t$: acúmulo de CO_2 (g CO_2) no FBRT3 no tempo t (d).

A fixação diária máxima (FDM) e a fixação média (FM) são, respectivamente, o máximo valor de fixação diária e a média dos valores de fixação diária encontrado em cada FBRT e na série.

A concentração de metano no biogás purificado (CH_4 , %) para cada dia após a remoção do CO_2 pela microalga *Spirulina* sp. LEB-18 na série foi calculada através da Equação 5:

$$\text{CH}_4 = \left[\left(\frac{\text{FDT}}{m_{\text{CO}_2\text{d}}} \right) * C_{\text{CO}_2\text{ in}} \right] + C_{\text{CH}_4\text{ in}} \quad \text{Equação 5}$$

onde:

FDT: fixação diária total de CO_2 na série de FBRTs (g CO_2 fixado. g^{-1} CO_2 injetado. d^{-1});

$m_{\text{CO}_2\text{d}}$: massa de CO_2 (g) injetada diariamente;

$C_{\text{CO}_2\text{ in}}$: concentração de CO_2 na entrada da série dos FBRTs (% v/v);

$C_{\text{CH}_4\text{ in}}$: concentração de CH_4 na entrada da série dos FBRTs (% v/v).

Análise estatística

Os resultados obtidos a partir dos dados experimentais foram avaliados por análise de variância (ANOVA), sendo utilizado o teste de Tukey em $p \leq 0,05$ para avaliar as diferenças significativas entre os resultados.

3.3.4 Resultados e Discussão

Crescimento da microalga *Spirulina* sp. LEB-18

A maior concentração celular ($1,24 \text{ g.L}^{-1}$) foi obtida no FBRT2 do E3, quando a microalga *Spirulina* sp. LEB-18 foi cultivada com injeção de biogás sintético (25 % (v/v) CO_2 e 75 % (v/v) CH_4) (Tabela 2), após 8 d de cultivo. Nos ensaios com adição diária de NaHCO_3 (E1) e com injeção de ar enriquecido com 25 % (v/v) CO_2 sintético (E2), ocorreu crescimento celular até o último dia de cultivo, sem apresentar diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores máximos de crescimento celular entre todos os FBRTs em série (Tabela 2). Pulsos diários de NaHCO_3 foram utilizados com a finalidade de não ocorrer a perda de carbono para a atmosfera e proporcionar ao micro-organismo concentrações de carbono próximas aos ensaios subsequentes em que foram injetados CO_2 como fonte de carbono (E2 e E3). Andrade et al. (2008) avaliaram o crescimento da biomassa e a perda de carbono em cultivos da microalga

Spirulina sp. LEB-18 e observaram que a menor perda química de CO₂ para a atmosfera e os maiores parâmetros de crescimento (concentração celular, produtividade e velocidade de crescimento) da microalga ocorreram no ensaio com a menor concentração de carbono testada (NaHCO₃ 2,8 g.L⁻¹). Os autores relatam também que a manutenção dos cultivos em baixas concentrações de carbono inorgânico dissolvido pode resultar em maior eficiência no consumo do nutriente pela microalga *Spirulina*.

Tabela 2 Concentração celular máxima ($X_{\text{máx}}$, g.L⁻¹) e produtividade máxima ($P_{\text{máx}}$, g.L⁻¹.d⁻¹) para a microalga *Spirulina* sp. LEB-18 cultivada com diferentes fontes de carbono: NaHCO₃ (E1), CO₂ sintético (E2) e biogás sintético (E3) nos FBRTs em série.

Ensaio	Parâmetros cinéticos	FBRT1	FBRT2	FBRT3
E1	$X_{\text{máx}}$	1,16 ± 0,03 ^{a, A}	1,10 ± 0,09 ^{a, A}	1,08 ± 0,13 ^{a, A}
	$P_{\text{máx}}$	0,11 ± 0,00 ^{a, A}	0,11 ± 0,02 ^{a, A}	0,10 ± 0,01 ^{a, A}
E2	$X_{\text{máx}}$	1,12 ± 0,14 ^{a, A}	1,19 ± 0,26 ^{a, A}	1,21 ± 0,19 ^{a, A}
	$P_{\text{máx}}$	0,11 ± 0,02 ^{a, A}	0,14 ± 0,03 ^{a, A}	0,13 ± 0,03 ^{a, A}
E3	$X_{\text{máx}}$	1,16 ± 0,21 ^{a, A}	1,24 ± 0,21 ^{a, A}	1,18 ± 0,07 ^{a, A}
	$P_{\text{máx}}$	0,12 ± 0,02 ^{a, A}	0,13 ± 0,02 ^{a, A}	0,13 ± 0,00 ^{a, A}

Letras minúsculas sobrescritas iguais dentro de cada linha e letras maiúsculas sobrescritas dentro de cada coluna referem-se, respectivamente, a médias estatisticamente iguais ($p > 0,05$) para cada parâmetro cinético.

Comparando o crescimento celular da microalga *Spirulina* com os obtidos em outros trabalhos que utilizaram biogás (CO₂ e CH₄) ou CO₂ sintético como fonte de carbono, verificou-se que os resultados encontrados neste trabalho foram maiores (Tabela 2). Conventi et al. (2009) avaliaram o crescimento da microalga *Spirulina platensis* cultivada com biogás como fonte de carbono, no qual a concentração de CO₂ variou entre 24-30 % (v/v) na composição do biogás, e obtiveram concentração celular até aproximadamente 2,0 g.L⁻¹ após 53 d de cultivo. *Spirulina* sp. LEB-18 foi cultivada em 6, 12 e 18 % de CO₂ (v/v) sintético e foram obtidas, respectivamente, concentrações celulares de 0,81; 0,78 e 0,64 g.L⁻¹ após 20 d de ensaio (ROSA et al., 2011). Radmann et al. (2011) cultivaram a microalga *Spirulina* sp. em fotobiorreatores em série com injeção de 12 % (v/v) de CO₂ sintético, 60 ppm de SO₂ e 100 ppm de NO, simulando gás de combustão gerado em termelétrica e observaram que a

microalga apresentou crescimento celular ($1,59 \text{ g.L}^{-1}$) até o último dia de cultivo (20° d).

A Figura 2 mostra as curvas de crescimento da microalga *Spirulina* sp. LEB-18 nos ensaios realizados com adição de pulsos diários de NaHCO_3 (E1), injeção de ar enriquecido com 25 % (v/v) CO_2 (E2) e injeção de biogás sintético contendo 25 % (v/v) CO_2 (E3).

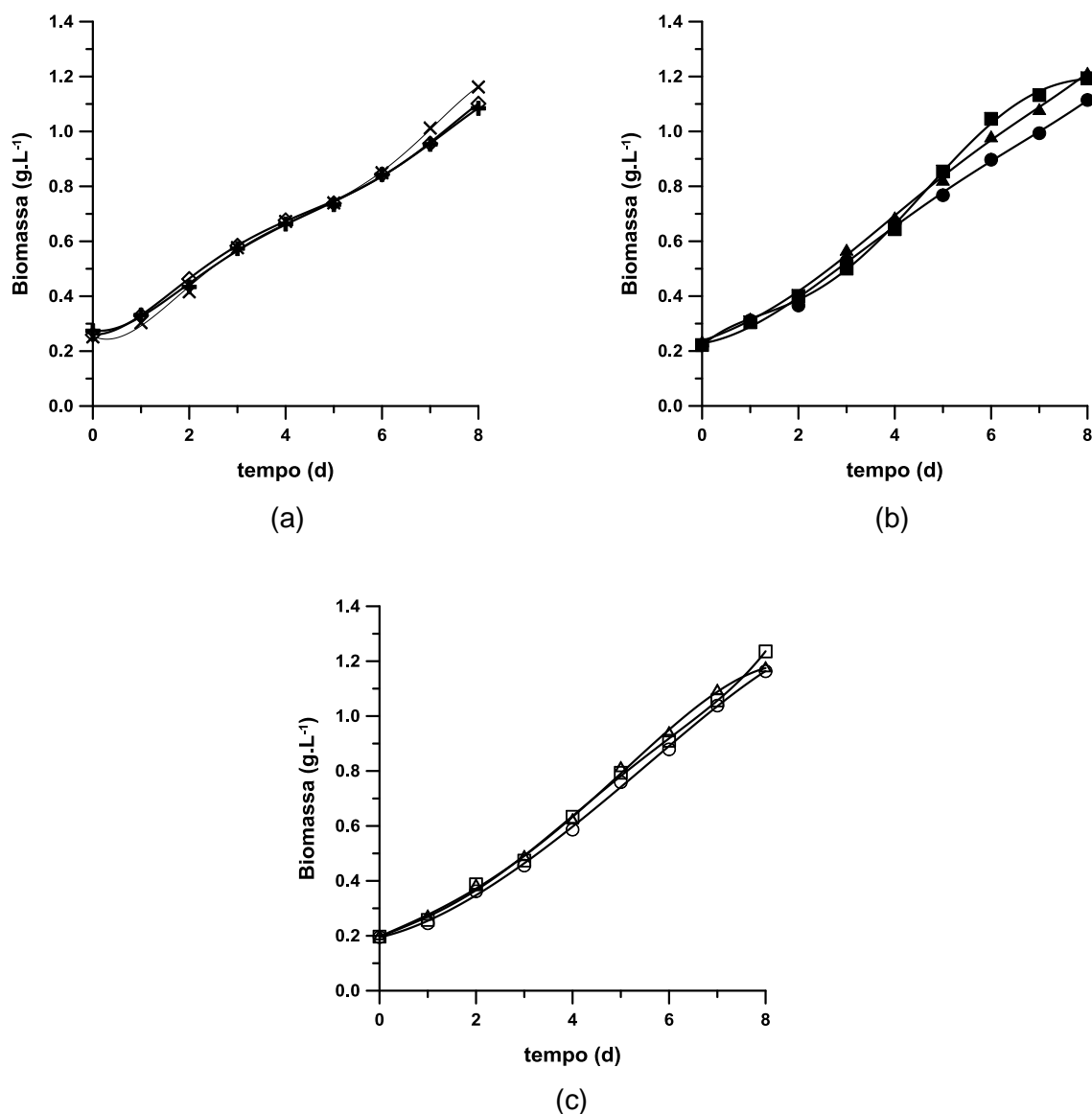


Figura 2 Curvas de crescimento para a microalga *Spirulina* sp. LEB-18 cultivada em FBRTs em série com diferentes fontes de carbono: E1: (a) pulsos diários de NaHCO_3 , FBRT1 (X), FBRT2 (+) e FBRT3 (◇); E2: (b) ar enriquecido com 25 % (v/v) CO_2 , FBRT1 (●), FBRT2 (■) e FBRT3 (▲) e E3: (c) biogás (25 % (v/v) CO_2 e 75 % (v/v) CH_4), FBRT1 (○), FBRT2 (□) e FBRT3 (△).

Tanto no cultivo em meio Zarrouk com pulsos diários de NaHCO_3 (Figura 2a) quanto nos cultivos com injeção de ar enriquecido com 25 % (v/v) CO_2 sintético (Figura 2b) e biogás (25 % (v/v) CO_2 e 75 % (v/v) CH_4) (Figura 2c) como fonte de carbono, a microalga apresentou crescimento logo após o início dos ensaios, sem fase de adaptação. Isso pode ser justificado pela aclimação prévia dos inóculos durante 7 d com NaHCO_3 e CO_2 , respectivamente. Em ensaios realizados por Morais e Costa (2007a), cultivos da microalga *Spirulina* sp. com 6 e 12 % (v/v) de CO_2 foram aclimatados durante 7 d com ar enriquecido com 1 % (v/v) de CO_2 e não apresentaram fase lag, apresentando crescimento imediatamente após o início dos ensaios. Sydney et al. (2010) cultivaram *Spirulina* LEB-12 com 5 % (v/v) de CO_2 durante 14 d e obtiveram crescimento celular desde o início do experimento, no entanto, os autores não relatam se houve adaptação prévia do inóculo.

A maior produtividade obtida neste trabalho foi $0,14 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, quando a microalga foi cultivada com injeção de ar enriquecido com 25 % (v/v) CO_2 (E2, FBRT2). Nos FBRTs 1 e 3 (E2), as produtividades obtidas foram, respectivamente, $0,11$ e $0,13 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. No entanto, não houve diferença significativa entre as máximas produtividades obtidas nos ensaios E1, E2 e E3 para todos os FBRTs (Tabela 2). Durante os 8 d de cultivo, a produtividade obtida em todos os ensaios variou entre $0,05$ e $0,14 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ (Figura 3a, 3b e 3c). No ensaio E1, do primeiro ao terceiro dia de cultivo, a produtividade aumentou de $0,05$ a $0,11 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e logo após, manteve-se entre $0,09$ e $0,11 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Para os ensaios E2 e E3, observa-se que, mesmo quando o FBRT1 recebeu maior quantidade de CO_2 por ser o primeiro FBRT da série, as produtividades nos três FBRTs apresentaram-se estatisticamente iguais ($p > 0,05$), mostrando que a massa de dióxido de carbono fornecida foi suficiente para alimentar o cultivo em toda a série de FBRTs (Figura 3b e 3c).

Kao et al. (2012a) avaliaram o crescimento da microalga mutante *Chlorella* sp. MM-2 com injeção de biogás sintético contendo 20 % (v/v) de CO_2 e 20; 40; 60 e 80 % (v/v) de CH_4 e observaram que a microalga apresentou, respectivamente, produtividades $0,16$; $0,15$; $0,12$ e $0,11 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, resultados estes, semelhantes aos encontrados no presente trabalho. Morais e Costa (2007a) cultivaram a microalga *Spirulina* sp. em FBRTs em série com injeção de ar ($0,038$ % (v/v) CO_2), 6 e 12 % (v/v) CO_2 e observaram que a adição de dióxido de carbono influenciou no crescimento celular, resultando em produtividades máximas, respectivamente, de $0,14 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ (FBRTs 2 e 3), $0,22 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ (FBRT2) e $0,18 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ (FBRT3). *Spirulina platensis* foi

cultivada com injeção de biogás oriundo de processo anaeróbio contendo 71,3-76 % (v/v) CH_4 e 13,2-18,7 % (v/v) CO_2 a qual resultou em produtividade média de biomassa $0,041 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ (CONVERTI et al., 2009).

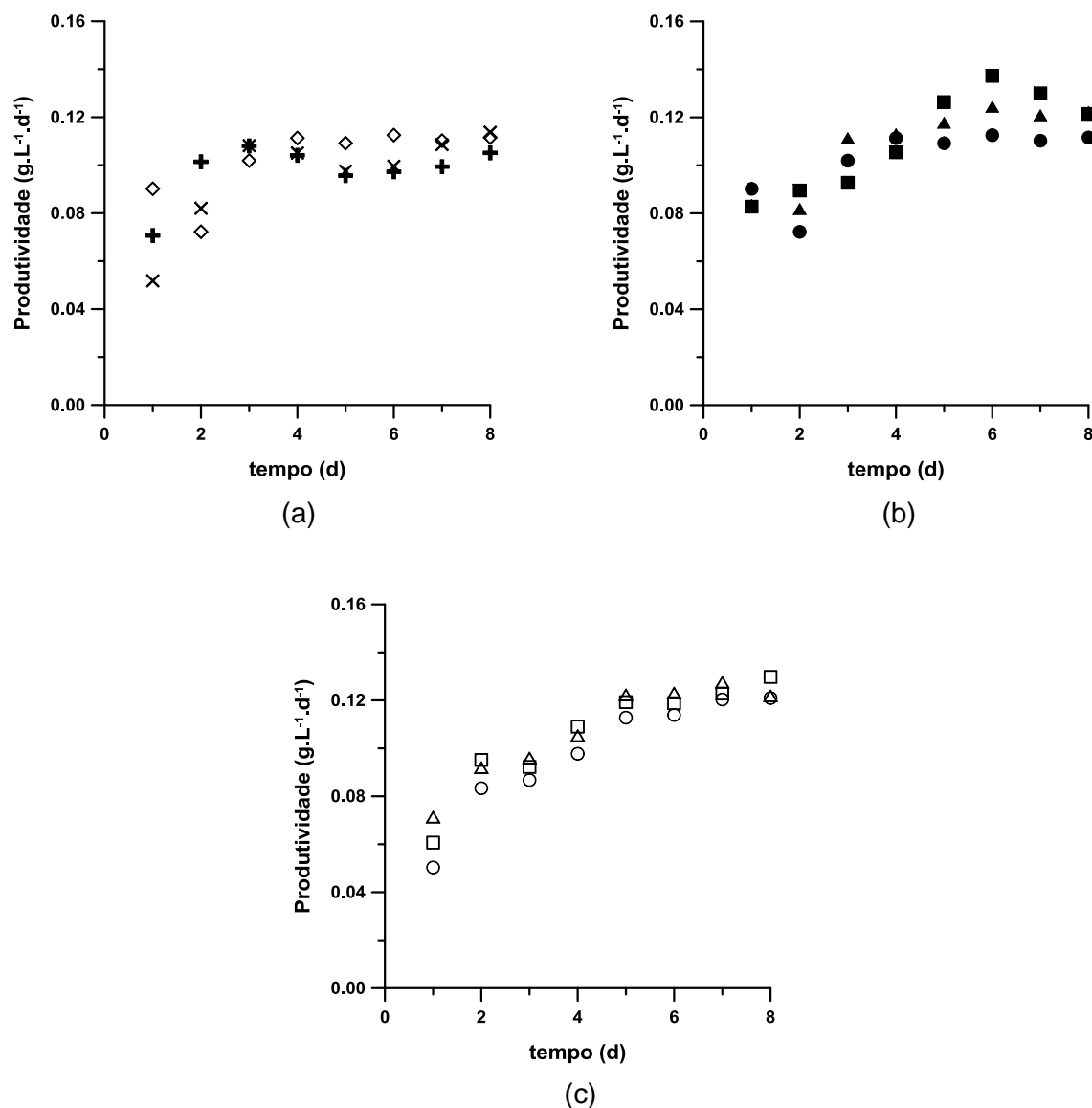


Figura 3 Produtividade diária da microalga *Spirulina* sp. LEB-18 cultivada em FBRTs em série com diferentes fontes de carbono: E1: (a) pulsos diários de NaHCO_3 , FBRT1 (X), FBRT2 (+) e FBRT3 (\diamond); E2: (b) ar enriquecido com 25 % (v/v) CO_2 , FBRT1(\bullet), FBRT2 (\blacksquare) e FBRT3 (\blacktriangle) e E3: (c) biogás (25 % (v/v) CO_2 e 75 % (v/v) CH_4), FBRT1 (\circ), FBRT2 (\square) e FBRT3 (\triangle).

Em todos os ensaios realizados, independente da fonte de carbono adicionada, a microalga apresentou crescimento celular. Observou-se também que o metano presente no biogás não apresentou efeito inibitório ou morte celular no crescimento microalgal. Dentre os gases que constituem o biogás e que podem causar influência durante a injeção em cultivos microalgais está o H₂S. Porém, quando presente em pequenas quantidades, este gás não oferece risco para o desenvolvimento celular. Alguns autores estudaram a influência desse gás no processo fotossintético microalgal e até qual concentração poderia causar inibição no crescimento ou morte celular. Travieso et al. (1993) cultivaram a microalga *Arthrospira* sp. com biogás como fonte de carbono e avaliaram o efeito do H₂S no cultivo. Os autores observaram que o H₂S foi reduzido de 1 % (v/v) para 0,3-0,4 % (v/v) após passagem pelo meio líquido sem causar qualquer inibição ou morte celular. Kao et al. (2012a) cultivaram a microalga *Chlorella* sp. MM-2 em diferentes concentrações de H₂S (0, 50, 100, 150 e 200 ppm) com a finalidade de determinar até que concentração a microalga apresentaria crescimento celular. Os autores observaram que até 100 ppm de H₂S a microalga apresentou produção de biomassa durante todo o cultivo.

Os valores de pH para o ensaio E1, com adição de pulsos diários de NaHCO₃ (Figura 4a), em todos os FBRTs foram semelhantes, variando de 9,83 ± 0,04 a 9,86 ± 0,08. Os valores de pH para os ensaios com injeção de CO₂ e biogás (E2 e E3) (Figuras 4b e 4c), apresentaram-se abaixo dos valores encontrados no ensaio E1. O pH médio nos ensaios E2 e E3 foram, respectivamente, 7,63 ± 0,09 e 7,48 ± 0,03. O pH é um dos fatores que pode influenciar no crescimento e na composição celular, além da disponibilidade de nutrientes e intensidade de luz (HU, 2004). Segundo Richmond e Grobbelaar (1986), o pH ótimo para a microalga *Spirulina* encontra-se entre 9,5 e 10,5. Çelekli et al. (2009) avaliaram o efeito do pH na produção de *Spirulina* e observaram que as maiores concentrações de biomassa foram obtidas em pH 10,0. Radmann et al. (2011) cultivaram a microalga *Spirulina* sp. em fotobiorreatores em série com adição de 12 % (v/v) CO₂ e obtiveram pH variando entre 8 e 9. Morais e Costa (2007a) avaliaram a capacidade de biofixação da microalga *Spirulina* sp. com injeção de 12 % (v/v) CO₂ durante 15 min a cada 2 h durante a fase clara de cultivo e observaram que no primeiro dia de ensaio, o pH no meio líquido foi 7,08 e até o 21º d de experimento, o valor de pH aumentou para 8,76.

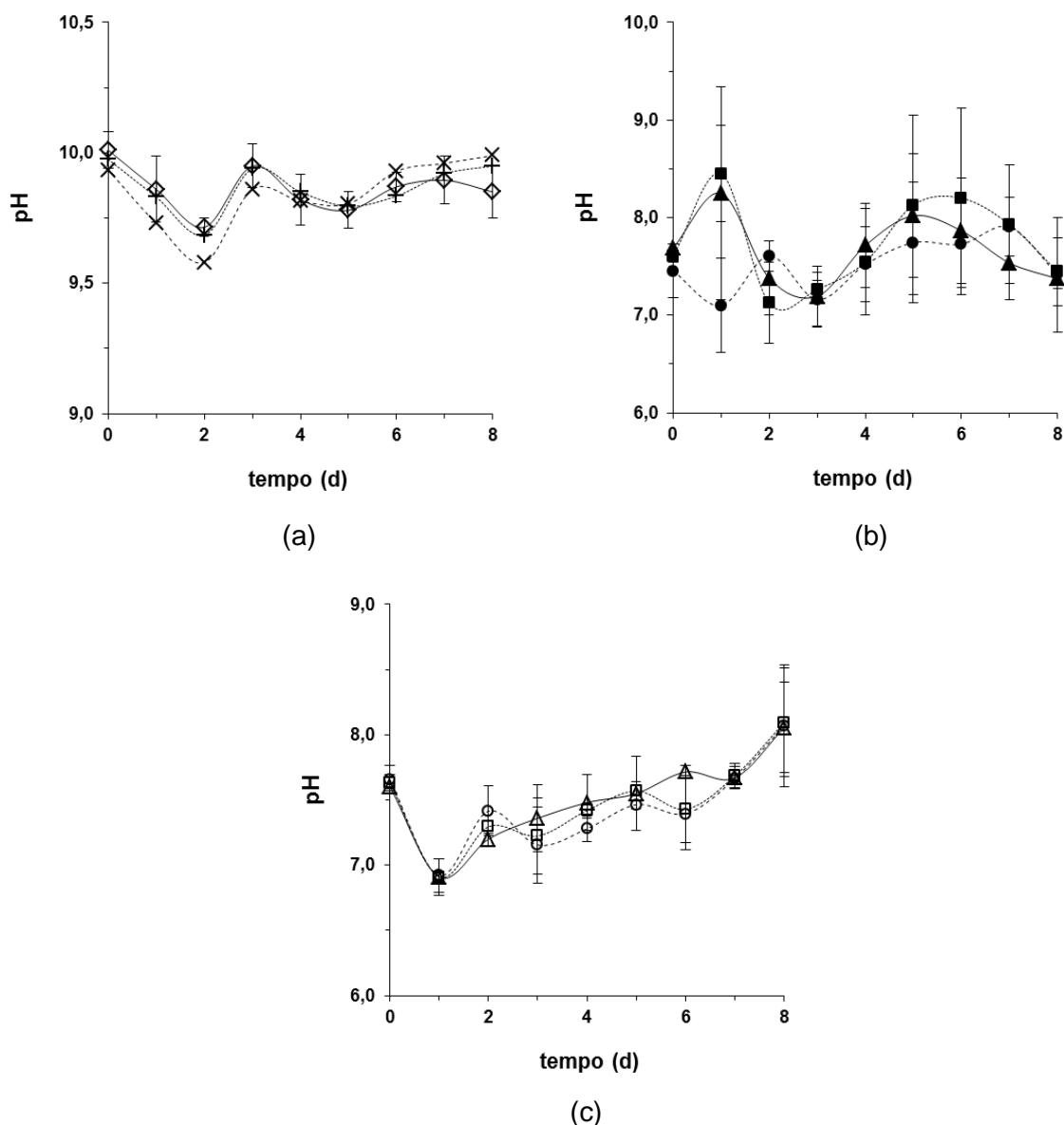


Figura 4 pH nos cultivos da microalga *Spirulina* sp. LEB-18 nos FBRTs em série: (a) E1: FBRT1 (X) FBRT2 (+) FBRT3 (\diamond), (b) E2: FBRT1(\bullet) FBRT2 (\blacksquare) FBRT3 (\blacktriangle) e (c) E3: FBRT1 (\circ) FBRT2 (\square) FBRT3 (Δ).

Embora o pH nos cultivos com injeção de gás não tenha sido mantido em valores ideais para o crescimento da microalga (E2 e E3) e tenha atingido valores inferiores aos ótimos encontrados na literatura (9,5-10,5), o crescimento celular nesses ensaios não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) com o ensaio em que a microalga foi cultivada em meio Zarrouk modificado com adição de NaHCO_3 (E1).

Os valores de alcalinidade determinados nos 3 ensaios variaram, respectivamente, entre 845-6581 mg.L^{-1} CaCO_3 , 221,6-562,2 CaCO_3 e 266,3-602,6

CaCO₃ quando adicionados aos cultivos da microalga com adição de pulsos diários de NaHCO₃ (ensaio E1), ar enriquecido com 25 % (v/v) CO₂ (ensaio E2) e biogás contendo 25 % (v/v) CO₂ (ensaio E3), respectivamente. As maiores concentrações de carbono inorgânico dissolvido no meio de cultivo (CID) (calculadas através de valores de alcalinidade e pH) encontradas para os ensaios com injeção de ar enriquecido com 25 % (v/v) CO₂ (E2) e adição de biogás contendo 25 % (v/v) CO₂ (E3) foram, respectivamente, 140,7 mg.L⁻¹ ± 10,8 mg.L⁻¹ CO₂ (Figura 5a) e 144,7 mg.L⁻¹ ± 8,5 mg.L⁻¹ CO₂ (Figura 5b).

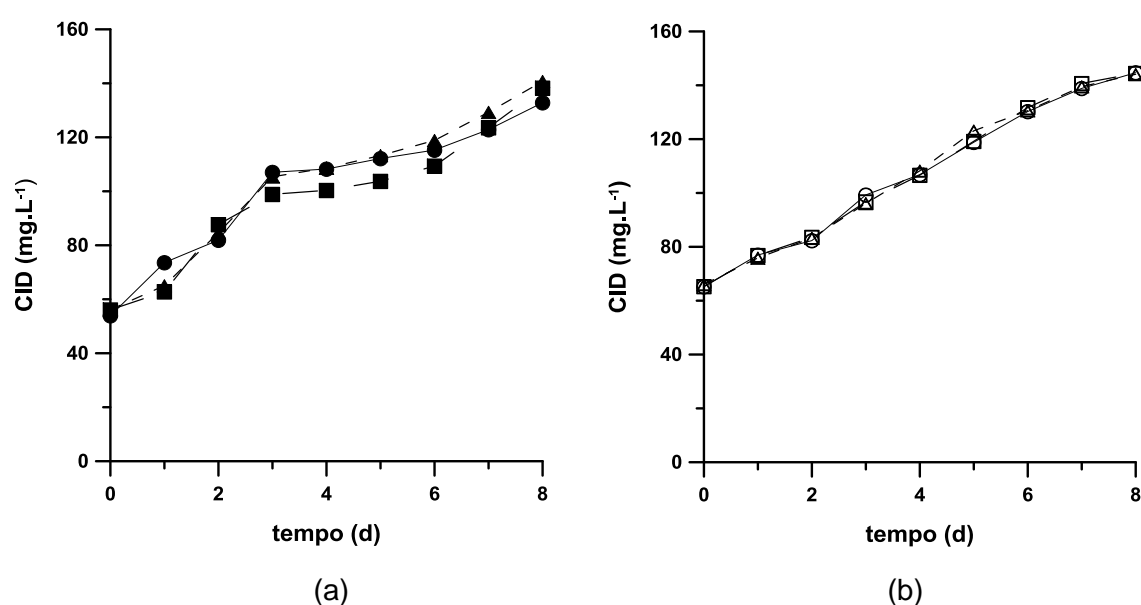


Figura 5 Concentração de carbono inorgânico dissolvido no meio para os FBRTs em série durante os 8 d de ensaio: E2: (a) ar enriquecido com 25 % (v/v) CO₂, FBRT1(●), FBRT2 (■) e FBRT3 (▲) e E3: (b) biogás (25 % (v/v) CO₂ e 75 % (v/v) CH₄), FBRT1 (○), FBRT2 (□) e FBRT3 (Δ).

Segundo Richmond (1990), do carbono inorgânico total dissolvido em culturas microalgais, o HCO₃⁻ é a espécie predominante, devido ao pH destas soluções. A concentração de HCO₃⁻ no meio de cultivo determina a taxa de formação de CO₂. Se a concentração de HCO₃⁻ é alta, a taxa de formação de CO₂ supera a taxa de consumo deste pela microalga, favorecendo a perda de carbono e inibindo o crescimento celular. Por outro lado, se a concentração de HCO₃⁻ é baixa, o crescimento da microalga é limitado pela falta de nutriente.

O pH está diretamente relacionado com a forma de carbono inorgânico disponível no meio. Em meio alcalino a forma disponível encontrada é o bicarbonato

(HCO_3^-), apresentando-se em torno de 80 % a um pH entre 7,0 e 9,0. As formas de CO_2 livre e carbonato (CO_3^{2-}) predominam quando o pH está abaixo ou acima destes valores, respectivamente (KIRK, 1994). Kaplan et al. (1990) relataram que no cultivo descontínuo ou em batelada de microalgas, geralmente ocorre a diminuição na concentração de carbono total e aumento do pH, provocando perturbações no sistema tampão de carbonato. Quando o pH atinge valores próximos a 11,0 ocorre redução e inibição do crescimento da microalga *Spirulina*, devido ao carbono inorgânico presente no meio tornar-se indisponível para o micro-organismo. No entanto, esse fenômeno não ocorreu em nenhum dos ensaios realizados neste trabalho, pois o pH variou entre 7,47 e 9,86.

O componente presente em maior concentração (v/v) no biogás injetado nos cultivos da microalga *Spirulina* foi CH_4 (75 %, v/v). Segundo Lehniger et al. (1995), este gás pode penetrar na célula por difusão devido à sua apolaridade. Porém, não há registros de efeito tóxico de CH_4 em microalgas. Segundo alguns autores (HUNTER, 1978; KAMENS; STERN, 1973; PENNINGTON; FUERST, 1971), concentrações de até 10.000 ppm são biologicamente inertes para células animais e vegetais.

Além disso, a solubilidade de CH_4 em meio líquido na temperatura (30 °C) em que foram realizados os ensaios, é baixa (25,3 mg.L^{-1}) (PERRY; GREEN, 1997). Outro fator importante que deve ser considerado quanto à solubilidade desse gás em cultivos de *Spirulina* é a salinidade presente no meio, uma vez que a salinidade em meios líquidos influencia na solubilidade de CH_4 (CONNELL, 2005). No presente trabalho, o meio Zarrouk utilizado nos ensaios apresenta diversos sais dissolvidos. Campos (2009) estudou a solubilidade do CH_4 em H_2O e em solução aquosa de NaCl 1 M a 30 °C e observou que, quando adicionado NaCl no meio líquido, esta solubilidade foi reduzida. Assim, devido à baixa solubilidade do CH_4 no meio líquido e por apresentar-se como um gás inerte na concentração utilizada, biogás apresenta-se potencialmente como fonte de carbono na forma CO_2 para produzir biomassa microalgal.

A composição elementar (CHN) da biomassa produzida nos 3 ensaios foi estatisticamente igual ($p > 0,05$) (Tabela 3). As maiores concentrações de C nos ensaios E1, E2 e E3 foram, respectivamente, 50,1 % \pm 2,3 % (p/p) (FBRT1), 44,1 % \pm 4,1 % (p/p) (FBRT3) e 45,9 % \pm 0,6 % (p/p) (FBRT1). As concentrações de H e N nos ensaios variaram, respectivamente, entre 4,9 % e 6,8 % (p/p) e 9,7 % e 11,1 % (p/p).

Tabela 3 Composição elementar da biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18 cultivada com diferentes fontes de carbono: NaHCO₃ (E1), CO₂ sintético (E2) e biogás sintético (E3) nos FBRTs em série.

Ensaio	FBRT	C (% p/p)	H (% p/p)	N (% p/p)
E1	FBRT1	50,1 ± 2,3 ^a	6,8 ± 0,3 ^a	9,7 ± 0,5 ^a
	FBRT2	47,4 ± 0,6 ^a	4,9 ± 1,4 ^a	10,7 ± 0,0 ^a
	FBRT3	48,2 ± 0,8 ^a	6,8 ± 0,0 ^a	11,0 ± 0,0 ^a
E2	FBRT1	43,2 ± 3,7 ^a	6,2 ± 0,8 ^a	10,7 ± 1,0 ^a
	FBRT2	42,8 ± 2,9 ^a	6,0 ± 0,5 ^a	10,7 ± 0,6 ^a
	FBRT3	44,1 ± 4,1 ^a	6,2 ± 0,8 ^a	10,9 ± 0,9 ^a
E3	FBRT1	45,9 ± 0,6 ^a	5,9 ± 1,2 ^a	11,0 ± 0,7 ^a
	FBRT2	44,6 ± 0,9 ^a	6,0 ± 0,8 ^a	11,0 ± 0,6 ^a
	FBRT3	42,1 ± 1,5 ^a	6,0 ± 0,4 ^a	11,1 ± 0,2 ^a

Letras sobrescritas iguais dentro de cada coluna referem-se a médias estatisticamente iguais ($p > 0,05$).

Resultados semelhantes foram encontrados por Radmann et al. (2011) que obtiveram valores de C entre 40,2 % e 47,8 % (p/p), H entre 4,5 % e 6,9 % (p/p) e N na faixa de 7,3 % e 8,2 % (p/p) quando cultivaram a microalga *Spirulina* sp. com injeção de ar enriquecido de 12 % (v/v) CO₂. Sydney et al. (2010) avaliaram o crescimento da microalga *Spirulina* LEB-12 com adição de 10 % (v/v) CO₂ durante 15 d de cultivo e produziram biomassa com 50 % (p/p) de C. Converti et al. (2009) cultivaram *Spirulina platensis* injetando biogás produzido através de processo anaeróbico e obtiveram biomassa com 48,12 % (p/p) de C. A injeção de biogás como fonte de carbono estudada neste trabalho resultou em concentrações de CHN semelhantes às obtidas pelos demais autores que utilizaram diferentes fontes de carbono nos cultivos. Este resultado é importante, pois demonstra que, além de ser possível a utilização de biogás como fonte de carbono para *Spirulina*, a biomassa produzida tem aproximadamente a mesma composição elementar obtida a partir de outras fontes de CO₂.

Biofixação de CO₂ e purificação de biogás por *Spirulina* sp. LEB-18

A máxima fixação diária de CO₂ (FDM) (22,7 %) pela microalga *Spirulina* sp. LEB-18 foi obtida no quarto dia de cultivo (FBRT2) quando foi injetado ar

enriquecido com 25 % (v/v) CO₂ (ensaio E2) (Tabela 4). Quando o biogás foi adicionado nos cultivos (ensaio E3), as FDM foram iguais nos 3 FBRTs ($p > 0,05$), variando de 19,83 % a 20,20 % (Tabela 4). Porém, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores de FDM de CO₂ pela microalga nos ensaios E2 e E3 em todos os FBRTs. A fixação média (FM) de CO₂ em todos os ensaios (Tabela 4), foi estatisticamente igual ($p > 0,05$). A maior FM de CO₂ (15,7 %) ocorreu no FBRT2 quando a microalga foi cultivada com injeção de biogás contendo 25 % (v/v) CO₂ (ensaio E3). Quando a microalga *Spirulina* foi cultivada com adição de ar enriquecido com 25 % (v/v) CO₂ (ensaio E2), a FM pela *Spirulina* em cada FBRT variou entre 11,7 % \pm 3,5 % e 13,9 % \pm 3,4 % de CO₂ (Tabela 4).

Tabela 4 Fixação diária máxima (FDM, %) e fixação média (FM, %) de CO₂ pela microalga *Spirulina* sp. LEB-18 cultivada com injeção de CO₂ sintético (E2) e biogás sintético (E3) nos FBRTs em série.

FBRT	E2		E3	
	FDM (%)	FM (%)	FDM (%)	FM (%)
FBRT1	16,5 \pm 3,4 ^{a, A}	11,7 \pm 3,5 ^{a, A}	19,8 \pm 2,8 ^{a, A}	15,0 \pm 3,1 ^{a, A}
FBRT2	22,7 \pm 3,4 ^{a, A}	13,8 \pm 6,1 ^{a, A}	20,0 \pm 8,1 ^{a, A}	15,7 \pm 3,5 ^{a, A}
FBRT3	18,6 \pm 5,2 ^{a, A}	13,9 \pm 3,4 ^{a, A}	20,2 \pm 2,7 ^{a, A}	13,7 \pm 3,7 ^{a, A}

Letras minúsculas sobrescritas iguais dentro de cada linha e letras maiúsculas sobrescritas dentro de coluna referem-se, respectivamente, a médias estatisticamente iguais ($p > 0,05$) para cada resposta avaliada.

Morais e Costa (2007c) cultivaram a microalga *Spirulina* sp. em FBRT de 4 L com adição de 6, 12 e 18 % (v/v) de CO₂ sintético durante 15 min a cada 2 h na fase clara de cultivo e obtiveram FDM, respectivamente, 9,15; 5,44 e 3,48 % (v/v) de CO₂. Li et al. (2013) avaliaram a eficiência de fixação de CO₂ da microalga *Chlorella vulgaris* com injeção de 15 % (v/v) de gás com vazão 0,05 L.min⁻¹ em biorreator tipo *raceway* fechado e obtiveram 36 % de eficiência na remoção de CO₂. Ramanan et al. (2010) cultivaram a microalga *Spirulina platensis* com injeção de 10 % (v/v) de CO₂ e observaram que aproximadamente 15 % do dióxido de carbono adicionado no cultivo foi removido pela micro-organismo. *Spirulina* sp. foi cultivada com ar enriquecido com 12 % (v/v) de CO₂ e a FDM obtida foi 0,21 g_{CO2fixado}.g⁻¹_{CO2injetado}.d⁻¹ (ROSA et al., 2011). Resultados superiores foram encontrados neste trabalho, em que a microalga cultivada com injeção de ar enriquecido com CO₂ (ensaio E2) apresentou FDM 0,27

$\text{g}_{\text{CO}_2\text{fixado}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{CO}_2\text{injetado}} \cdot \text{d}^{-1} \pm 0,06 \text{ g}_{\text{CO}_2\text{fixado}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{CO}_2\text{injetado}} \cdot \text{d}^{-1}$ no 5º dia de cultivo e quando cultivada com adição de biogás contendo 25 % (v/v) (ensaio E3), esse micro-organismo fixou $0,31 \text{ g}_{\text{CO}_2\text{fixado}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{CO}_2\text{injetado}} \cdot \text{d}^{-1} \pm 0,02 \text{ g}_{\text{CO}_2\text{fixado}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{CO}_2\text{injetado}} \cdot \text{d}^{-1}$ no 4º dia de ensaio.

A FM de CO₂ pela microalga *Spirulina* após 8 d de cultivo, ao final da série de FBRTs, para os ensaios E2 e E3 foram, respectivamente, 39,4 % e 44,4 % de CO₂, apresentando-se semelhante a estudos anteriores. Morais e Costa (2007a) estudaram a biofixação de *Spirulina* sp. em FBRTs em série com injeção de 6 % e 12 % (v/v) CO₂ durante 15 min a cada 2 h no período claro de cultivo e observaram valores de fixação média (FM) de dióxido de carbono ao final dos três FBRTs variando, respectivamente, de 27,14 % a 37,9 % e 6,7 % a 17,06 %.

A maior biofixação diária total (FDT) (58,01 %) de CO₂ pela *Spirulina* sp. LEB-18 após os 3 FBRTs foi observada no 5º dia de cultivo, quando a microalga foi cultivada com injeção de biogás contendo 25 % (v/v) CO₂ (ensaio E3) (Figura 6). No cultivo com adição de ar enriquecido com 25 % (v/v) CO₂ (ensaio E2), a maior FDT (51,23 %) foi obtida no 6º dia de cultivo (Figura 6), não diferindo significativamente do ensaio E3 ($p > 0,05$). Radmann et al. (2011) utilizaram 12 % (v/v) CO₂ nos cultivos de *Spirulina* sp. e *Chlorella vulgaris* em FBRTs em série e obtiveram, respectivamente, 14,85 % e 13,43 % de CO₂ removido pelas microalgas. *Spirulina* sp. foi cultivada em FBRTs em série e biofixou 53,29 % de CO₂ no 7º dia de cultivo quando adicionado 6 % CO₂ e 45,61 % de CO₂ com injeção de 12 % (v/v) de CO₂ (MORAIS; COSTA, 2007a). Sydney et al. (2010) cultivaram *Spirulina* LEB-12 em biorreator aberto de 8 L com injeção de 10 % (v/v) CO₂ encontrando eficiência de biofixação de 39 %. Lam e Lee (2013) avaliaram a capacidade da microalga *Chlorella vulgaris* em biofixar CO₂ (5 %, v/v) em 5 FBRTs em série com recirculação do meio nos cultivos e observaram que após o 5º FBRT a eficiência de remoção de CO₂ foi 12 %.

Segundo Pires et al. (2012) a eficiência de remoção de CO₂ por microalgas pode ser aumentada com a recirculação do CO₂ em sistemas de FBRTs em série. No entanto, o CO₂ fornecido deve estar sempre acima do mínimo necessário para o crescimento celular da microalga com a finalidade de não limitar a realização da fotossíntese pelo micro-organismo presente no FBRT seguinte. Outro fator importante e que pode causar a inibição do crescimento celular é o O₂ produzido durante a fotossíntese, pois esse oxigênio tende a se acumular no sistema devido à recirculação de gases, e deve, portanto ser removido para evitar altas concentrações desse gás no meio. Pode-se observar no presente trabalho que a quantidade de CO₂ fornecida

durante os ensaios foi maior que o necessário para o desenvolvimento celular da microalga.

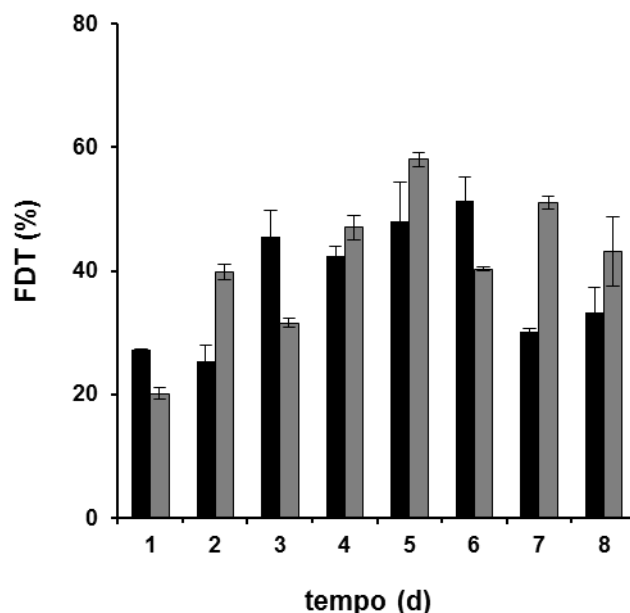


Figura 6 Fixação diária total (FDT, %) de CO_2 para a microalga *Spirulina* sp. LEB-18 após os três FBRTs em série para: E2 (■): ar enriquecido com 25 % (v/v) CO_2 e E3 (■): biogás (25 % (v/v) CO_2 e 75 % (v/v) CH_4).

Durante o crescimento autotrófico de microalgas, a iluminância é um dos pré-requisitos para a realização da fotossíntese, com a finalidade de fornecer energia necessária para o crescimento celular e para a fixação de CO_2 no ciclo de Calvin (SOLETTO et al., 2008). Um fator relacionado à intensidade luminosa é a densidade da cultura, pois em cultivos com concentrações elevadas de micro-organismos podem ocorrer o efeito de sombreamento das células, reduzindo assim, o nível de luminosidade no FBRT e por consequência a fixação de CO_2 pelas microalgas (CHENG et al., 2006; COSTA et al., 2004). No presente trabalho este fenômeno pode ter sido um dos fatores da redução na remoção do CO_2 pela microalga *Spirulina*, pois no quarto dia obteve-se a maior FDT de CO_2 e logo após observou-se uma redução na eficiência de remoção do gás (Figura 6). Porém, mesmo assim encontrou-se FDT de CO_2 próximas às relatadas por outros autores, variando entre 25,33-51,23 % quando a microalga foi cultivada com ar enriquecido com 25 % (v/v) CO_2 (ensaio E2) e 21,53-58,01 % para o cultivo com injeção de biogás (ensaio E3).

A maior concentração de metano no biogás (89,5 %) obtida após a remoção biológica do CO_2 pela microalga *Spirulina* sp. LEB-18 na série de FBRTs foi

observada no 4º dia de ensaio (Figura 7). Após passagem do biogás pelo FBRT1, a microalga apresentou uma fixação média (FM) de CO₂ de 15,0 % (v/v), obtendo-se biogás com 78,8 % (v/v) de CH₄. A maior concentração de CH₄ no biogás após o FBRT1 foi 80,0 % (v/v), obtida no 4º dia de ensaio (Figura 7). Quando o biogás passou pelo segundo FBRT da série (FBRT2), observou-se que 15,7 % (v/v) do CO₂ presente no biogás foi removido pela microalga, resultando em 82,7 % (v/v) CH₄ na mistura. A maior concentração de CH₄ obtida no FBRT2 foi 84,5 % (v/v) (4º dia de cultivo). No FBRT3, obteve-se concentração média de CH₄ de 86,1 % (v/v), após 8 d de ensaio, com FM do CO₂ presente na corrente gasosa de 13,7 % (v/v).

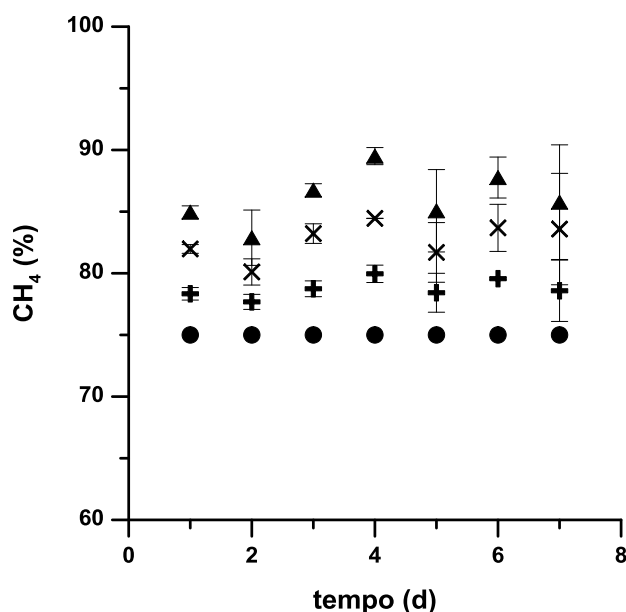


Figura 7 Concentração de metano purificado no ensaio E3 realizado em FBRTs em série após remoção biológica do CO₂ pela microalga *Spirulina* sp. LEB-18 em cada FBRT: (●) concentração de CH₄ na entrada do FBRT1; (+) concentração de CH₄ na saída FBRT1; (X) concentração de CH₄ na saída FBRT2 e (▲) concentração de CH₄ na saída FBRT3.

Converti et al. (2009) avaliaram a capacidade da microalga *Spirulina platensis* em remover o CO₂ do biogás como contaminante e observaram que aproximadamente 95 % do carbono presente na biomassa microalgal foi obtido através da biofixação do CO₂ contido no biocombustível. Kao et al. (2012b) cultivaram a microalga mutante *Chlorella* sp. MB-9 em biogás contendo 69,4 % (v/v) CH₄ e 20,3 % (v/v) CO₂, aplicando quatro vazões de biogás (0,05; 0,1; 0,2 e 0,3 vvm) e

observaram que a maior concentração de CH₄ no gás (91,1 %, v/v) foi obtida quando utilizado 0,05 vvm, aumentando a concentração de CH₄ no biogás em até 70 % em relação à concentração inicial (69,4 %). Segundo os autores, isso ocorreu devido à coalescência das bolhas de gás no meio, pois com a diminuição do fluxo de gás aumentou o tempo de retenção do biogás no FBRT. *Arthrospira* sp. foi cultivada com injeção de biogás resultante da digestão anaeróbia de melaço. Foi injetado biogás com duas diferentes concentrações de CH₄: 55 % e 71 % (v/v); após injeção na cultura microalgal o teor de CH₄ aumentou até 88 % e 97 % (v/v), respectivamente, enquanto a concentração de dióxido de carbono diminuiu para 11,5 % e 2,5 % (v/v), respectivamente (TRAVIESO et al., 1993). No presente trabalho, os resultados foram semelhantes aos encontrados por estes autores. A microalga *Spirulina*, ao final do processo de purificação, removeu 44,4 % (v/v) do CO₂ da mistura, aumentando assim, a concentração de CH₄ no biogás para aproximadamente 90 % (v/v), tornando este gás um combustível de maior valor agregado e destinando-o para fins mais nobres.

3.3.5 Conclusão

A injeção de biogás composto por CH₄ e CO₂ no cultivo de *Spirulina* sp. LEB-18 resultou em parâmetros cinéticos de crescimento iguais aos obtidos em cultivos com diferentes fontes de carbono (NaHCO₃ e CO₂ sintético), podendo esta microalga ser utilizada para obtenção de metano purificado.

A maior concentração celular ($X_{m\acute{a}x}$, 1,24 g.L⁻¹) foi obtida quando a microalga foi cultivada com injeção de biogás contendo 25 % (v/v) de CO₂. A máxima produtividade ($P_{m\acute{a}x}$) variou de 0,11 a 0,14 g.L⁻¹.d⁻¹, nos cultivos realizados com as diferentes fontes de carbono, porém, sem diferença estatística, indicando que os cultivos com biogás sintético apresentam parâmetros de crescimento superiores ou, no mínimo iguais àqueles obtidos com utilização das outras fontes de carbono.

Cultivos da microalga *Spirulina* em fotobiorreatores em série apresentaram fixação diária total (FDT) de CO₂ de 58,01 % (v/v) e 51,23 % (v/v) nos ensaios realizados com injeção de biogás e ar enriquecido com CO₂ como fonte de carbono, respectivamente.

Nas condições presentes nesse estudo foi possível obter biogás com 89,5 % (v/v) de CH₄, partindo da injeção do combustível com 75 % (v/v) de CH₄ em cultivos de microalga *Spirulina*, no qual aproximadamente 45 % (v/v) do CO₂ injetado foi fixado pelas células, gerando biomassa para diversas aplicações e biogás purificado.

Agradecimento: Os autores agradecem ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, à FAPERGS – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul e à CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

3.3.6 Referências bibliográficas

ANDRADE, M. R., CAMERINI, F. V., COSTA, J. A. V. Perda química de carbono e cinética do crescimento celular em cultivos de *Spirulina*. *Química Nova*. v. 31 (8), p. 2031-2034, 2008.

CAMPOS, C. E. P. S. Estudo do equilíbrio de fases do sistema ternário gás + hexadecano + água de produção: dados experimentais e modelagem termodinâmica. Tese de Doutorado em Engenharia Química – COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

CHENG, L., ZHANG, L., CHEN, H., GAO, C. Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in a membrane-photobioreactor. *Separation and Purification Technology*. v. 50, p. 324-329, 2006.

CONNELL, D. W. *Basic Concepts of Environmental Chemistry*. Second edition. Boca Raton: CRC Press, 2005.

CONVERTI, A., OLIVEIRA, R. P. S., TORRES, B. R., LODI, A., ZILLI, M. Biogas production and valorization by means of a two steps biological process. *Bioresource Technology*. v. 100, p. 5771-5776, 2009.

COSTA, J. A. V., MORAIS, M. G. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. *Bioresource Technology*. v. 102, p. 2-9, 2011.

COSTA, J. A. V., COLLA, L. M., DUARTE-FILHO, P. Improving *Spirulina platensis* biomass yield using a fed-batch process. *Bioresource Technology*. v. 92 (3), p. 237-241, 2004.

COSTA, J. A. V., LINDE, G. A., ATALA, D. I. P., MIBIELLI, G. M., ARRIECHE, L., KRÜGER, R. T. Modelling of growth conditions for cyanobacterium *Spirulina platensis* in microcosms. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. v. 16 (1), p. 15-18, 2000.

ÇELEKLI, A., YAVUZATMACA, M., BOZKURT, H. Modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of phosphate concentrations and pH regimes. *Bioresource Technology*. v. 100, p. 3625-3629, 2009.

DEMIRBAS, A. Use of algae as biofuel sources. *Energy Conversion and Management*. v. 51, p. 2738-2749, 2010.

HU, Q. Environmental effects on cell composition. In: Richmond, A., *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. USA: CRC Press. p. 577, 2004.

HUNTER, D. *The diseases of occupations*. 6th ed. London: Hodder and Stoughton. p. 630-632, 1978.

KAMENS, R. M., STERN, A. C., Methane in air quality and automobile exhaust emission standards. *Journal of The air Pollution Control Association*. v. 23 (7), 592-596, 1973.

KAO, C.-Y., CHIU, S.-Y., HUANG, T.-T., DAI, L., WANG, G.-H., TSENG, C.-P., CHEN, C.-H., LIN, C.-S. A mutant strain of microalga *Chlorella* sp. For the carbon dioxide capture from biogas. *Biomass and Bioenergy*. v. 36, p. 132-140, 2012a.

KAO, C.-Y., CHIU, S.-Y., HUANG, T.-T., DAI, L., HSU, L.-K., LIN, C.-S. Ability of a mutant strain of the microalga *Chlorella* sp. to capture carbon dioxide for biogas ungrading. *Applied Energy*. v. 93, p. 176-183, 2012b.

KAPLAN, D., RICHMOND, A. E., DUBINSKY, Z., AARONSON, S. Algal Nutrition. In: RICHMOND, A. *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Boston: CRC Press, 174-198, 1990.

KIRK, J. T. O. *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*. Camberra: Cambridge University Press, p. 509, 1994.

LAM, M. K., LEE, K. T. Effect of carbon source towards the growth of *Chlorella vulgaris* for CO₂ bio-mitigation and biodiesel production. *International Journal of Greenhouse Gas Control*. v. 14, p. 169-176, 2013.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 2a. ed. São Paulo: Sarvier, ISBN 85-7378-026-6, 1995.

LI, S., LUO, S., GUO, R. Efficiency of CO₂ fixation by microalgae in a closed *raceway* pond. *Bioresource Technology*. In press. 2013.

- MORAIS, M. G., STILLINGS, C., DERSCH, R., RUDISILE, M., PRANKE, P., COSTA, J. A. V., WENDORFF, J. Preparation of nanofibers containing the microalga *Spirulina* (*Arthrospira*). *Bioresource Technology*. v. 101, p. 2872-2876, 2010.
- MORAIS, M. G., COSTA, J. A. V., MARINS, L. F. F., REICHERT, C. C., DALCANTON, F., DURANTE, A. J. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. *Zeitschrift für Naturforschung. Journal of Biosciences*. v. 63c, p. 144-150, 2008.
- MORAIS, M. G., COSTA, J. A. V. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*. v. 129, p. 439-445, 2007a.
- 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. *Biotechnology Letters*. v. 29 (9), p. 1349-1352, 2007c.
- PENNINGTON, K., FUERST, R. Biochemical and morphological effects of various gases on rabbit erythrocytes. *Archives of Environmental & Occupational Health*. v. 22, p. 476-481, 1971.
- PERRY, R. H., GREEN, D. W. *Perry's Chemical Engineers' Handbook*. Seventh edition. McGraw-Hill, 1997.
- PIRES, J. C. M., ALVIM-FERRAZ, M. C. M., MARTINS, F. G., SIMÕES, M. Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: Engineering aspects and biorefinery concept. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. v. 16, p. 3043-3053, 2012.
- RADMANN, E. M., CAMERINI, F. V., SANTOS, T. D., COSTA, J. A. V. Isolation and application of SO_x and NO_x resistant microalgae in biofixation of CO₂ from thermoelectricity plants. *Energy Conversion and Management*. v. 52, p. 3132-3136, 2011.
- RAMANAN, R., KANNAN, K., DESHKAR, A., YADAV, R., CHAKRABARTI, T. Enhanced algal CO₂ sequestration through calcite deposition by *Chlorella* sp. and *Spirulina platensis* in a mini-raceway pond. *Bioresource Technology*. v. 101, p. 2616-2622, 2010.
- REICHERT, C. C., REINEHR, C. O., COSTA, J. A. V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. v. 23 (1), p. 23-28, 2006.

RICHMOND, A., GROBBELAAR, J. U. Factors affecting the output rate of *Spirulina platensis* with reference to mass cultivation. *Biomass*. v. 10, p. 253-264, 1986.

ROSA, A. P. C., CARVALHO, L. F., GOLDBECK, L., COSTA, J. A. V. Carbon dioxide fixation by microalgae cultivated in open bioreactors. *Energy Conversion and Management*. v. 52, p. 3071-3073, 2011.

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

SOLETTI, D., BINAGHI, L., FERRARI, L., LODI, A., CARVALHO, J. C. M., ZILLI, M., CONVERTI, A. Effect of carbon dioxide feeding rate and light intensity on the fed-batch pulse-feeding cultivation of *Spirulina platensis* in helical photobioreactor. *Biochemical Engineering Journal*. v. 39 (2), p. 369-375, 2008.

SYDNEY, E. B., STURM, W., CARVALHO, J. C., THOMAZ-SOCCOL, V., LARROCHE, C., PANDEY, A., SOCCOL, C. R. Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. *Bioresource Technology*. v. 101, p. 5892-5896, 2010.

TERASAKA, K., HIRABAYASHI, A., NISHINO, T., FUJIOKA, S., KOBAYASHI, D. Development of microbubble aerator for waste water treatment using aerobic activated sludge. *Chemical Engineering Science*. v. 66, p. 3172-3179, 2011.

TRAVIESO, L., SANCHEZ, E. P., BENITEZ, F., CONDE, J. L. *Arthrospira* sp. intensive cultures for food and biogas purification. *Biotechnology Letters*. v. 15, p. 1091-1094, 1993.

XU, Q., NAKAJIMA, M., LIU, Z., SHIINA, T. Biosurfactants for microbubble preparation and application. *International Journal of Molecular Sciences*. v. 12, p. 462-475, 2011.

ZARROUK, C. Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthèse de *Spirulina maxima* Geitler. 1966. Ph.D. Thesis, University of Paris.

CAPÍTULO IV: CONCLUSÃO GERAL

4 CONCLUSÃO GERAL

A biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB-18 pode ser utilizada como substrato para produzir biogás em escala piloto e em temperaturas variáveis. A digestão anaeróbia em escala piloto sob temperaturas não controladas (26-38 °C e 12-21 °C) conduziu a resultados de decomposição de biomassa (82,2 % e 69,3 %), conversão dos sólidos voláteis da biomassa em CH₄ (0,30 e 0,22 g.g⁻¹) e concentração de metano no gás (74,4 % e 72,2 %), respectivamente. A produção de biogás a partir de *Spirulina* sp. LEB-18, em ambas as temperaturas estudadas, resultou em fatores físico-químicos como pH (6,9), alcalinidade (1706,0-2248,0 mg.L⁻¹ CaCO₃) e concentração de nitrogênio amoniacal (479,3-661,7 mg.L⁻¹) dentro da faixa adequada e segura para as bactérias anaeróbias.

A redução na concentração da fonte de carbono (NaHCO₃) e a complementação do meio com efluente anaeróbio para o cultivo semicontínuo de *Spirulina* sp. LEB-18 é uma alternativa para redução dos custos com nutrientes e obtenção de biomassa com cinética de crescimento e composição semelhante às obtidas em meio Zarrouk. Os cultivos da microalga em efluente anaeróbio (20 %,v/v) e com fonte reduzida de carbono (NaHCO₃ 2,8 e 5,3 g.L⁻¹) apresentaram velocidade específica máxima de crescimento entre 0,324 e 0,354 d⁻¹, produtividade volumétrica entre 0,280 e 0,297 g.L⁻¹.d⁻¹ e produtividade areal entre 14,00 e 14,85 g.m⁻².d⁻¹, sem diferenças significativas entre as diferentes condições estudadas. A biomassa de *Spirulina* produzida com efluente e a menor concentração de carbono (NaHCO₃ 2,8 g.L⁻¹) apresentou 5,0 % de lipídios, alto teor proteico (60,3 %), perfil de ácidos graxos com 41,96 % de ácidos graxos saturados, 42,23 % de poli-insaturados, e 12,94 % de ácido graxo essencial linoleico.

A injeção de biogás composto por CH₄ e CO₂ no cultivo de *Spirulina* sp. LEB-18 em fotobiorreatores em série resultou em parâmetros cinéticos de crescimento iguais aos obtidos em cultivos com diferentes fontes de carbono (NaHCO₃ e CO₂ sintético), podendo esta microalga ser utilizada para obtenção de metano purificado. A maior concentração celular ($X_{m\acute{a}x}$, 1,24 g.L⁻¹) foi obtida quando a microalga foi cultivada com injeção de biogás contendo 25 % (v/v) de CO₂. A máxima produtividade ($P_{m\acute{a}x}$) variou de 0,11 a 0,14 g.L⁻¹.d⁻¹, nos cultivos realizados com as diferentes fontes de carbono, porém, sem diferença estatística. As fixações diárias totais (FDT) de CO₂ pela microalga *Spirulina* foram, respectivamente, 58,01 % (v/v) e 51,23 % (v/v) nos ensaios realizados com injeção de biogás e ar enriquecido com CO₂ como fonte de

carbono. Foi possível obter biogás com 89,5 % (v/v) de CH₄, através da injeção de biogás sintético com 75 % (v/v) de CH₄ em cultivos de *Spirulina*, no qual aproximadamente 45 % (v/v) do CO₂ injetado foi fixado pela microalga, gerando biomassa para diversas aplicações e biocombustível gasoso purificado.

Os resultados obtidos no presente trabalho intensificam o potencial de utilização da microalga *Spirulina* como fonte de biomassa para produção de biogás em escala piloto, mesmo que em temperaturas abaixo da ótima. Foi possível levantar dados de grande importância para digestão anaeróbia sob condições mesofílicas e psicofílicas, demonstrando potencial para aplicação de biomassa microalgal em processos sob estas condições. Além disso, a microalga *Spirulina* sp. LEB-18 apresentou-se como uma alternativa para obtenção de metano purificado através da remoção de CO₂ presente no biogás como contaminante e capaz de consumir nutrientes do efluente líquido do processo anaeróbio.

4.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Estudar outras configurações de biorreatores anaeróbios para produção de biogás utilizando biomassa microalgal como substrato;

Produzir biogás a partir de biomassa microalgal residual, após extração de lipídios para produção de biodiesel;

Avaliar economicamente o potencial de utilização da biomassa microalgal para produção de biogás;

Realizar modelagem matemática do processo anaeróbio em condições não controladas a partir dos dados aqui apresentados;

Avaliar o consumo de outros nutrientes presentes no efluente anaeróbio em cultivo microalgal com a finalidade de redução de custos com meios de cultura;

Estudar a remoção biológica de CO₂ do biogás através de microalgas em cultivo semicontínuo utilizando fotobiorreatores em série em escala piloto;

Automatizar o controle do pH dos cultivos, no qual a injeção do biogás seja acionada de acordo com a variação do pH no meio;

Estudar outras formas de transferência de CO₂ para o meio utilizando micro e nanobolhas, fotobiorreatores de membrana, etc;

Caracterizar a biomassa de microalgas cultivadas em efluente anaeróbio e injeção de biogás quanto à sua composição microbiológica para avaliar a aplicabilidade da biomassa.

CAPÍTULO V: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGLER, M. T., AYDINKAYA, Z., CUMMINGS, T. A., BEERS, A. R., ANGENENT, L. T. Anaerobic digestion of brewery primary sludge to enhance bioenergy generation: A comparison between low-and high-rate solids treatment and different temperatures. *Bioresource Technology*. v. 101, p. 5842-5851, 2010.
- ALAVA, D., MELLO, P. C., WAGENER, K. The relevance of the CO₂ partial pressure of sodium bicarbonate solutions for the mass cultivation of the microalga *Spirulina*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. v. 8 (5), p. 447-450, 1997.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J. RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. D. *Biologia molecular da célula*. Editora Artes Médicas, 3 ed., Porto Alegre, RS. 1997.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. D. *Biologia molecular da célula*. 3ª. ed., Porto Alegre: Artes Médicas, ISBN 85-7307-191-5, 1994.
- ALVAREZ, R., LIDÉN, G. Low temperature anaerobic digestion of mixtures of llama, cow and sheep manure for improved methane production. *Biomass and Bioenergy*. v. 33, p. 527-533, 2009.
- ALVAREZ, R., LIDÉN, G. The effect of temperature variation on biomethanation at high altitude. *Bioresource Technology*. v. 99, p. 7278-7284, 2008.
- ALVAREZ, R., VILLCA, S., LIDÉN, G. Biogas production from llama and cow manure at high altitude. *Biomass and Bioenergy*. v. 30, p. 66-75, 2006.
- AMARO, H. M., GUEDES, A. C., MALCATA, F. X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*. v. 88 (10), p. 3402-3410, 2011.
- ANDRADE, M. R. *Biosistema para produção de biomassa microalgal e biometano*. Tese de Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos – FURG, Rio Grande, 2009.
- ANDRADE, M. R., COSTA, J. A. V. Outdoor and indoor cultivation of *Spirulina platensis* in the extreme south of Brazil. *Zeitschrift Naturforschung*. v. 63, p. 85-90, 2008.
- ANDRADE, M. R., COSTA, J. A. V. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. *Ciência e Agrotecnologia*. v. 32 (5), p.1551-1556, 2008.

ANDRADE, M. R., CAMERINI, F. V., COSTA, J. A. V. Perda química de carbono e cinética do crescimento celular em cultivos de *Spirulina*. Química Nova. v. 31 (8), p. 2031-2034, 2008.

ANDRADE, M. R., COSTA, J. A. V. Mixotrophic cultivation of Microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. Aquaculture (Amsterdam). v. 264, p. 130-134, 2007.

ANGELIDAKI, I., AHRING, B. K. Anaerobic thermophilic digestion of manure at different ammonia loads: effect of temperature. Water Research. v. 28 (3), p. 727-731, 1994.

ANGELIDAKI, I., AHRING, B. K. Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. Applied Microbiology and Biotechnology. v. 38, p. 560-564, 1993.

AMON, T., AMON, B., KRYVORUCHKO, V., ZOLLITSCH, W., MAYER, K., GRUBER, L. Biogas production from maize and dairy cattle manure – Influence of biomass composition on the methane yield. Agriculture, Ecosystems and Environment. v. 118, p. 173-182, 2007.

AOAC - Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 17th ed., HORWITZ, W. ed. Maryland: Association of Official Analytical Chemists, 2000.

APHA (American Public Health Association). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. APHA-AWWAWPCF, 20th ed., Washington, DC, 1998.

AQUINO, S. F., CHERNICHARO, C. A. L. Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle. Engenharia Sanitária e Ambiental. v. 10, p. 152-161, 2005.

BAILEY, J. E., OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals, 2th ed., Singapore: McGraw-Hill, 1986.

BANERJEE, A.; SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. *Botryococcus braunii*: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. Critical Reviews in Biotechnology. v. 22, p. 245-79, 2002.

BECKER, E. W. Micro-algae for human and animal consumption. In: BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J., editors. Micro-algal Technology. Cambridge University Press. p. 222-256, 1988.

BELAY, A. Mass culture of *Spirulina* outdoors – The Earthrise farms experience. In: VONSHAK, A. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*) Physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis, 1997.

BENEMANN, J. R. – CO₂ Mitigation with microalgae systems. *Energy Conversion Management*, 38, S475-479, 1997.

BINAGHI, L., DEL BORGHI, A., LODI, A., CONVERTI, A., DEL BORGHI, M. Batch and fed-batch uptake of carbon dioxide by *Spirulina platensis*. *Process Biochemistry*. v. 38 (9), p. 1341-1346, 2003.

BITOG, J. P., LEE, I.-B., LEE, C.-G., KIM, K.-S., HWANG, H.-S., HONG, S.-W., SEO, I.-H., KWON, K.-S., MOSTAFA, E. Application of computational fluid dynamics for modeling and designing photobioreactors for microalgae production: A review. *Computers and electronics in Agriculture*. v. 76, p. 131-147, 2011.

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

BOUGRIER, C., ALBASI, C., DELGENÈS, J. P., CARRÈRE, H. Effect of ultrasonic, thermal and ozone pretreatments on waste activated sludge solubilisation and anaerobic biodegradability. *Chemical Engineering and Processing*. v. 45, p. 711-718, 2006.

BRIAND, X., MORAND, P. Anaerobic digestion of *Ulva* sp. 1. Relationship between *Ulva* composition and methanisation. *Journal of Applied Microbiology*. v. 9, p. 511-524, 1997.

CABANELAS, I. T. D., ARBIB, Z., CHINALIA, F. A., SOUZA, C. O., PERALES, J. A., ALMEIDA, P. F., DRUZIAN, J. I., NASCIMENTO, I. A. From waste to energy: Microalgae production in wastewater and glycerol. *Applied Energy*. v. 109, p. 283-290, 2013.

CAI, T., PARK, S. Y., LI, Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. v. 19, p. 360-369, 2013.

CAMACHO, R. F., GARCIA, C. F., SEVILLA, F. J. M., CHISTI, Y., MOLINA, G. E. Mechanistic model of photosynthesis in microalgae. *Biotechnology bioengineering*. v. 81, p. 459-473, 2003.

CAMERINI, F. V. Modelagem aplicada ao processo de biofixação de CO₂ por microalgas. Tese de Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos – FURG, Rio Grande, 2012.

CAMERINI, F. V. Fixação biológica de dióxido de carbono por *Spirulina (Arthrospira) platensis*. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos – FURG, Rio Grande, 2008.

CAMPO, J. A., GONZÁLEZ, M. G., GUERRERO, M. G. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 74, p. 1163-1174, 2007.

CAMPOS, C. E. P. S. Estudo do equilíbrio de fases do sistema ternário gás + hexadecano + água de produção: dados experimentais e modelagem termodinâmica. Tese de Doutorado em Engenharia Química – COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

CARMOUZE, J. P. O metabolismo dos Ecossistemas Aquáticos: Fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas. São Paulo: Edgard Blücher LTDA. p. 253, 1994.

CARVALHO, L. F. Desenvolvimento de novos alimentos para praticantes de atividade física adicionados ou não de *Spirulina*. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos – FURG, Rio Grande, 2010.

CERÓN-GARCÍA, M. C., MACÍAS-SANCHEZ, M. D., SÁNCHEZ-MIRÓN, A., GARCÍA-CAMACHO, F., MOLINA-GRIMA, E. A process for biodiesel production involving the heterotrophic fermentation of *Chlorella protothecoides* with glycerol as the carbon source. *Applied Energy*. v. 103, p. 341-349, 2013.

CHAIKLAHAN, R., CHIRASUWAN, N., SIANGDUNG, W., PAITHOONRANGSARID, K., BUNNAG, B. Cultivation of *Spirulina platensis* using pig wastewater in a semi-continuous process. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. v. 20 (3), p. 609-614, 2010.

CHANG, Y., WU, Z., BIAN, L., FENG, D., LEUNG, D. Y. C. Cultivation of *Spirulina platensis* for biomass production and nutrient removal from synthetic human urine. *Applied Energy*. v. 102, p. 427-431, 2013.

CHANG, E. H., YANG, S. S. Some characteristics of microalgae isolated in Taiwan for biofixation of carbon dioxide. *Botanical Bulletin Academia Sinica*. v. 44, p. 43-52, 2003.

CHEN, Y., CHENG, J. J., CREAMER, K. S. Inhibition of anaerobic digestion process. A review. *Bioresource Technology*. v. 99, p. 4044-4064, 2008.

CHEN, P. H., OSWALD, W. J. Thermochemical treatment for algal fermentation. *Environment International*. V. 24, p. 889-897, 1998.

CHENG, L., ZHANG, L., CHEN, H., GAO, C. Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in a membrane-photobioreactor. *Separation and Purification Technology*. v. 50, p. 324-329, 2006.

CHEIRSILP, B., TORPEE, S. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource Technology*. v. 110, p. 510-516, 2012.

CHERNICHARO, C. A. L. *Reatores Anaeróbios*. V. 5, 2ª ed.. Editora Belo Horizonte: UFMG, 2007.

CHERNICHARO, C. A. L. *Reatores anaeróbios*. Série: Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. 5ª ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária – UFMG. v.5, p. 245, 1997.

CHEUNBARN, S., PEERAPORNPIPAL, Y. Cultivation of *Spirulina platensis* using anaerobically swine wastewater treatment effluent. *International Journal of Agriculture & Biology*. v. 12 (4), p. 586-590, 2010.

CHI, Z., LIU, Y., FREAR, C., CHEN, S. Study of a two-stage growth of DHA-producing marine algae *Schizochytrium limacinum* SR21 with shifting dissolved oxygen level. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 81, p. 1141-1148, 2009.

CHIANG, C. L., LEE, C. M., CHEN, P. C. Utilization of the cyanobacteria *Anabaena* sp. CH1 in biological carbon dioxide mitigation processes. *Bioresource Technology*. v. 102, p. 5400-5405, 2011.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. v. 25, p. 294-306, 2007a.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*. v. 26, p. 126-131, 2007b.

CHIU, S. Y., KAO, C. Y., TSAI, M. T., ONG, S. C., CHEN, C. H., LIN, C. S. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresource Technology*. v. 100, p. 833-838, 2009.

CHOJNACKA, K., MARQUEZ-ROCHA, F. J. Kinetic and Stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. *Biotechnology Advances*. v. 3, p. 21-34, 2004.

CINGI, C., DALAY, M. C., CAKLI, H., BAL, C. The effects of *Spirulina* on allergic rhinitis. *European Archives of Otorhinolaryngology*. v. 265, p. 1219-1223, 2008.

COELHO, N. M. G., DROSTE, R. L., KENNEDY, K. J. Evaluation of continuous mesophilic, thermophilic and temperature phased anaerobic digestion of microwaved activated sludge. *Water Research*. V. 45, p. 2822-2834, 2011.

COHEN, Z. The chemicals of *Spirulina*. In: Vonshak, A., *Spirulina platensis (Arthrospira) Physiology, cell-biology and biotechnology*, Ed. Taylor & Francis, London, 1997.

COLLA, L. M., MUCCILLO-BAISCH, A. L., COSTA, J. A. V. *Spirulina platensis* effects on the levels of total cholesterol, HDL and triacylglycerols in rabbits fed with a hypercholesterolemic diet. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. v. 51, p. 405-411, 2008.

COLLA, L. M., FURLONG, E. B., COSTA, J. A. V. Antioxidant properties of *Spirulina (Arthrospira) platensis* cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. *Brazilian archives of biology and technology*. v. 50, p. 161-167, 2007.

COLLA, L. M., REINEHR, C. O., REICHERT, C., COSTA, J. A. V. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresource Technology*. v. 98, p. 1489-1493, 2007.

COLLA, L. M., BERTOLIN, T. E., COSTA, J. A. V. Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. *Zeitschrift für . Naturforschung*. v. 59c, p. 55-59, 2004.

COLLA, L., RUIZ, W. A., COSTA, J. A. V. Metabolismo de carbono e nitrogênio em microalgas. *Vetor*. v. 12, p. 61-78, 2002.

CONDE, J. L., MORO, L. E., TRAVIESO, L., SANCHEZ, E. P., LEIVA, A., DUPEIRÓN, R., ESCOBEDO, R. Biogas purification process using intensive microalgae cultures *Biotechnology Letters*. v. 15, p. 3, 1993.

CONNELL, D. W. *Basic Concepts of Environmental Chemistry*. Second edition. Boca Raton: CRC Press, 2005.

CONVERTI, A., OLIVEIRA, R. P. S., TORRES, B. R., LODI, A., ZILLI, M. Biogas production and valorization by means of a two-step biological process. *Bioresource Technology*. v. 100, p. 5771-5776, 2009.

COSTA, J. A. V., MORAIS, M. G. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. *Bioresource Technology*. v. 102, p. 2-9, 2011.

COSTA, J. A. V., SANTANA, F. B., ANDRADE, M. R., LIMA, M. B., FRANCK, D. T. Microalga biomass and biomethane production in the South of Brazil. *Journal of Biotechnology*. v. 4, p. 73, 2008.

COSTA, J. A. V., COLLA, L. M., DUARTE-FILHO, P. Improving *Spirulina platensis* biomass yield using a fed-batch process. *Bioresource Technology*. v. 92 (3), p. 237-241, 2004.

COSTA, J. A. V., COLLA, L. M., DUARTE-FILHO, P. *Spirulina platensis* growth in open raceway ponds using fresh water supplemented with carbon, nitrogen and metal ions. *Zeitschrift Für Naturforschung*. v. 58, p. 76-80, 2003.

COSTA, J. A. V., COLLA, L. M., DUARTE FILHO, P., KABKE, K., WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. v. 18, p. 603-607, 2002.

COSTA, J. A. V., COZZA, K. L., OLIVEIRA, L., MAGAGNIN, G. Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. v. 17, p. 439-442, 2001.

COSTA, J. A. V., LINDE, G. A., ATALA, D. I. P., MIBIELLI, G. M., ARRIECHE, L., KRÜGER, R. T. Modelling of growth conditions for cyanobacterium *Spirulina platensis* in microcosms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. v. 16 (1), p. 15-18, 2000.

ÇELEKLI, A., YAVUZATMACA, M., BOZKURT, H. Modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of phosphate concentrations and pH regimes. *Bioresource Technology*. v. 100, p. 3625-3629, 2009.

DAGUE, R. R., HABBEN, C. E., PIDAPARTI, S. R. Initial studies on the anaerobic sequencing batch reactor. *Water Science and Technology*. v. 26, p. 2429-2432, 1992.

DEMIRBAS, A. Use of algae as biofuel sources. *Energy Conversion and Management*. v. 51, p. 2738-2749, 2010.

DHAKED, R. K., SINGH, P., SINGH, L. Biomethanation under psychrophilic conditions. *Waster Management*. v. 30, p. 2490-2496, 2010.

DEGBEY, H., HAMADOU, B., OUMAROU, H. Evaluation of effectiveness of the supplementation in *Spirulina* of the usual alimentation of severe malnourished children. In: International Symposium: CSSD Cyanobacteria for Health, Science and Development. p. 12, 2004.

DE BOK, F. A. M., PLUGGE, C. M., STAMS, A. J. M. Interspecies electron transfer in methanogenic propionate degrading consortia. *Water Research*. v. 38, p. 1368-1375, 2004.

DI MONACO, R. Influência da temperature e da carga orgânica no tratamento anaeróbico de esgoto sintético em biorreator operado em batelada sequencial contendo biomassa granulada. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos – São Caetano do Sul – SP, 2007.

DOUCHA, J., STRAKA, F., LIVANSKY, L. Utilization of flue gas for cultivation of microalgae (*Chlorella* sp.) in an outdoor open thin-layer photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*. v. 17, p. 403-412, 2005.

DOUSKOVA, I., DOUCHA, J., LIVANSKY, K., MACHAT, J., NOVAK, P., UMYSOVA, D., ZACHLEDER, V., VITOVA, M. Simultaneous flue gas bioremediation and reduction of microalgal biomass production costs. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 82, p. 179-185, 2009.

EHIMEN, E. A., SUN, Z. F., CARRINGTON, C. G., BIRCH, E. J., EATON-RYE, J. J. Anaerobic digestion of microalgae residues resulting from the biodiesel productions process. *Applied Energy*. v. 88, p. 3454-3463, 2011.

EL-MASHAD, H. M., ZEEMAN, G., VAN LOON, W. K. P., GERARD, P. A. B., LETTINGA, G. Effect of temperature and temperature fluctuation on thermophilic anaerobic digestion of cattle manure. *Bioresource Technology*. v. 95 (2), p. 191-201, 2004.

EVANS, G. M., FURLONG, J. C. *Environmental Biotechnology: Theory and Application*. John Wiley & Sons, England, 2003.

FÁBREGAS, J., OTERO, A., MASEDA, A., DOMINGUEZ, A. Two-stage cultures for the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Biotechnology*. v. 89, p. 67-71, 2001.

FALQUET, J. The nutritional aspects of *Spirulina* - Antenna Technology, 1997. disponível em <http://www.antenna.ch>.

FAN, L., ZHANG, Y., CHENG, L., ZHANG, L., TANG, D., CHEN, H. Optimization of carbon dioxide fixation by *Chlorella vulgaris* cultivated in membrane-photobioreactor. Chemical Engineering Technology. v. 30 (8), p. 1094-1099, 2007.

FENG, C., SHIMADA, S., ZHANG, Z., MAEKAWA, T. A pilot plant two-phase anaerobic digestion system for bioenergy recovery from swine wastes and garbage. Waste Management. v. 28, n. 10, p. 1827-1834, 2008.

FERREIRA, L. S., RODRIGUES, M. S., CONVERTI, A.; SATO, S., CARVALHO, J. C. M. *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivation in tubular photobioreactor: use o no-cost CO₂ ethanol fermentation. Applied Energy. v. 92, p. 379-385, 2012.

FOLCH, J., LEES, M., STANLEY, G. H. S. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. Journal of Biological Chemistry. v. 226, p. 497-509, 1957.

FORESTI, E. Anaerobic treatment of domestic sewage: established technologies and perspectives. Water Science and Technology. v. 45, p. 181-186, 2002.

FORLANI, G., PREARO, V., WIECZOREK, D., KAFARSKI, P., LIPOK, J. Phosphonate degradation by *Spirulina* strains: Cyanobacterial biofilters for the removal of anticorrosive polyphosphonates from wastewater. Enzyme and Microbial Technology. v. 48 (3), p. 299-305, 2011.

FOX, R. D. *Spirulina* production & potential. França: Edisud. ISBN 2-84744-883-X. 1996.

FOX, R. D. Health benefits of *Spirulina* and proposal for a nutrition test on children suffering from Kwashiorkor. In: *Spirulina* Algue de Vie – Bulletin de Institut Océanographique, Monaco. v. 12, p. 179-186, 1993.

FREITAS, B. C. B. Cultivo de microalgas utilizando pentoses como fonte de carbono. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos – FURG, Rio Grande, 2012.

GE, H., JENSEN, P. D., BATSTONE, D. J. Temperature phased anaerobic digestion increases apparent hydrolysis rate for waste activated sludge. Water Research. v. 45, p. 1597-1606, 2011.

- GERARDI, M. H. The microbiology of anaerobic digesters. USA: John Wiley & Sons, 2003.
- GIORDANO, M., BEARDALL, J., RAVEN, J. A. CO₂ concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental, modulation, and evolution. *Annual Review of Plant Biology*. v. 56, p. 99-131, 2005.
- GOODWIN, T. W. Functions of carotenoids. In Goodwin, T. W. (ed.), *The biochemistry of the carotenoids*, Chapter 3. Chapman and Halkl, New York. p. 77-95. 1980.
- GOUVEIA, L., OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. v. 36, p. 269-274, 2009.
- GROBBELAAR, J. U. Algal Nutrition: mineral nutrition. In: Richmond, A., *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. USA: CRC Press. p. 577, 2004.
- GUENDOUZ, J. BUFFIÈRE, P., CACHO, J., CARRÈRE, M., DELGENES, J. Dry anaerobic digestion in batch mode: design and operation of a laboratory-scale, completely mixed reactor. *Waste Manage*. v. 30, p. 1768-1771, 2010.
- GUO, H., DAROCH, M., LIU, L., QIU, G., GENG, S., WANG, G. Biochemical features and bioethanol production of microalgae from coastal Waters of Pearl River Delta. *Bioresource technology*. v. 127, p. 422-428, 2013.
- GUSCHINA, I. A.; HARWOOD, J. L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research*. v. 45, p. 160-186, 2006.
- GUZMAN, H. M., VALIDO, A. J., DUARTE, L. C., PRESMANES, K. F. Estimate by means of flow cytometry of variation in composition of fatty acids from *Tetraselmis suecica* in response to culture conditions. *Aquaculture International*. v. 18, p. 189-199, 2010.
- HALIM, R., GLADMAN, B., DANQUAH, M. K., WEBLEY, P. A. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresource Technology*. v. 102, p. 178-185, 2011.
- HARUN, R., DAVIDSON, M., DOYLE, M., GOPIRAJ, R., DANQUAH, M., FORDE, G. Technoeconomic analysis of an integrated microalgae photobioreactor, biodiesel and biogas production facility. *Biomass and Bioenergy*. v. 35, p. 741-747, 2011.
- HARUN, R., SINGH, M., FORDE, G. M., DANQUAH, M. K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. v. 14, p. 1037-1047, 2010.

HENRARD, A. S. A. Vertical tubular photobioreactor for semicontinuous culture of *Cyanobium* sp. *Bioresource Technology*. v. 102, p. 4897-4900, 2011.

HENRARD, A. S. A. Cultivo semicontínuo das microalgas *Cyanobium* sp. E *Chlorella* sp. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos – FURG, Rio Grande, 2009.

HENRIKSON, R. Microalga *Spirulina*: Superalimento del futuro. Barcelona: Ediciones S.A. Urano, ISBN: 84-7953-047-2, 1994.

HO, S.-H., CHEN, C.-Y., LEE, D.-J., CHANG, J.-S. Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems – A review. *Biotechnology Advances*. v. 29, p. 189-198, 2011.

HORI, T., HARUTA, S., UENO, Y., ISHII, M., IGARASHI, Y. Dynamic transition of a methanogenic population in response to the concentration of volatile fatty acids in a thermophilic anaerobic digester. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 72 (2), p. 1623-1630, 2006.

HU, Q. Environmental effects on cell composition. In: Richmond, A., *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. USA: CRC Press. p. 577, 2004.

HUANG, Z., LI, L., HUANG, G., YAN, Q., SHI, B., XU, X. Growth – inhibitory and metal – binding proteins in *Chlorella vulgaris* exposed to cadmium or zinc. *Aquatic Toxicology*. v. 91, p. 54-61, 2009.

HUNTER, D. *The diseases of occupations*. 6th ed. London: Hodder and Stoughton. p. 630-632, 1978.

HUNTLEY, M. E., REDALJE, D. G. CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal. *Mitig Adapt Strategies Glob Chang*. v. 12, p. 573-608, 2007.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores de Desenvolvimento Sustentável (IDS, 2012). http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/recursosnaturais/ids/default_2012.shtm.

IEA, International Energy Agency. IEA Energy Statistics. Share of total primary energy supply in 2009 <http://www.iea.org/stats/index.asp>, 2011.

IEA, International Energy Agency. CO₂ Emissions from fuel combustion. International Energy Agency, 2009. <[http://www.iea.org/Textbase/nptoc/CO₂_TOC.pdf](http://www.iea.org/Textbase/nptoc/CO2_TOC.pdf)>.

- KAMENS, R. M., STERN, A. C., Methane in air quality and automobile exhaust emission standards. *Journal of The air Pollution Control Association*. v. 23 (7), 592-596, 1973.
- KAO, C.-Y., CHIU, S.-Y., HUANG, T.-T., DAI, L., WANG, G.-H., TSENG, C.-P., CHEN, C.-H., LIN, C.-S. A mutant strain of microalga *Chlorella* sp. For the carbon dioxide capture from biogas. *Biomass and Bioenergy*. v. 36, p. 132-140, 2012a.
- KAO, C.-Y., CHIU, S.-Y., HUANG, T.-T., DAI, L., HSU, L.-K., LIN, C.-S. Ability of a mutant strain of the microalga *Chlorella* sp. to capture carbon dioxide for biogas upgrading. *Applied Energy*. v. 93, p. 176-183, 2012b.
- KAPARAJU, P., BUENDIA, I., ELLEGAARD, L., ANGELIDAKIA, I. Effects of mixing on methane production during thermophilic anaerobic digestion of manure: Lab-scale and pilot-scale studies. *Bioresource Technology*. V. 99, p. 4919-4928, 2008.
- KAPARAJU, P. L. N., RINTALA, J. A. Effects of temperature on post-methanation of degassed dairy cow manure in a farmscale biogas concept. *Environmental Technology*. v. 24 (10), p. 1315-1321, 2003.
- KAPDI, S. S., VIJAY, V. K., RAJESH, S. K., PRASAD, R. Biogas scrubbing, compression and storage: perspective and prospectus in Indian context. *Renewable Energy*. v. 30, p. 1195-1202, 2005.
- KAPLAN, A., REINHOLD, L. CO₂ concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular*. v. 50, p. 539-570, 1999.
- KAPLAN, D., RICHMOND, A. E., DUBINSKY, Z., AARONSON, S. Algal Nutrition. In: RICHMOND, A. *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Boston: CRC Press, 174-198, 1990.
- KARADENIZ, A., CEMEK, M., SIMSEK, N. The effects of *Panax ginseng* and *Spirulina platensis* on hepatotoxicity induced by cadmium in rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 72, p. 231-235, 2009.
- KAYHANIAN, M. Ammonia inhibition in high-solids biogasification: An overview and practical solutions. *Environmental Technology*. v. 20, p. 355-365, 1999.
- KIM, H.-W., NAM, J.-Y., SHIN, H.-S. A comparison study on the high-rate co-digestion of sewage sludge and food waste using a temperature-phased anaerobic sequencing batch reactor system. *Bioresource Technology*. v. 102, p. 7272-7279, 2011.

- KIM, M., GOMEZ, C. Y., AHN, Y., SPEECE, R. E. Hydrolysis and acidogenesis of particulate organic material in mesophilic and thermophilic anaerobic digestion. *Environmental Technology*. v. 24, p. 1183-1190, 2003.
- KIRK, J. T. O. Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. Canberra: Cambridge University Press, p. 509, 1994.
- KOMMAREDDY, A. R., ANDERSON, G. A. Mechanistic modeling of photobioreactor system. ASAE paper n° 057007. ASAE, St. Joseph, Michigan, 2005.
- KOMMAREDDY, A. R., ANDERSON, G. A. Study of light as a parameter in the growth of algae in a photo-bioreactor (PBR). ASAE paper n° 034057. ASAE, St. Joseph, Michigan, 2003.
- KOSTER, I. W., LETTINGA, G. The influence of ammonium-nitrogen on the specific activity of pelletized methanogenic sludge. *Agricultural Wastes*. v. 9 (3), p. 205-216, 1984.
- KRINSKY, N. I. Carotenoid protection against oxidation. *Pure and Applied Chemistry*. v. 51, p. 649-660. 1979.
- KRYLOVA, N. I., KHABIBOULLINE, R. E., NAUMOVA, R. P., NAGEL, M. A. The influence of ammonium and methods of removal during the anaerobic treatment of poultry manure. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. v. 70 (1), p. 99-105, 1997.
- KUMAR, M. S., MIAO, Z. H., WYATT, S. K. Influence of nutrient loads, feeding frequency and inoculum source on growth of *Chlorella vulgaris* in digested piggery effluent culture medium. *Bioresource Technology*. v. 101, p. 6012-6018, 2010.
- LAM, M. K., LEE, K. T., MOHAMED, A. R. Current status and challenges on microalgae-based carbon capture. *International Journal of Greenhouse Gas Control*. v. 10, p. 456-469, 2012.
- LAM, M. K., LEE, K. T. Effect of carbon source towards the growth of *Chlorella vulgaris* for CO₂ bio-mitigation and biodiesel production. *International Journal of Greenhouse Gas Control*. v. 14, p. 169-176, 2013.
- LEE, Y. K. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. *Journal of Applied Phycology*. v. 13 (4), p. 307-315, 2001.
- LEHNINGER, A. L. Bioquímica: Componentes moleculares das células. São Paulo. SP. Editora Edgard Blucher LTDA. ISBN 8521200285, 2004.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. Princípios de Bioquímica. 2a. ed. São Paulo: Sarvier, ISBN 85-7378-026-6, 1995.

LETTINGA, G., REBAC, S., ZEEMAN, G. Challenge of psychrophilic anaerobic wastewater treatment. Trends in Biotechnology. v. 48, p. 28-30, 2001.

LI, S., LUO, S., GUO, R. Efficiency of CO₂ fixation by microalgae in a closed *raceway* pond. Bioresource Technology. In press. 2013.

LI, Q., DU, W., LIU, D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. Applied Microbiology and Biotechnology. v. 80, p. 749-756, 2008.

LIANHUA, L., DONG, L., YONGMING, S., LONGLONG, M., ZHENHONG, Y., XIAOYING, K. Effect of temperature and solid concentration on anaerobic digestion of rice straw in South China. Int. J. Hydrogen Energy. v. 35, p. 7261-7266, 2010.

LINCOLN, E. P., WILKIE, A. C., FRENCH, B. T. Cyanobacterial process for renovating dairy wastewater. Biomass & Bioenergy. v. 10, p. 63-68, 1996.

LIU, X., GAO, X., WANG, W., ZHENG, L., ZHOU, Y., SUN, Y. Pilot-scale anaerobic co-digestion of municipal biomass waste: Focusing on biogas production and GHG reduction. Renewable Energy. v. 44, p. 463-468, 2012.

LIU, Y. Q., LIU, Y., TAY, J. H. The effects of extracellular polymeric substances on the formation and stability of biogranules. Applied Microbiology and Biotechnology. v. 65, p. 143-148, 2004.

LIU, Y., TAY, J.-H. State of the art biogranulation technology for wastewater treatment. Biotechnology Advances. v. 22, p. 533-563, 2004.

LOURENÇO, S. O. Cultivo de Microalgas Marinhas – Princípios e Aplicações – São Carlos: RiMa, 2006.

MACEDO, R. V. T., ALEGRE, R. M. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina máxima* em dois níveis de temperatura – Parte II: Produção de lipídios. Ciência e Tecnologia de Alimentos. v. 21, p. 1-9, 2001.

MAHMOUD, N., ZEEMAN, G., GIJZEN, H., LETTINGA, G. Solids removal in upflow anaerobic reactors, a review. Bioresource Technology. v. 90, p. 1-9, 2003.

MANDAL, S., MALLICK, N. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. Applied Microbiology and Biotechnology. v. 84 (2), p. 281-291, 2009.

MARGARITES, A. C. F. Seleção e cultivo de microalgas para produção de bioetanol. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos – FURG, Rio Grande, 2010.

MARKOU, G., GEORGAKAKIS, D. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy*. v. 88, p. 3389-3401, 2011.

MATA, T. M., MELO, A. C., SIMÕES, M., CAETANO, N. S. Parametric study of a brewery effluente treatment by microalgae *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*. v. 107, p. 151-158, 2012.

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

MENDIOLA, J. A., MARTÍNEZ, D. G., RUPÉREZ, F. J., ÁLVAREZ, P. J. M., REGLERO, G., CIFUENTES, A., BARBAS, C., IBAÑES, E., SEÑORÁNS, F. J. Enrichment of vitamin E from *Spirulina platensis* microalga by SFE. *Journal of Supercritical Fluids*. v. 43, p. 484-489, 2008.

METZGER, P.; LARGEAU, C. *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 66, p. 486-496, 2005.

MEZZOMO, N., SAGGIORATO, A. G., SIEBERT, R., TATSCH, P. O., LAGO, M. C., HEMKEMEIER, M., COSTA, J. A. V., BERTOLIN, T. E., COLLA, L. M. Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 30 (1), p. 173-178, 2010.

McKEOWN, R., HUGHES, D., COLLINS, G., MAHONY, T., O'FLAHERTY, V. Low-temperature anaerobic digestion for wastewater treatment. *Environmental Biotechnology*. v. 23, p. 444-451, 2012.

MILLER, A. G., COLMAN, B. Evidence for HCO_3^- transport by the blue-green alga (Cyanobacterium) *Coccochloris peniocyctis*. *Plant Physiology*. v. 65 (2), p. 397-402, 1980.

MOHANTY, P., SRIVASTAVA, M., KRISHNA, K. B. The photosynthetic apparatus of *Spirulina*: electron transport and energy transfer. In: Vonshak, A. *Spirulina platensis*

(*Arthrospira*). Physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis, ISBN 0-7484-0674-3, 1997.

MOLINA, E. G., FERNADEZ, F. G. A., CAMACHO, F. G., SEVILLA, J. M. F. Fotobiorreactores. In: Biotecnologia Algal, 1., 2004, Buenos Aires- Argentina. Biotecnologia Algal. Buenos Aires-Argentina, 2004.

MORAIS, M. G., COSTA, J. A. V., PRANKE, P. H. L., STEFFENS, D. A new biomateria of nanofibers with the microalgal *Spirulina* as scaffolds to cultivate with stem cell for use in tissue engineering. Journal of Biomedical Nanotechnology. v. 9, p. 710-718, 2013.

MORAIS, M. G., STILLINGS, C., DERSCH, R., RUDISILE, M., PRANKE, P., COSTA, J. A. V., WENDORFF, J. Preparation of nanofibers containing the microalga *Spirulina* (*Arthrospira*). Bioresource Technology. v. 101, p. 2872-2876, 2010.

MORAIS, M. G. Bioengenharia microalgal na utilização de gás de combustão e extração de biopolímeros para desenvolvimento de nanofibras. Tese de Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos – FURG, Rio Grande, 2008.

MORAIS, M. G., COSTA, J. A. V. Perfil de ácidos graxos de microalgas cultivadas com dióxido de carbono. Ciência e Agrotecnologia. v. 32 (4), p. 1245-1251, 2008a.

MORAIS, M. G., COSTA, J. A. V. Photo bioreactor tubular for removing or fixing of carbon dioxide, greenhouse gases using micro algae and cyan bactéria, involves reducing emissions of main gás responsible for global warming and other gases of greenhouse effect. Patent Number: BR200702736-A, 2008b.

MORAIS, M. G., COSTA, J. A. V. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. Journal of Biotechnology. v. 129, p. 439-445, 2007a.

MORAIS, M. G., COSTA, J. A. V. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. Energy Conversion and Management. v. 48, p. 2169-2173, 2007b.

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. Biotechnology Letters. v. 29 (9), p. 1349-1352, 2007c.

- MORAIS, M. G., MIRANDA, M. Z., COSTA, J. A. V. Biscoitos de chocolate enriquecidos com *Spirulina platensis*: Características físico-químicas, sensoriais e digestibilidade. *Alimentos e Nutrição*. v. 17, p. 323-328, 2006.
- MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.; DALCANTON, F.; REICHERT, C. C.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F. F. A novel strain of *Spirulina* from southern Brazil with potencial for cultivation. *Memóires de l' Institut Océanographique Paul Ricard*. p. 20-21, 2005.
- MU, Y., WANG, G., YU, H. Q. Response surface methodological analysis on biohydrogen production by enriched anaerobic cultures. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 38, p. 905-913, 2006.
- MURRAY, R. K., GRANNER, D. K., MAYES, P. A., RODWELL, V. W. Harper: *Bioquímica*. São Paulo. Ed. Atheneu. 9° ed. CDD – 574.192. 2002.
- MUSSGUNG, J. H., KLASSEN, V., SCHLÜTER, A., KRUSE, O. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *Journal of Biotechnology*. v. 150, p. 51-56, 2010.
- NDON, U. J., DAGUE, R. R. Effects of temperature and hydraulic retention time on anaerobic sequencing batch reactor treatment of low-strength wastewater. *Water Research*. v. 31 (10), p. 2455-2466, 1997.
- NESSLER, J. A. Colorimetric determination of ammonia by Nessler reagent, *Chemisches Zentralblatt*. v. 27, p. 529-541, 1856.
- OBULI, Z., KARTHIKEYAN, P., VISVANATHAN, C. Effect of C/N and ammonia-N accumulation in a pilot-scale thermophilic dry anaerobic digester. *Bioresource Technology*. v. 113, p. 294-302, 2012.
- OGBONDA, K. H., AMINIGO, R. E., ABU, G. O. Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina* sp. *Bioresource Technology*. v. 98, p. 2207-2211, 2007.
- OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering*. v. 20, p. 459-466, 2003.
- OLAIZOLA, M., DUERR, E. O., FREEMAN, D. W. Effect of CO₂ enhancement in an outdoor algal production system using *Tetraselmis* sp. *Journal of Applied Phycology*. v. 3, p. 363-366, 1991.
- OLGUÍN, E., GALICIA, S., ANGULO-GUERRERO, O., HERNÁNDEZ, E. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp.

(*Arthrospira*) grown on digested pig waste. *Bioresource Technology*. v. 77, p. 19-24, 2001.

OLGUÍN, E. J., GALICIA, S., CAMACHO, R., MERCADO, G., PÉREZ, T. J. Production of *Spirulina* sp. in sea water supplemented with anaerobic effluents in outdoor raceways under temperate climatic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 48 (2), p. 242-247, 1997.

OMER, A. M., FADALLA, Y. Biogas technology in Sudan. *Renewable Energy*. v. 28, p. 499-507, 2003.

ONCEL, S., SUKAN, V. F. Comparison of two different pneumatically mixed column photobioreactors for the cultivation of *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*). *Bioresource Technology*. v. 99, p. 4755-4760, 2008.

ONCEL, S. S., AKPOLAT, O. An integrated photobioreactor system for the production of *Spirulina platensis*. *Biotechnology*. v. 5 (3), p. 365-372, 2006.

ONG, H. K., GREENFIELD, P. F., PULLAMMANAPPALLIL, P. C. Effect of mixing on biomethanation of cattle-manure slurry. *Environmental Technology*. v. 23, p. 1081-1090, 2002.

ONO, E., CUELLO, J. L. Design parameters of solar concentrating systems for CO₂-mitigating algal photobioreactors. *Energy*. v. 29, p. 1651-1657, 2004.

OTA, M., KATO, Y., WATANABE, H., WATANABE, M., SMITH, R., ET AL. Fatty acid production from a highly CO₂ tolerant alga, *Chlorococcum littorale*, in the presence of inorganic carbon and nitrate. *Bioresource Technology*. v. 100, p. 5237-5242, 2009.

PARMAR, A., SINGH, N. K., PANDEY, A., GNANSOUNOU, E., MADAMWAR, D. Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. *Bioresource Technology*. v. 102, p. 10163-10172, 2011.

PATIL, G., CHETHANA, S., MADHUSUDHAN, M. C., RAGHAVARAO, K. S. M. S. Fractionation and purification of the phycobiliproteins from *Spirulina platensis*. *Bioresource Technology*. v. 99, p. 7353-7396, 2008.

PARK, J., JIN, H. F., LIM, B. R., PARK, K. Y., LEE, K. Ammonia removal from anaerobic digestion effluent of livestock waste using green alga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*. v. 101, p. 8649-8657, 2010.

PENNINGTON, K., FUERST, R. Biochemical and morphological effects of various gases on rabbit erythrocytes. *Archives of Environmental & Occupational Health*. v. 22, p. 476-481, 1971.

PERRY, R. H., GREEN, D. W. *Perry's Chemical Engineers' Handbook*. Seventh edition. McGraw-Hill, 1997.

PLAZA, M., HERRERO, M., CIFUENTES, A., IBAÑES, E. Innovative natural functional ingredients from microalgae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 57, p. 7159-7170, 2009.

PIRES, J. C. M., ALVIM-FERRAZ, M. C. M., MARTINS, F. G., SIMÕES, M. Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: Engineering aspects and biorefinery concept. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. v. 16, p. 3043-3053, 2012.

PIORRECK, M., BAASCH, K. H., POHL, P. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry*. v. 23 (2), p. 207-216, 1984.

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

QUINTELLA, C. M., TEIXEIRA, L. S. G., KORN, MG. A., COSTA NETO, P. R., TORRES, E. A., CASTRO, M. P., JESUS, C. A. C. Cadeia do biodiesel da bancada à indústria: uma visão geral com prospecção de tarefas e oportunidades para P&D&I. *Química Nova*. v. 32, p. 793-808, 2009.

RADMANN, E. M., CAMERINI, F. V., SANTOS, T. D., COSTA, J. A. V. Isolation and application of SO_x and NO_x resistant microalgae in biofixation of CO₂ from thermoelectricity plants. *Energy Conversion and Management*. v. 52, p. 3132-3136, 2011.

RADMANN, E. M. Cultivo de microalgas para produção de biossurfactantes. Tese de Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos – FURG, Rio Grande, 2011.

RADMANN, E. M., COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. *Química Nova*. v. 31 (7), p. 1609-1612, 2008.

RADMANN, E. M., REINEHR, C. O., COSTA, J. A. V. Optimization of the repeated batch cultivation of microalga *Spirulina platensis* in open *raceway* ponds. *Aquaculture*. v. 265, p. 118-126, 2007.

- RAFIQUL, I. M., JALAL, K. C. A., ALAM, M. Z. Environmental factors for optimization of *Spirulina* biomass in laboratory culture. *Biotechnology*. v. 4 (1), p. 19-22, 2005.
- RAMANAN, R., KANNAN, K., DESHKAR, A., YADAV, R., CHAKRABARTI, T. Enhanced algal CO₂ sequestration through calcite deposition by *Chlorella* sp. and *Spirulina platensis* in a mini-raceway pond. *Bioresource Technology*. v. 101, p. 2616-2622, 2010.
- RANI, R. U., KUMAR, S. A., KALIAPPAN, S., YEOM, I.-T., BANU, J. R. Low temperature thermo-chemical pretreatment of dairy waste activated sludge for anaerobic digestion process. *Bioresource Technology*. v. 103, p. 415-424, 2012.
- RAS, M., LARDON, L., SIALVE, B., BERNET, N., STEYER, J. Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*. v. 102, p. 200-206, 2011.
- RASHID, N., LEE, K., MAHMOOD, Q. Bio-hydrogen production by *Chlorella vulgaris* under diverse photoperiods. *Bioresource Technology*. v. 102, p. 2101-2104, 2011.
- RAZAVIARANI, V., BUCHANAN, I. D., MALIK, S., KATALAMBULA, H. Pilot scale anaerobic co-digestion of municipal wastewater sludge with biodiesel waste glycerin. *Bioresource Technology*. v. 133, p. 206-212, 2013.
- REBOLLOSO-FUENTES, M. M., NAVARRO-PEREZ, A., GARCIA-CAMACHO, F., RAMOS-MIRAS, J. J., GUIL-GUERRERO, J. L. Biomass nutrient profiles of the microalga *Nannochloropsis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 49, p. 2966-2972, 2001.
- REICHERT, C. C., REINEHR, C. O., COSTA, J. A. V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. v. 23 (1), p. 23-28, 2006.
- REINEHR, C. O. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em modo semicontínuo. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos – FURG, Rio Grande, 2003.
- RICHMOND, A. Biological principles of mass cultivation. In: Richmond A, editor. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell. p. 125-177, 2004.
- RICHMOND, A. *Handbook of microalgal mass culture*. Boston: CRC Press, 1990.

RICHMOND, A., GROBBELAAR, J. U. Factors affecting the output rate of *Spirulina platensis* with reference to mass cultivation. *Biomass*. v. 10, p. 253-264, 1986.

RODRIGUES, J. A. D., RATUSZNEI, S. M., ZAIAT, M., FORESTI, E. New configurations and operation strategies of anaerobic biofilm bioreactors applied to wastewater treatment. *Focus on Biotechnology Research*. v. 1, p. 1-58, 2006.

RODRIGUES, J. A. D., RATUSZNEI, S. M., CAMARGO, E. F. M., ZAIAT, M. Influence of agitation rate on the performance of an anaerobic sequencing batch reactor containing granulated biomass treating low-strength wastewater. *Advances in Environmental Research*. v. 7 (3), p. 405-410, 2003.

ROSA, A. P. C. Produção de biomassa e ácidos graxos por diferentes microalgas e condições de cultivo. Tese de Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos – FURG, Rio Grande, 2012.

ROSA, A. P. C., CARVALHO, L. F., GOLDBECK, L., COSTA, J. A. V. Carbon dioxide fixation by microalgae cultivated in open bioreactors. *Energy Conversion and Management*. v. 52, p. 3071-3073, 2011.

ROSA, A. P. C. Produção da microalga *Spirulina (Arthrospira)* em cultivo semicontínuo e diferentes concentrações de nutrientes. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos – FURG, Rio Grande, 2008.

ROVIROSA, N., SÁNCHEZ, E., BENÍTEZ, F., TRAVIESO, L., PELLÓNA, A. An integrated system for agricultural wastewater treatment. *Water Science and Technology*. v. 32 (12), p. 165-171, 1995.

RUÍZ-MARÍN, A., MENDOZA-ESPINOSA, L. G., STEPHENSON, T. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology*. v. 101, p. 58-64, 2010.

RYU, H. J., OH, K. K., KIM, Y. S. Optimization of the influential factors for the improvement of CO₂ utilization efficiency and CO₂ mass transfer rate. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. v. 15, p. 471-475, 2009.

SAJILATA, M. G., SINGHAL, R. S., KAMAT, M. Y. Fractionation of lipids and purification of γ - linolenic acid (GLA) from *Spirulina platensis*. *Food Chemistry*. v. 109, p. 580-586, 2008.

SAKAI, N., SAKAMOTO, Y., KISHIMOTO, N., CHIHARA, M., KARUBE, I. *Chlorella* strains from hot springs tolerant to high temperature and high CO₂. *Energy Conversion and Management*. v. 16, p. 693-696, 1995.

SALOMONI, C., CAPUTO, A., BONOLI, M., FRANCIOSO, O., RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T., PALENZONA, D. Enhanced methane production in a two-phase anaerobic digestion plant, after CO₂ capture and addition to organic wastes. *Bioresource Technology*. v. 102, p. 6443-6448, 2011.

SANDBERG, M., AHRING, B. K. Anaerobic treatment of fish-meal process wastewater in a UASB reactor at high pH. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 36, p. 800-804, 1992.

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

SCHMIDELL, W., SOARES, H. M., ETCHEBEHERE, C., MENES, R. J., BERTOLA, N. C., CONTRERAS, E. M. Tratamento biológico de águas residuárias. Gráfica PaperPrint, Florianópolis, p. 720, 2007.

SCHMIDELL, W., LIMA, A. U., AQUARONE, E., BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial*. v.2. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001.

SCHMIDT, J. E., AHRING, B. K. Granular sludge formation UASB reactors. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 49, p. 229-246, 1996.

SCHMITZ, R., DAL MAGRO, C., COLLA, L. M. Environmental applications of microalgae. *Revista CIATEC – UPF*. v. 4 (1), p. 48-60, 2012.

SCRAGG, A. H., ILLMAN, A. M., CARDEN, A., SHALES, S. W. Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor. *Biomass & Bioenergy*. v. 23, p. 67-73, 2002.

SHIZAS, I., BAGLEY, D. M. Improving anaerobic sequencing reactor performance by modifying operational parameters. *Water Research*. v. 36, p. 363-367, 2002.

SIALVE, B., BERNET, N., BERNARD, O. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances*. v. 27, p. 409-416, 2009.

SILVA, G. P., MACK, M., CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*. v. 27, p. 30-39, 2009.

SILVA, G. S., JARDIM, W. F. Application of ammonia total maximum daily load (TMDL) to Atibaia River, Campinas/Paulínia Region – São Paulo State. *Engenharia Sanitária Ambiental*. v. 12 (2), p. 160-168, 2007.

SINGH, M., REYNOLDS, D. L., DAS, K. C. Microalgal system for treatment of effluent from poultry litter anaerobic digestion. *Bioresource Technology*. v. 102, p. 10841-10848, 2011.

SINGH, S. P., SINGH, D. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. v. 14, p. 200-216, 2010.

SIMPORE, J., ZONGO, F., KABORE, F. ET AL. Nutrition rehabilitation of HIV-infected and HIV-negative undernourished children utilizing *Spirulina*. *Annals of Nutrition and Metabolism*. v. 49 (6), p. 373-380, 2005.

SINCLAIR, A., ATTAR-BASHI, N., JAYASOORYA, A. Nutritional aspects of single cell oils: Uses and applications of arachidonic acid and docosahexaenoic acid oils. In: Cohen Z., Ratledge, C. (eds) *Single cell oils*. AOCS Press, Champaign. p. 182-201, 2005.

SOARES, H. M., ZAIAT, M. Sistemas de Tratamento. In: SCHMIDELL, W. et al. *Tratamento biológico de águas residuais*. Florianópolis: Paper Print, 2007.

SOBCZUK, T. M., CHISTI, Y. Potential fuel oils from the microalga *Choricystis minor*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. v. 85, p. 100-108, 2010.

SOLETTI, D., BINAGHI, L., FERRARI, L., LODI, A., CARVALHO, J. C. M., ZILLI, M., CONVERTI, A. Effect of carbon dioxide feeding rate and light intensity on the fed-batch pulse-feeding cultivation of *Spirulina platensis* in helical photobioreactor. *Biochemical Engineering Journal*. v. 39 (2), p. 369-375, 2008.

SOUZA, M. E. Fatores que influenciam na digestão anaeróbia. *Revista DAE*. v. 4 (137), p. 8-94, 1984.

SPEECE, R. E. *Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters*. Vanderbilt University. Published by Archae Press. United States of America, 1995.

- SPOLAORE, P., JOANNIS-CASSAN, C., DURAN, E., ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. v. 101, p. 87-96, 2006.
- SUALI, E., SARBATLY, R. Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. v. 16, p. 4316-4342, 2012.
- SYDNEY, E. B., STURM, W., CARVALHO, J. C., THOMAZ-SOCCOL, V., LARROCHE, C., PANDEY, A., SOCCOL, C. R. Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. *Bioresource Technology*. v. 101, p. 5892-5896, 2010.
- TANG, D., HAN, W., LI, P., MIAO, X., ZHONG, J. CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. *Bioresource Technology*. v. 102, p. 3071-3076, 2011.
- TERASAKA, K., HIRABAYASHI, A., NISHINO, T., FUJIOKA, S., KOBAYASHI, D. Development of microbubble aerator for waste water treatment using aerobic activated sludge. *Chemical Engineering Science*. v. 66, p. 3172-3179, 2011.
- TISDALE, S. L., NELSON, W. L., PEATON, J. D., HAVLIN, J. L. Soil fertility and fertilizers. 5^a ed., New York, 1985.
- TOKOSOGLU, O., UNAL, M. K. Biomass nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris* and *Isochrysis galbana*. *Journal of Food Science*. v. 68, n. 4, p. 1144-1148, 2003.
- TOMASELLI, L. The Microalgal Cell. In: Richmond, A. (Ed.) *Handbook of Microalgal Culture*. Oxford, UK: Blackwell Publishing. p. 3-19, 2004.
- TOMASELLI, L. Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira (Spirulina)*. In: Vonshak, A. *Spirulina platensis (Arthrospira)*. Physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis. ISBN 0-7484-0674-3, 1997.
- TOMASELLI, L., GIOVANNETTI, L., TORZILLO, G. Physiology of stress response in *Spirulina* spp. *Bulletin de Institut Océanographique Monaco*. v. 12, p. 65-75, 1993.
- TOLMASQUIM, M. T. Fontes Renováveis de Energia no Brasil. Rio de Janeiro: Interciência, p. 51, 2003.
- TRAVIESO, L., SANCHEZ, E. P., BENITEZ, F., CONDE, J. L. *Arthrospira* sp. intensive cultures for food and biogas purification. *Biotechnology Letters*. v. 15, p. 1091-1094, 1993.

- VALDERRAMA, L. T., DEL CAMPO, C. M., RODRIGUEZ, C. M., BASHAN, L. E., BASHAN, Y. Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemma minuscula*. *Water Research*. v. 36, p. 4185-4192, 2002.
- VAN HAANDEL, A. C., LETTINGA, G. Tratamento anaeróbio de esgotos. Um manual para países de clima quente. Campina Grande: Epgraf, p. 208, 1994.
- VERONEZ, R. G., ORRA, A. A., RIBEIRO, R., ZAIAT, M., RATUSZNEI, S. M., RODRIGUES, J. A. D. A simplified analysis of granule behavior in ASBR and UASB reactors treating low-strength wastewater. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. v. 22, p. 361-369, 2005.
- VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira) physiology, cell-biology and biotechnology*. London: Taylor & Francis, ISBN 0-7484-0674-3, 1997.
- VONSHAK, A., TORZILLO, G. Environmental Stress Physiology. In: Richmond, A., *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. USA: CRC Press. p. 577, 2004.
- VONSHAK, A. RICHMOND, A. Mass production of the blue-green alga *Spirulina*: An Overview *Biomass*. v. 15, p. 233-247, 1988.
- VONSHAK, A., ABELIOVICH, A., BOUSSIBA, S., ARAD, S., RICHMOND, A. Production of *Spirulina* biomass: effects of environmental factors and population density. *Biomass*. v. 2, p. 175-185, 1982.
- WANG, L., LI, Y., CHEN, P., MIN, M., CHEN, Y., ZHU, J., RUAN, R. R. Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp. *Bioresource Technology*. v. 101, p. 2623-2628, 2010.
- WANG, B., LI, Y., WU, N., LAN, C. Q. CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 79, p. 707-718, 2008.
- WANG, Q., LIU, Y., SHEN, Y., JIN, C., LU, J., ZHU, J., LI, S. Studies On Mass Cultivation Of *Anabaena* Spp. (Nitrogen-Fixing Blue-Green Algae, Cyanobacteria) On A Large Scale. *Bioresource Technology*. v. 38 (2-3), p. 221-228, 1991.
- WEN, Z. Y., CHEN, F. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology Advances*. v. 21, p. 273-294, 2003.
- WHO/FAO, WHO and FAO joint consultation: fats and oils in human nutrition. *Nutrition Reviews*. v. 53 (7), p. 202-205, 1995.

- WIJFFELS, R., BARBOSA, M. An outlook on microalgal biofuels. *Science*. v. 329 p. 796-799, 2010.
- WU, D., WANG, S., LIU, K., YU, X., HE, Y., WANG, Z. Rapid measurement of morphological features of *Spirulina* microalgae filaments using microscopy and image processing algorithms. *Biosystems Engineering*. v. 112, p. 35-41, 2012.
- XU, Q., NAKAJIMA, M., LIU, Z., SHIINA, T. Biosurfactants for microbubble preparation and application. *International Journal of Molecular Sciences*. v. 12, p. 462-475, 2011.
- XU, H., MIAO, X., WU, Q. High quality biodiesel production from a microalgae *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal Biotechnology*. v. 126, p. 499-507, 2006.
- YANG, S., LI, J., ZHENG, Z., MENG, Z. Characterization of *Spartina alterniflora* as feedstock for anaerobic digestion. *Biomass and Bioenergy*. v. 33, p. 597-602, 2009.
- YEN, H. W., BRUNE, D. E. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. *Bioresource Technology*. V. 98, p. 130-134, 2007.
- YOO, C., JUN, S.-Y., LEE, J.-Y., AHN, C.-Y., OH, H.-M. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. *Bioresource Technology*. v. 101, p. 571-574, 2010.
- YU, H. Q., FANG, H. H. P., GU, G. W. Comparative performance of mesophilic and thermophilic acidogenic upflow reactors. *Process Biochemistry*. v. 38, p. 447-454, 2002.
- ZAMALLOA, C., BOON, N., VERSTRAETE, W. Anaerobic digestibility of *Scenedesmus obliquus* and *Phaeodactylum tricornutum* under mesophilic and thermophilic conditions. *Applied Energy*. v. 92, p. 733-738, 2012.
- ZAMALLOA, C., VULSTEKE, E., ALBRECHT, J., VERSTRAETE, W. The techno-economic potential of renewable energy through the anaerobic digestion of microalgae. *Bioresource Technology*. v. 102, p. 1149-1158, 2011.
- ZARROUK, C. Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthèse de *Spirulina maxima* Geitler. 1966. Ph.D. Thesis, University of Paris.
- ZEEMAN, G., SUTTER, K., VENS, T., KOSTER, M., WELLINGER, A. Psychrophilic digestion of dairy and pig manure: startup procedure of batch, fed-batch and CSTR-type digesters. *Biological wastes*. v. 26, p. 15-31, 1988.

ZHOU, W., LI, Y., MIN, M., HU, B., CHEN, P., RUAN, R. Local bioprospecting for high-lipid producing microalgal strains to be grown on concentrated municipal wastewater for biofuel production. *Bioresource Technology*. v. 102, p. 6909-6919, 2011.

ANEXOS

FOTOS DOS ENSAIOS

Figura A1 Reator anaeróbio de 310 L utilizado nos Ensaio 1 e 2.



Figura A2 "Sample bag" utilizado para coleta do gás e envio à análise cromatográfica.



Figura A3 Cultivo da microalga *Spirulina* sp. LEB-18 em meio Zarrouk modificado com efluente da produção de biogás.



Figura A4 Cultivo da microalga *Spirulina* sp. LEB-18 em meio Zarrouk modificado com adição diária de NaHCO_3 .



Figura A5 Cultivo da microalga *Spirulina* sp. LEB-18 em meio Zarrouk modificado com CO_2 sintético.



Figura A6 Cultivo da microalga *Spirulina* sp. LEB-18 em meio Zarrouk modificado com biogás sintético.

Meio Zarrouk (Zarrouk, 1966).

Tabela A1 Composição do Meio Zarrouk.

Reagentes	Quantidade (g.L ⁻¹)
NaHCO ₃	16,8
K ₂ HPO ₄	0,50
NaNO ₃	2,50
K ₂ SO ₄	1,00
NaCl	1,00
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,20
CaCl ₂	0,04
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,01
EDTA	0,08
Solução A5	1 mL
Solução B6	1 mL

Fonte: ZARROUK (1966).

Solução A5: (g.L⁻¹): H₃BO₃: 2,86; MnCl₂. 4H₂O: 1,81; ZnSO₄. 7H₂O: 0,222; CuCO₄.5H₂O:0,079; MnO₃: 0,015.

Solução B6: (mg.L⁻¹): NH₄VO₃: 22,86; KCr(SO₄)₂. 12 H₂O: 192; NiSO₄. 6H₂O: 44,8; Na₂WO₄. 2H₂O: 17,94; TiOSO₄. 8H₂O: 61,1; CO(NO₃)₂. 6H₂O: 43,98.

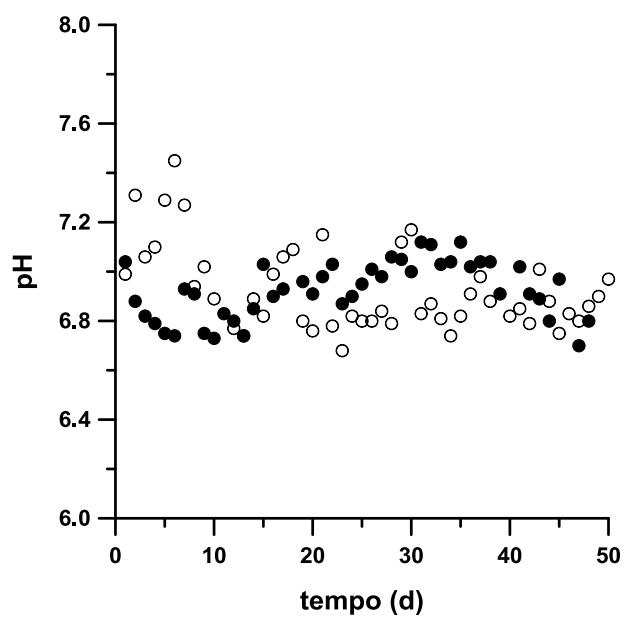
Resultados de acompanhamento dos ensaios

Figura A7 pH no Ensaio 1: 26-38 °C (●) e Ensaio 2: 12-21 °C (○).

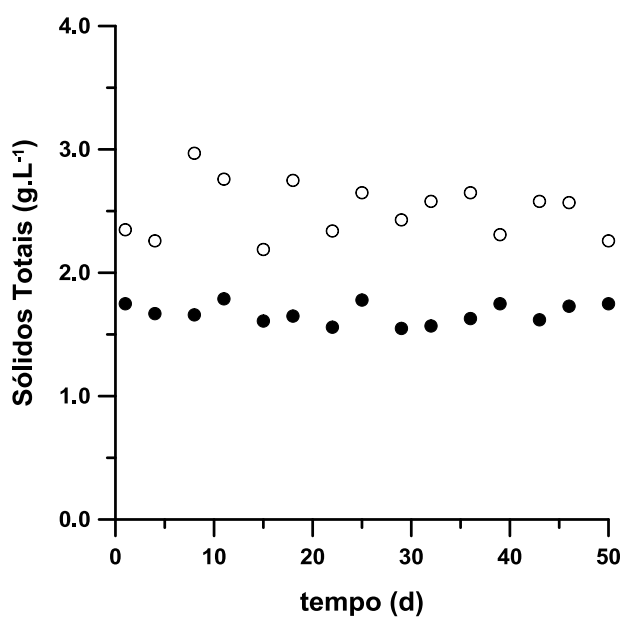


Figura A8 Sólidos Totais no Ensaio 1: 26-38 °C (●) e Ensaio 2: 12-21 °C (○).

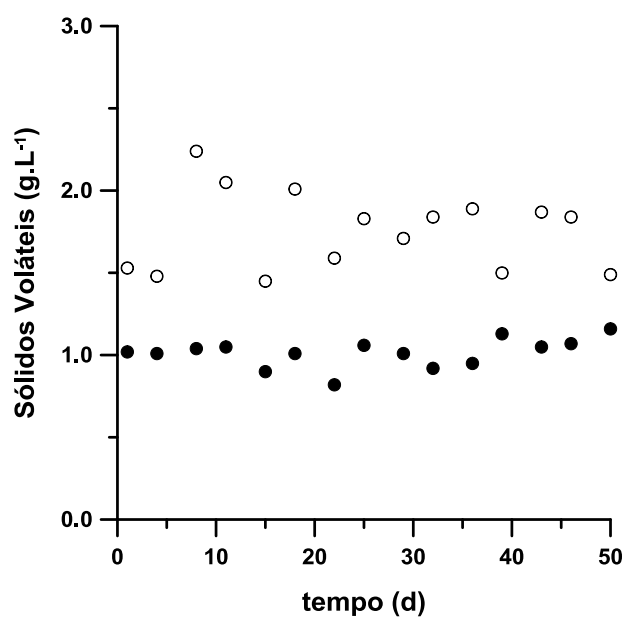


Figura A9 Sólidos Voláteis no Ensaio 1: 26-38 °C (●) e Ensaio 2: 12-21 °C (○).

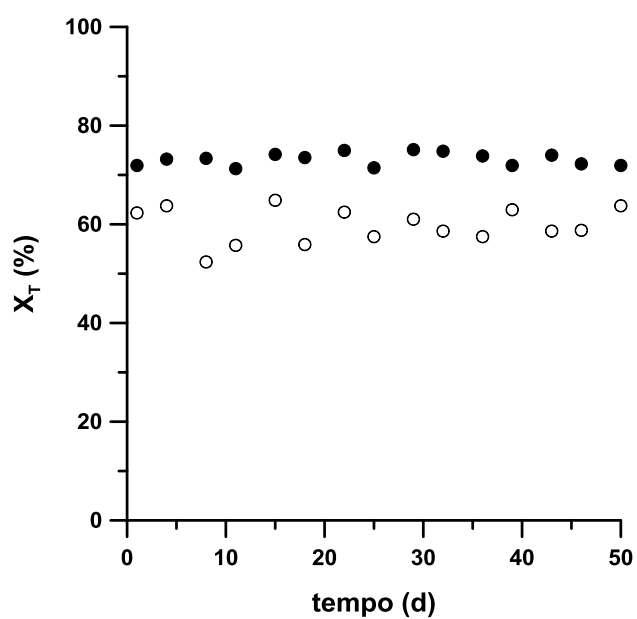


Figura A10 Decomposição da biomassa (X_T) de *Spirulina* sp. LEB-18 no Ensaio 1: 26-38 °C (●) e Ensaio 2: 12-21 °C (○).

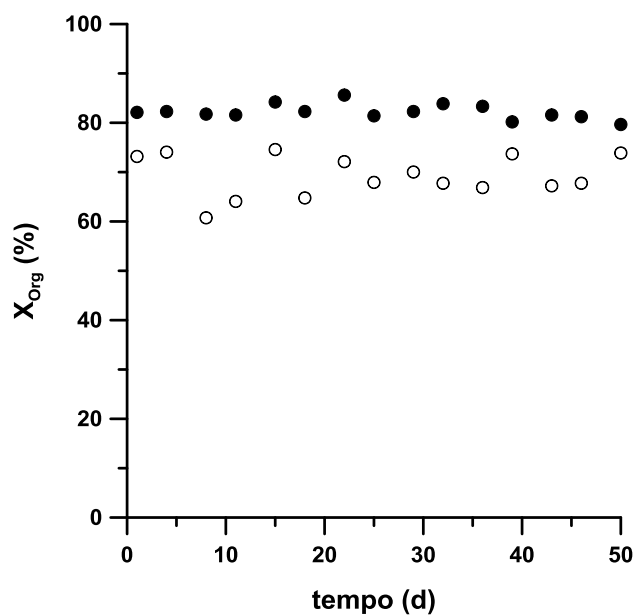


Figura A11 Decomposição da fração orgânica (X_{Org}) da biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18 no Ensaio 1: 26-38 °C (●) e Ensaio 2: 12-21 °C (○).

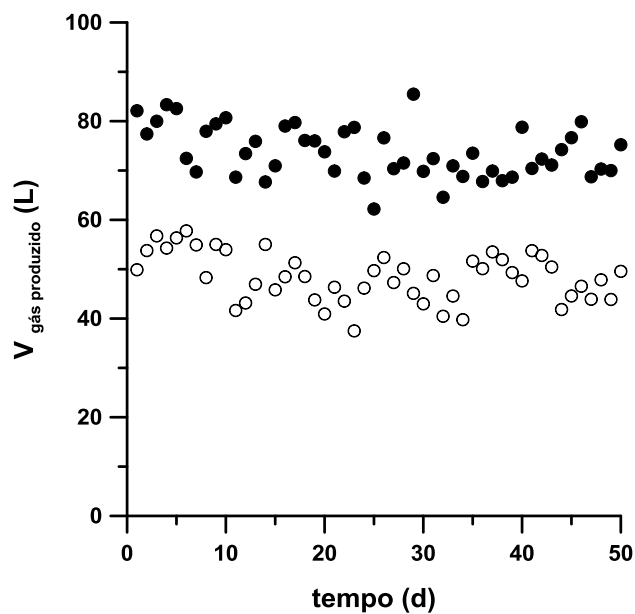


Figura A12 Produção de biogás ($V_{gás produzido}$) no Ensaio 1: 26-38 °C (●) e Ensaio 2: 12-21 °C (○).

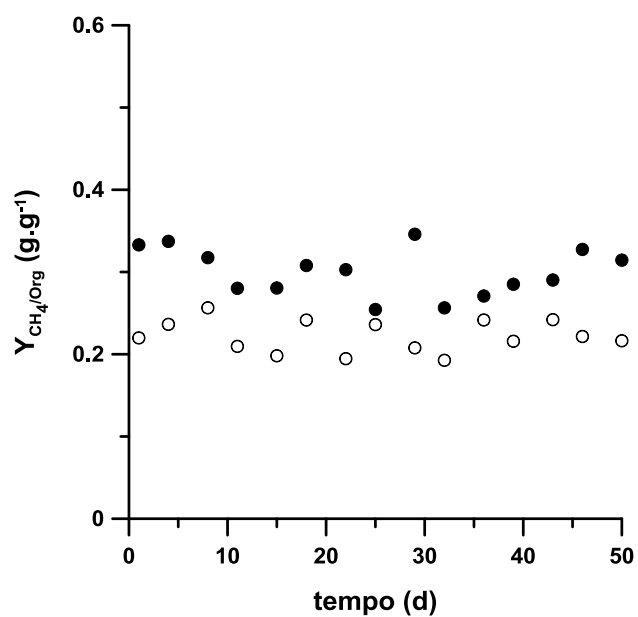


Figura A13 Conversão da fração orgânica da biomassa em biogás ($Y_{CH_4/Org}$) no Ensaio 1: 26-38 °C (●) e Ensaio 2: 12-21 °C (○).

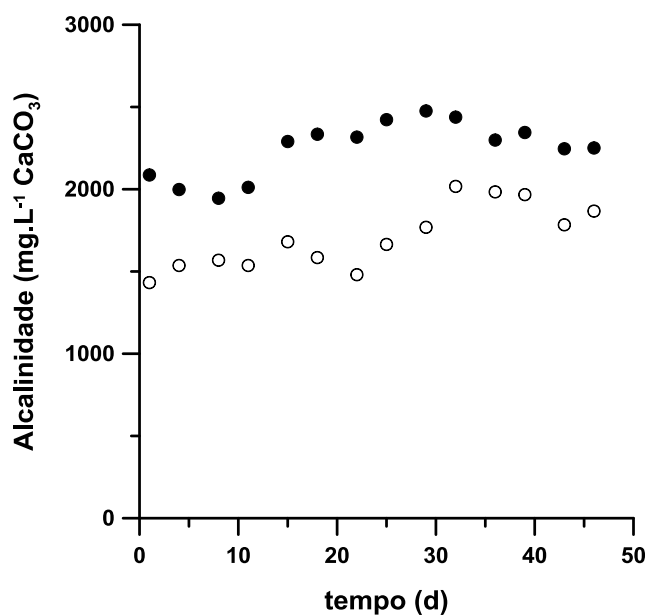


Figura A14 Alcalinidade no Ensaio 1: 26-38 °C (●) e Ensaio 2: 12-21 °C (○).

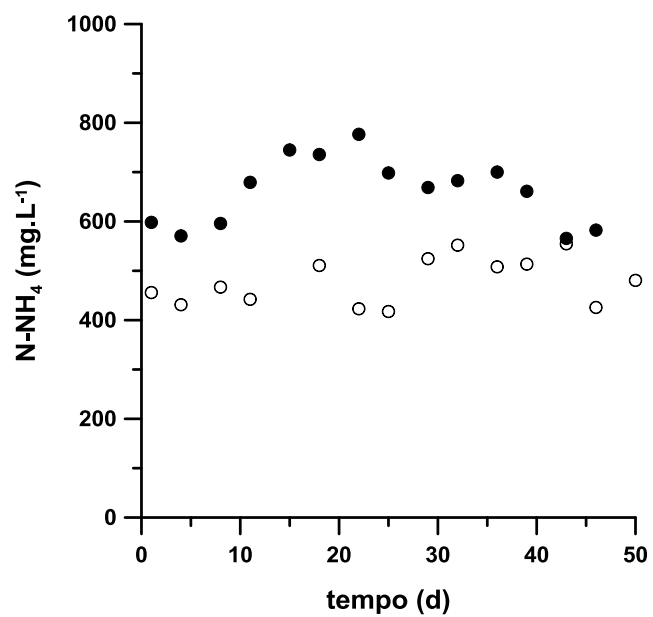


Figura A15 Nitrogênio amoniacal (N-NH₄) no Ensaio 1: 26-38 °C (●) e Ensaio 2: 12-21 °C (○).

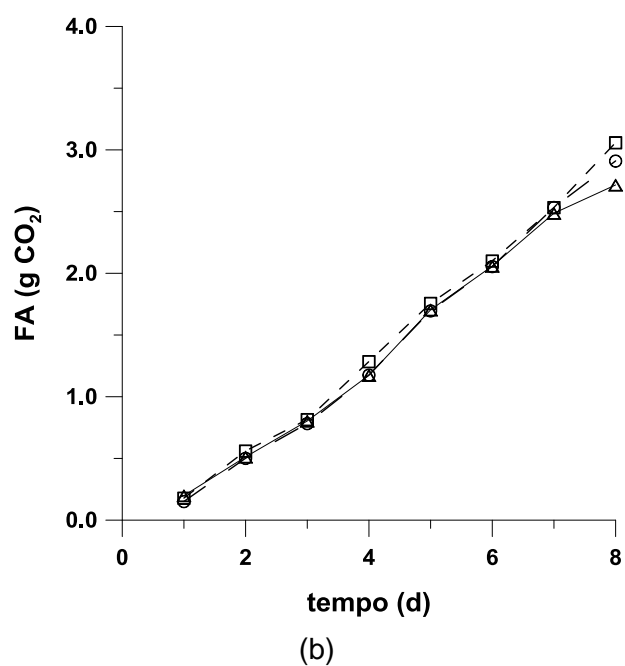
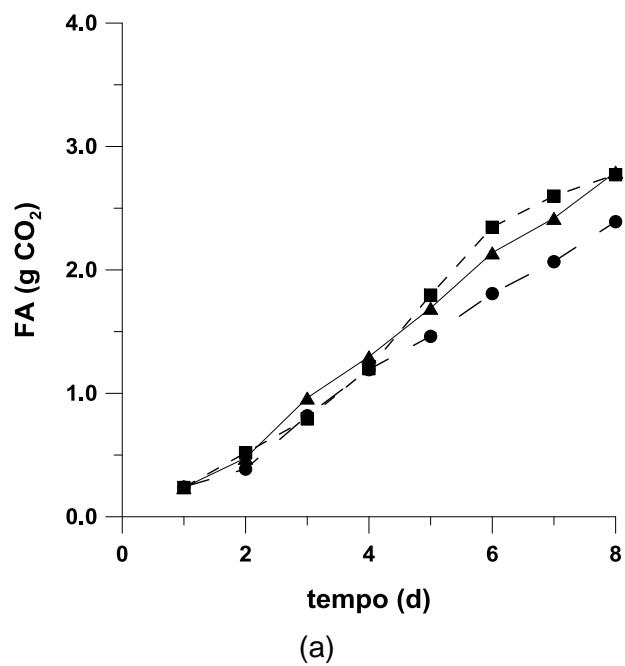
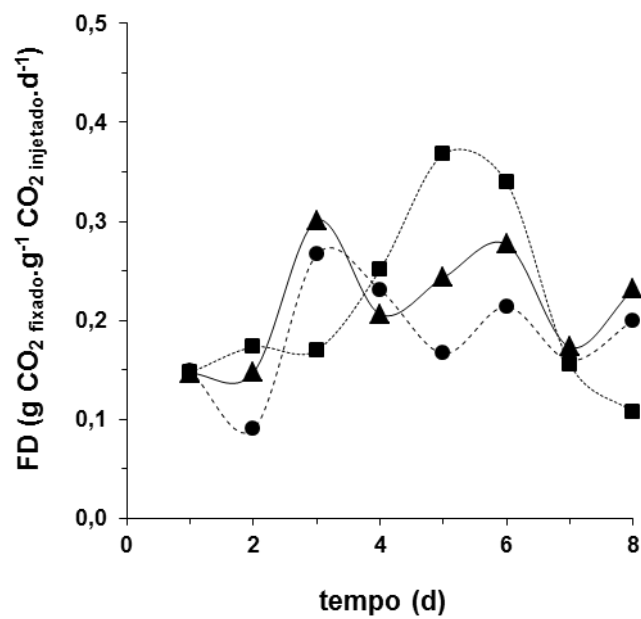
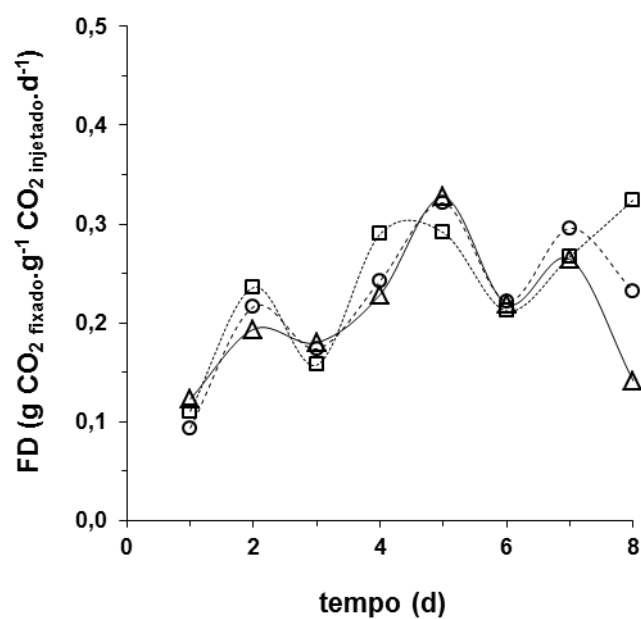


Figura A16 Acúmulo de CO_2 fixado (FA) em cada FBRT pela microalga *Spirulina* sp. LEB-18 nos FBRTs em série: (a) E2: FBRT1 (●) FBRT2 (■) FBRT3 (▲) e (b) E3: FBRT1 (○) FBRT2 (□) FBRT3 (△).



(a)



(b)

Figura A17 Fixação diária de CO₂ (FD) em cada FBRT pela microalga *Spirulina* sp. LEB-18 nos FBRTs em série: (a) E2: FBRT1(●) FBRT2 (■) FBRT3 (▲) e (b) E3: FBRT1 (○) FBRT2 (□) FBRT3 (Δ).

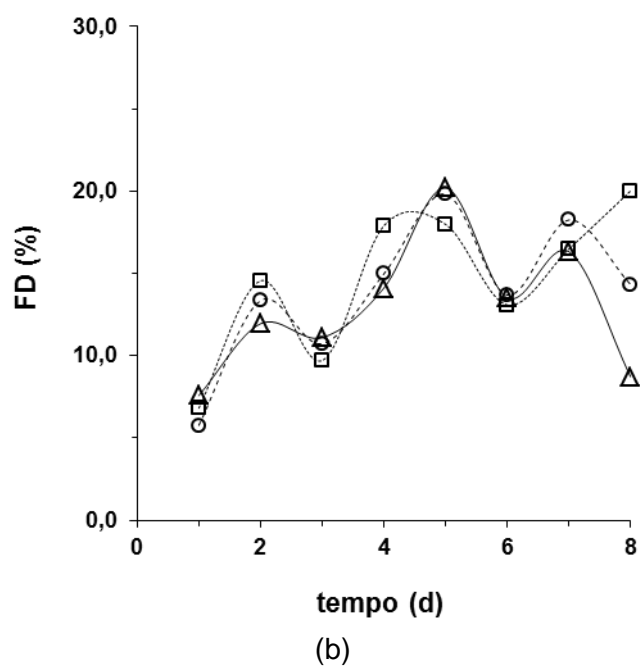
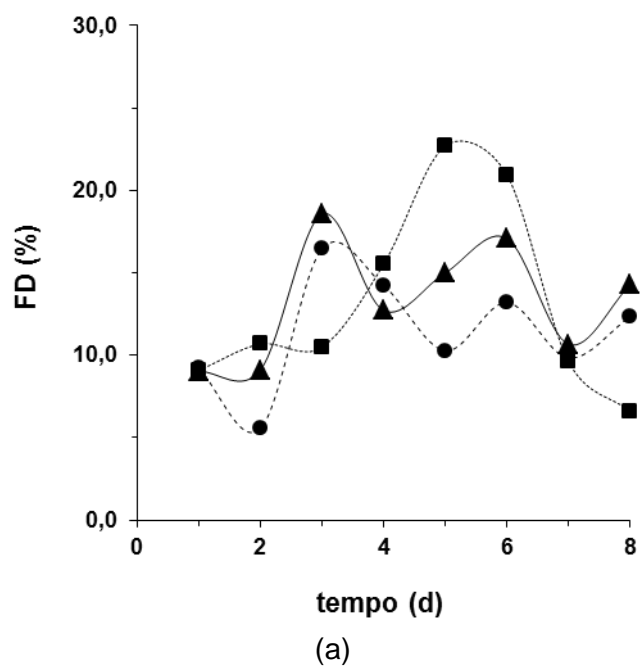


Figura A18 Fixação diária de CO₂ (FD) em cada FBRT pela microalga *Spirulina* sp. LEB-18 nos FBRTs em série: (a) E2: FBRT1(●) FBRT2 (■) FBRT3 (▲) e (b) E3: FBRT1 (○) FBRT2 (□) FBRT3 (Δ).

**ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA BRAZILIAN JOURNAL OF CHEMICAL
ENGINEERING**