

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

ESCOLA DE ENGENHARIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Recuperação e Purificação de Biomassa das Microalgas de
Chlorella sp. e *Dunaliella tertiolecta* Utilizando
Microfiltração Tangencial**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Alexandre Antônio Bento Carvalho

Porto Alegre

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

ESCOLA DE ENGENHARIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Recuperação e Purificação de Biomassa das Microalgas de
Chlorella sp. e *Dunaliella tertiolecta* Utilizando
Microfiltração Tangencial**

Alexandre Antônio Bento Carvalho

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Área de concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de Processos.

Orientadores:

Prof^a. Dr^a. Isabel Cristina Tessaro

Prof. Dr. Nilson Romeu Marcílio

Co-orientadora:

Prof^a. Dr^a. Rosane Rech

Porto Alegre

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

ESCOLA DE ENGENHARIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação Recuperação e Purificação de Biomassas de *Chlorella* sp. e *Dunaliella tertiolecta* Utilizando Microfiltração Tangencial elaborada por Alexandre Antônio Bento Carvalho, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Comissão Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Elizangela Gonçalves de Oliveira – UNIPAMPA

Prof^a. Dr^a. Liliane Damaris Pollo – UFRGS

Prof^a. Dr^a. Débora Jung Luvizetto Faccin – UFRGS

Prof. Dr. Evandro Steffani - UFRGS

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus familiares e amigos pelo apoio incondicional à realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (PPGEQ) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de fazer parte do curso de mestrado e desenvolver este trabalho.

À CAPES e à Rede Carvão, pelo apoio financeiro para operacionalizar este trabalho.

Aos meus orientadores, Prof. Nilson Romeu Marcilio, Prof^a. Rosane Rech e Prof^a Isabel Cristina Tessaro, pelos ensinamentos, dedicação e paciência. Estendo o profundo agradecimento aos membros da banca examinadora.

Aos professores do ICTA-UFRGS, por permitirem a utilização da estrutura dos seus laboratórios: Prof. Plinho Hertz e Prof. Marco Antônio Záchia Ayub.

À equipe do Laboratório de Bioengenharia ICTA-UFRGS, que ajudou na realização do presente trabalho.

RESUMO

Microalgas são microrganismos fotossintéticos, capazes de sintetizar uma ampla gama de produtos dependendo de sua rota metabólica. A produção de microalgas envolve as etapas de cultivo, recuperação da biomassa e obtenção dos produtos intracelulares, sendo a etapa de recuperação de biomassa um gargalo da produção. No presente estudo foi avaliado a concentração e purificação de biomassa de duas espécies de microalgas, *Chlorella* sp. e *Dunaliella tertiolecta*, através da microfiltração tangencial, nos seguintes modos de operação: reciclo total, batelada e batelada combinada com diafiltração. Também foi avaliada a disponibilidade de reuso do permeado como meio de cultivo para as microalgas. No modo de reciclo total foram testadas quatro pressões transmembranas (PTM) para *Chlorella* sp. e cinco pressões transmembranas para *D. tertiolecta* em duas velocidades tangenciais para determinação das melhores condições operacionais para as etapas posteriores de concentração e purificação, considerando o efeito dessas condições de operação sobre a integridade celular. A velocidade selecionada foi $0,6 \text{ m s}^{-1}$ para o processamento das duas suspensões de microalgas e a PTM de 0,5 bar para *Chlorella* sp. e de 0,15 bar para *D. tertiolecta*. As análises de microscopia ótica, microscopia eletrônica de transmissão e na câmara Neubauer não demonstraram um efeito significativo do sistema de MF sobre a estrutura celular de *Chlorella* sp., entretanto, para *D. tertiolecta*, as análises mostraram a necessidade de operar o sistema em PTM de 0,15 bar. Foi observado um baixo percentual médio de *fouling*, sendo de 16 % para *Chlorella* sp. e 6 % para *D. tertiolecta* para as duas velocidades tangenciais testadas. A resistência da membrana foi elevada quando comparada com a resistência devido ao *fouling* de ambas as suspensões de microalgas. Em modo batelada, observou-se em todos os experimentos, a completa retenção das células de microalgas pela membrana de microfiltração. O fator de concentração volumétrico médio foi de 2,6 para a suspensão de *Chlorella* sp. e 2,5 para a de *D. tertiolecta*. Na operação do sistema em modo diafiltração foi possível reduzir o teor salino em 42 % para o concentrado da *Chlorella* sp. e 38 % para o concentrado de *D. tertiolecta*. O modelo de Hermia modificado por Field foi utilizado em software EMSO para a determinação dos mecanismos de *fouling*, e concluiu-se que a formação de torta foi o mecanismo de *fouling* dominante em filtração de *Chlorella* sp.. Para *D. tertiolecta*, todos os mecanismos se ajustaram bem aos dados experimentais, indicando que os mesmos ocorreram simultaneamente. Foram propostos dois tipos de meio de cultura para o reuso da corrente de permeado: o permeado simples e o permeado enriquecido com a adição de micronutrientes. Foi possível verificar a utilização do permeado como meio de cultivo, principalmente para o cultivo de *D. tertiolecta*; o permeado com adição de micronutrientes apresentou maior capacidade de crescimento que o meio padrão para esta microalga. No cultivo da *Chlorella* sp., a concentração de biomassa alcançada utilizando o permeado simples e enriquecido foi inferior a concentração de biomassa em meio de cultivo padrão. Os resultados obtidos neste trabalho comprovaram que o processo de microfiltração apresenta-se como uma alternativa promissora na etapa de concentração e purificação de suspensões de microalgas; além disso, a corrente de permeado gerada pode ser utilizada como meio de cultivo, garantindo, desta forma, um menor consumo de água e nutrientes, melhorando a viabilidade econômica do processo.

Palavras-Chave: Microfiltração, *Chlorella* sp., *Dunaliella tertiolecta*, biomassa, diafiltração, modelo de Hermia.

ABSTRACT

Microalgae are photosynthetic organisms with simple structures and capable to synthesize a wide range of products depending on their metabolic route. The production of microalgae comprises the steps of cultivation, biomass recovery and extraction of intracellular products, being the stage of biomass recovery a production bottleneck. In the present study was evaluated the concentration and purification of biomass of two species of microalgae, *Chlorella* sp. and *Dunaliella tertiolecta*, by crossflow microfiltration, in the following modes of operation: total recycling, batch and batch combined with diafiltration. It was also assessed the availability of the reuse the permeate as medium for microalgae cultivation. In total recycling mode were tested four different transmembrane pressures (*TMP*) for *Chlorella* sp. and five transmembrane pressures for *D. tertiolecta* in two crossflow velocities to determine the proper operating conditions for the stages of concentration and purification, considering the effect of operating conditions on the cellular integrity. The selected crossflow velocity was 0.6 m s^{-1} for processing the two suspensions of microalgae and *TMP* of 0.5 bar for *Chlorella* sp. and 0.15 bar for *D. tertiolecta*. The analyses of optical microscopy, transmission electron microscopy and the Neubauer chamber demonstrated no significant effect of the operating conditions of the MF system on the cellular structure of *Chlorella* sp., however, for *D. tertiolecta*, the analysis showed the need to operate the system at lower *TMP* of 0.15 bar. The average percentage of *fouling* observed was 16 % for *Chlorella* sp. and 6 % for *D. tertiolecta* for both crossflow velocities tested. The resistance of the membrane was elevated when compared with the resistance due to *fouling* for both suspensions of microalgae. In batch mode, it was observed, for all the experiments, complete retention of microalgal cells by microfiltration membrane. The average volumetric concentration factor was 2.6 for the suspension of *Chlorella* sp. and 2.5 for *D. tertiolecta*. In the operation of the system in diafiltration mode was possible to reduce the salt content in 42 % for the *Chlorella* sp. and 38 % for *D. tertiolecta*. The model of Hermia model was used in software EMSO for the determination of *fouling* mechanisms, and it is concluded that the cake formation was the dominant *fouling* in the filtration of *Chlorella* sp.. For *D. tertiolecta*, all the mechanisms adjusted well to the experimental data, demonstrating that all mechanisms occurred simultaneously. Were proposed two different culture mediums for the reuse of the permeate stream: the plain permeate and the permeate enriched with micronutrients. It was possible to verify the ability of the permeate as cultivation medium, mainly for the *D. tertiolecta*; in this case, the permeate enriched with micronutrients presented greater capacity for growth when compared with the standard medium. On the other hand, for the cultivation of *Chlorella* sp., the biomass concentration achieved using both, the plain permeate and the enriched one was less than that achieved using the standard medium. The results obtained in this work proved that the microfiltration process is a promising alternative for the concentration and purification of suspensions of microalgae. In addition, the permeate stream generated could be used as a growth medium, ensuring thereby a less consumption of water and nutrients, improving the economic viability of the process.

Key words: Microfiltration, *Chlorella* sp., *Dunaliella tertiolecta*, biomass, diafiltration, Hermia model.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiii
1 INTRODUÇÃO	17
2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 MICROALGAS.....	20
2.1.1 Metabolismo das microalgas	22
2.1.2 Microalga <i>Chlorella</i> sp.....	23
2.1.3 Microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i>	24
2.2 SISTEMAS DE CULTIVO.....	25
2.3 PROCESSOS DE RECUPERAÇÃO DE BIOMASSA.....	28
2.3.1 Centrifugação	29
2.3.2 Floculação	30
2.3.3 Autofloculação.....	31
2.3.4 Sedimentação.....	31
2.3.5 Flotação.....	32
2.4 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS.....	33
2.4.1 Microfiltração	36
2.4.2 Parâmetros operacionais do processo de MF.....	38
2.4.3 Polarização por concentração e <i>fouling</i>	41
2.4.4 Resistências ao fluxo permeado.....	44
2.4.5 Modos de operação	45
2.4.6 Modelo de Hermia	49
2.5 RECICLO DO MEIO DE CULTIVO.....	52
2.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
3.1 MICROALGAS E MEIO DE CULTIVO.....	55
3.2 MEMBRANA DE MICROFILTRAÇÃO	56
3.3 DESCRIÇÃO DO SISTEMA DE FILTRAÇÃO	56
3.4 METODOLOGIA EXPERIMENTAL	58
3.4.1 Preparação do pré-inóculo.....	58

3.4.2	Cultivos das microalgas nos fotobiorreatores	59
3.4.3	Ensaio de compactação da membrana de MF	60
3.4.4	Determinação de permeância hidráulica da membrana de MF	61
3.4.5	Determinação de parâmetros operacionais do processo de MF para as suspensões de <i>Chlorella</i> sp. e <i>D. tertiolecta</i>	61
3.4.6	Determinação de percentual de <i>fouling</i>	62
3.4.7	Estimação de parâmetros do Modelo de Hermia modificado por Field quanto aos mecanismos de <i>fouling</i>	62
3.4.8	Experimento de MF para concentração – modo batelada.....	63
3.4.9	Experimento de MF para a purificação de biomassa - modo batelada combinado com modo diafiltração.....	64
3.4.10	Avaliação de reuso do permeado da MF como meio de cultivo	64
3.5	ANÁLISES	65
3.5.1	Microscopia ótica.....	65
3.5.2	Câmara Neubauer	66
3.5.3	Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	67
3.5.4	Análise de condutividade elétrica	67
3.5.5	Análise de pH	68
3.5.6	Determinação da viscosidade cinemática	68
3.6	ANÁLISE DE EPS	68
3.6.1	Determinação de Proteína total – método de Lowry	68
3.6.2	Determinação de Carboidratos – método de Dubois.....	69
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	69
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
4.1	RESULTADOS DO CULTIVO DAS MICROALGAS	70
4.2	RESULTADOS DE COMPACTAÇÃO E PERMEÂNCIA HIDRÁULICA PARA A MEMBRANA DE MF	71
4.3	DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS OPERACIONAIS	72
4.3.1	Taxa de cisalhamento e velocidade tangencial	72
4.3.2	Pressão transmembrana (<i>PTM</i>).....	73
4.3.3	Integridade celular	77
4.4	CONCENTRAÇÃO - EXPERIMENTOS EM MODO BATELADA	83
4.5	PURIFICAÇÃO DA BIOMASSA – EXPERIMENTOS EM MODO BATELADA COMBINADO COM MODO DIAFILTRAÇÃO	87
4.6	ANÁLISE DO <i>FOULING</i>	92
4.6.1	Percentual de <i>fouling</i>	93
4.6.2	Resistência ao fluxo devido ao <i>fouling</i>	95

4.6.3	Caracterização dos mecanismos de <i>fouling</i> através do modelo de Hermia modificado por Field	97
4.7	AVALIAÇÃO DO PERMEADO COMO MEIO DE CULTIVO.....	103
5	CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	106
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Esquema simplificado da fotossíntese da microalga no metabolismo autotrófico. Fonte: Adaptado de <i>Sustainable Green Technologies Inc. – Algae FAQ</i>	22
Figura 2.2 - Diferenças principais entre os metabolismos das microalgas. Fonte: Adaptado de Mariano, (2010).	23
Figura 2.3 – Fotografia da microalga <i>Chlorella</i> sp.. Fonte: Próprio autor.	24
Figura 2.4 – Fotografia da microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> . Reproduzido de Portal Brasil. (http://www.brasil.gov.br/imagens/revista-digital/edicao-3/dunaliella-1/view).	25
Figura 2.5 - Representação esquemática da taxa de crescimento das microalgas (linha sólida) e a concentração de nutrientes (linha pontilhada). Fonte: Adaptado de Mata, Martins e Caetano, (2009).	26
Figura 2.6 - Representação esquemática da seção transversal dos diferentes tipos de morfologias das membranas sintéticas. Fonte: Adaptado de Habert, Borges e Nobrega, (2006).	34
Figura 2.7 - Diferentes configurações de escoamento do processo de microfiltração: (a) tangencial ou cruzado (<i>crossflow</i>), (b) perpendicular ou transversal (<i>dead-end</i>).	37
Figura 2.8 - Representação esquemática de três fases do declínio do fluxo permeado: (I) declínio inicial rápido; (II) declínio do fluxo permeado gradualmente a longo prazo e (III) fluxo independente do tempo. Fonte: Adaptado de Song, (1998).	43
Figura 2.9 - Ilustração do modo reciclo total: (1) tanque de alimentação; (2) bomba de deslocamento positivo; (3) módulo com a membrana; (4) corrente de permeado e (5) corrente de retido; (V1 e V2) válvulas agulha; (P1 e P2) manômetros.	46
Figura 2.10 - Ilustração do modo batelada: (1) tanque de alimentação; (2) bomba de deslocamento positivo; (3) módulo com a membrana; (4) corrente de permeado; (5) tanque para o permeado e (6) corrente de concentrado; (V1 e V2) válvulas agulha; (P1 e P2) manômetros.	47
Figura 2.11 - Ilustração do modo diafiltração: (1) tanque de alimentação; (2) bomba de deslocamento positivo; (3) módulo com a membrana; (4) corrente de permeado; (5) tanque para o permeado e (6) corrente de concentrado; (V1 e V2) válvulas agulha; (P1 e P2) manômetros.	48
Figura 2.12 – Ilustração dos mecanismos de <i>fouling</i> interpretados no modelo de Hermia. (a) bloqueio completo ($n = 2,0$); (b) bloqueio intermediário ($n = 1,0$); (c) bloqueio padrão/interno ($n = 1,5$) (d) bloqueio por formação de torta ($n = 0$). Fonte: Adaptado de Vela <i>et al.</i> , (2008).	51
Figura 3.1 – Fluxograma simplificado do sistema de bancada, onde: tanque de alimentação (1); bomba diafragma (2); módulo plano (3); corrente de permeado (4); recipiente para coleta de permeado (5); corrente de concentrado (6); corrente de recirculação (7) e banho termostático (8). V1-V2 válvulas agulha, P1-P2 manômetros.	57
Figura 3.2 – Imagem do esquema do sistema de bancada, onde: tanque de alimentação (1); bomba diafragma (2); módulo plano (3); corrente de permeado (4); recipiente para coleta de permeado (5); corrente de concentrado (6); corrente de recirculação (7) e banho termostático (8). V1-V2 válvulas agulha, P1-P2 manômetros.	57
Figura 3.3 - Fotografia detalhada do sistema de recirculação: bomba diafragma (2); corrente de recirculação (7) e válvula agulha (V1).	58

Figura 3.4 - Fotografia dos frascos com os pré-inóculos contendo as microalgas dentro da estufa rotatória.	59
Figura 3.5 - Fotografia dos fotobiorreatores em <i>start-up</i>	60
Figura 3.6 - Fotografia da câmara Neubauer.	66
Figura 3.7 - Rede de quadrantes cravado na câmara Neubauer.	67
Figura 4.1 – Curvas cinéticas de <i>Chlorella</i> sp. (A) e <i>D. tertiolecta</i> (B). Condições de operação: meio de cultivo modificado Guillard “f1/2”, intensidade luminosa de 17,5 klx e temperatura de 28 ± 1 °C.	71
Figura 4.2 – Fluxo permeado em função da pressão transmembrana para duas velocidades de escoamento da corrente de alimentação ($0,6 \text{ m s}^{-1}$ e $0,8 \text{ m s}^{-1}$) para as suspensões de microalgas: (A) <i>Chlorella</i> sp. e (B) <i>D. tertiolecta</i>	75
Figura 4.3 – Número de células não viáveis de <i>Chlorella</i> sp. (A) taxa de cisalhamento de $4\ 800 \text{ s}^{-1}$ (B) taxa de cisalhamento de $6\ 400 \text{ s}^{-1}$	77
Figura 4.4 – Número de células não viáveis de <i>D. tertiolecta</i> : (A) taxa de cisalhamento de $4\ 800 \text{ s}^{-1}$ (B) taxa de cisalhamento de $6\ 400 \text{ s}^{-1}$	78
Figura 4.5 - Fotografia da estrutura de <i>Chlorella</i> sp. (a) antes da passagem pelo sistema de filtração (b) após experimento na taxa de cisalhamento de $4\ 800 \text{ s}^{-1}$ e (c) após experimento na taxa de cisalhamento de $6\ 400 \text{ s}^{-1}$	79
Figura 4.6 - Fotografia da estrutura de <i>D.tertiolecta</i> . (a) antes da passagem pelo sistema de filtração. Em taxa de cisalhamento de $4\ 800 \text{ s}^{-1}$: (b) Após <i>PTM</i> de 0,15 bar e (c) Após <i>PTM</i> de 1,0 bar. Em taxa de cisalhamento de $6\ 400 \text{ s}^{-1}$: (d) Após <i>PTM</i> de 0,15 bar e (e) Após <i>PTM</i> de 1,0 bar.	80
Figura 4.7 – Estrutura celular da <i>Chlorella</i> sp. antes dos experimentos de microfiltração, magnificação de (a) 20 000× (b) 10 000×.	81
Figura 4.8 - Estrutura celular da <i>Chlorella</i> sp. após os experimentos de microfiltração, magnificação de (a) 20 000× (b) 7 500× (c) 5 000×.	82
Figura 4.9 - Estrutura celular da <i>D. tertiolecta</i> (magnificação de 15 000×) antes dos experimentos de microfiltração.	83
Figura 4.10 – Resultados do fluxo permeado em função do tempo de experimento. Condições de operação: modo batelada, velocidade tangencial de $0,6 \text{ m s}^{-1}$, temperatura de 27 ± 1 °C, concentração de biomassa igual a $0,9 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$ e valor de pH igual a 7,0 (A) <i>Chlorella</i> sp., pressão de 0,5 bar e (B) <i>D. tertiolecta</i> , pressão de 0,15 bar.	84
Figura 4.11 - Fluxo de permeado em função do tempo para os experimentos de concentração e purificação da biomassa de <i>Chlorella</i> sp. Condições de operação: concentração inicial de biomassa de $0,9 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$, o pH igual a 7,0, a temperatura de 27 ± 1 °C e a velocidade de escoamento igual a $0,6 \text{ m s}^{-1}$, a <i>PTM</i> de 0,5 bar (A) primeiro experimento, (B) segundo experimento e (C) terceiro experimento.	88
Figura 4.12 – Fluxo de permeado em função do tempo para os experimentos de concentração e purificação da biomassa de <i>D. tertiolecta</i> . Condições de operação: concentração inicial de biomassa de $0,9 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$, o pH igual a 7,0, a temperatura de 27 ± 1 °C e a velocidade de escoamento igual a $0,6 \text{ m s}^{-1}$, a <i>PTM</i> de 0,15 bar (A) primeiro experimento, (B) segundo experimento e (C) terceiro experimento.	90
Figura 4.13 - Concentração salina inicial e após as duas etapas de diafiltração para a suspensão de <i>Chlorella</i> sp.	91
Figura 4.14 - Concentração salina inicial e após as duas etapas de diafiltração para a suspensão de <i>D. tertiolecta</i>	92
Figura 4.15 - Fluxo de água destilada em função da pressão antes e após os experimentos com a suspensão de <i>Chlorella</i> sp. (A) velocidade de $0,6 \text{ m s}^{-1}$; (B) velocidade de $0,8 \text{ m s}^{-1}$	93

Figura 4.16 - Fluxo de água destilada <i>versus</i> pressão antes e após os experimentos com a suspensão de <i>D. tertiolecta</i> . (A) velocidade de 0,6 m s ⁻¹ e (B) velocidade de 0,8 m s ⁻¹	94
Figura 4.17 - Fluxo experimental e fluxo estimado em função do tempo para a suspensão de <i>Chlorella</i> sp. para cada mecanismo de fouling avaliado (A) primeiro experimento (B) segundo experimento (C) terceiro experimento.	100
Figura 4.18 - Fluxo experimental e fluxo estimado em função do tempo para a suspensão de <i>D. tertiolecta</i> para cada mecanismo de <i>fouling</i> avaliado (A) primeiro experimento (B) segundo experimento (C) terceiro experimento.	102
Figura 4.19 – Curva cinética para os cultivos de <i>Chlorella</i> sp. (A) e <i>D. tertiolecta</i> (B) em diferentes meios: padrão, permeado simples e permeado com micronutrientes.	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Fontes de macro e micronutrientes presentes no meio de cultivo para o crescimento de microalgas.....	21
Tabela 2.2 - Classificação das algas e número aproximado de espécies conhecidas.	21
Tabela 2.3 – PSM que utilizam a diferença de pressão através da membrana como força motriz relacionados pelo tamanho de poros das membranas e respectivas pressões de operação.....	35
Tabela 4.1 - Características hidrodinâmicas do escoamento das suspensões de microalgas: viscosidade cinemática, velocidade tangencial, diâmetro hidráulico, nº de Reynolds e taxa de cisalhamento.	73
Tabela 4.2 – Resultados da análise de carboidratos totais, proteínas totais e condutividade elétrica do permeado de <i>Chlorella</i> sp. e de <i>D. tertiolecta</i>	87
Tabela 4.3 – Valores de fluxo permeado inicial e final para cada etapa de concentração e purificação da suspensão de <i>Chlorella</i> sp. e o percentual médio de redução do fluxo para os três experimentos.....	89
Tabela 4.4 – Valores de fluxo permeado inicial e final para cada etapa de concentração e purificação da suspensão de <i>D. tertiolecta</i> e o percentual médio de redução do fluxo para os três experimentos.....	91
Tabela 4.5 – Valores de permeância hidráulica antes e após os experimentos com as suspensões de microalgas e o percentual de <i>fouling</i>	95
Tabela 4.6 – Resistência ao <i>fouling</i> sobre diferentes velocidades de operação para as suspensões de microalgas.	96
Tabela 4.7 - Valores estimados e parâmetros estatísticos do modelo de Hermia-Field para os experimentos de concentração da suspensão de <i>Chlorella</i> sp.....	98
Tabela 4.8 - Valores estimados e parâmetros estatísticos do modelo de Hermia-Field para os experimentos de concentração da suspensão de <i>D. tertiolecta</i>	101

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ΔP	Diferença de pressão (bar)
ΔX	Diferença de potencial
A	Área da membrana (m ²)
C_o	Concentração da solução de alimentação (g L ⁻¹)
C_p	Concentração da espécie no permeado (g L ⁻¹)
DWP_a	Permeância hidráulica após o experimento (L m ⁻² h ⁻¹ bar ⁻¹)
DWP_b	Permeância hidráulica antes do experimento (L m ⁻² h ⁻¹ bar ⁻¹)
EPS	Substâncias poliméricas extracelulares
l	Espessura da membrana (m)
e	Espessura do canal (m)
R_{obs}	Coefficiente de retenção observada
R_T	Resistência total (m ⁻¹)
R_M	Resistência da membrana (m ⁻¹)
R_F	Resistência devido ao <i>fouling</i> (m ⁻¹)
R^2	Parâmetro estatístico Coeficiente de determinação
Re	Número de Reynolds
DF	Diafiltração
MF	Microfiltração
UF	Ultrafiltração
NF	Nanofiltração
OI	Osmose inversa

OD	Osmose direta
J	Fluxo permeado ($L m^{-2} h^{-1}$)
J_0	Fluxo permeado em $t = 0$ ($L m^{-2} h^{-1}$)
J^*	Fluxo permeado estimado do estado estacionário ($L m^{-2} h^{-1}$)
J_{EF}	Último ponto de fluxo permeado medido ($L m^{-2} h^{-1}$)
PSM	Processo de separação por membranas
PVDF	Poli (fluoreto de vinilideno)
PTM	Pressão transmembrana (bar)
MMC	Massa molar de corte (kDa)
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
FCV	Fator de concentração volumétrico
L_p	Permeância hidráulica ($L m^{-2} h^{-1} bar^{-1}$)
V	Volume (L ou mL)
V_0	Volume inicial da solução (mL)
V_P	Volume de permeado (mL)
V_R	Volume retido (mL)
T	Temperatura ($^{\circ}C$)
t	Tempo de permeação (s, min ou h)
k	Constante do modelo de Hermia (Equação 2.12 e Equação 2.13)
n	Constante do modelo de Hermia (Equação 2.12 e Equação 2.13)
RMSE	Parâmetro estatístico Raiz do erro médio quadrático
SQ	Parâmetro estatístico Soma quadrática
d_h	Diâmetro hidráulico (m)

SIMBOLOGIA GREGA

v Velocidade tangencial de alimentação (m s^{-1})

$\dot{\gamma}$ Taxa de cisalhamento (s^{-1})

μ Viscosidade dinâmica do fluido (Pa s)

ν Viscosidade cinemática ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$)

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

As microalgas marinhas são microrganismos de importância vital na natureza, devido a sua contribuição para a produção primária dos oceanos e da própria Terra. Esses microrganismos capazes de sobreviver em condições extremas de ambiente apresentam uma extensa diversificação morfológica, bioquímica e nutricional. Essas características refletem-se em um grau elevado de pesquisas sobre o desenvolvimento de processos envolvendo sua utilização.

O potencial biológico das microalgas é devido principalmente à capacidade das mesmas de sintetizar uma ampla gama de produtos, como vitaminas, proteínas, pigmentos e lipídeos. Desta forma, o seu campo de atuação é muito amplo, envolvendo desde o tratamento de efluentes, produção de biocombustíveis, indústrias de alimentos e farmacêutica, entre outros.

Uma das aplicações que tem maior atenção dos pesquisadores é a utilização de microalgas para a produção de biodiesel devido as mesmas apresentarem competitividade como matéria-prima, atraindo também a atenção do setor industrial. Entre as principais vantagens, destacam-se: o crescimento rápido, a quantidade significativa de lipídeos e ao contrário do cultivo de algumas oleaginosas, não precisa de uma grande quantidade de área para seu cultivo.

A produção das microalgas envolve as etapas de cultivo, recuperação da biomassa e obtenção de produtos intracelulares e até mesmo extracelulares. A etapa de recuperação de biomassa é um gargalo da produção, representando um alto custo para o processo. Além disso, alguns sistemas de separação comprometem a integridade celular das microalgas. Entre os possíveis métodos de concentração de biomassa citam-se a sedimentação, a centrifugação, a flotação, a floculação, a filtração convencional e os métodos de separação por membranas,

como a microfiltração (MF), a ultrafiltração (UF) e inclusive a osmose direta (OD).

Em relação à técnica de microfiltração (MF), frequentemente utilizada para separar sólidos de suspensões aquosas, pode-se afirmar que é um dos maiores mercados industriais no campo de separação por membranas, correspondendo a 40 % das vendas totais dos processos de separação na Europa e nos Estados Unidos. No ano de 2005, as membranas destinadas a filtrações líquidas arrecadaram US\$ 792 milhões, com um crescimento anual de 9,4 %. Para o ano de 2010, foi estimado um valor superior a US\$ 1,2 bilhões (ANADÃO, 2010).

A microfiltração consiste na retenção de determinados componentes da suspensão pela membrana, devido ao mecanismo de exclusão por tamanho. O método é intensamente influenciado pelas propriedades da membrana, pelas características da suspensão e pelas condições de funcionamento. Na indústria de biotecnologia, a MF é normalmente usada para a recuperação de células, separando-as do fluido extracelular que contém, por exemplo, proteínas, carboidratos, íons dissolvidos, entre outros. Um exemplo particularmente útil de MF é na indústria farmacêutica e biotecnológica, uma vez que o processo é operado em temperatura ambiente e capaz de esterilizar produtos farmacêuticos, como os antibióticos, por meio de cultura e soros (HABERT, BORGES E NOBREGA, 2006).

Neste estudo, a utilização da MF apresenta-se como uma alternativa promissora devido as vantagens inerentes a esta técnica, uma vez que a concentração é realizada de forma seletiva, além de apresentar baixo custo energético, não necessitar de adição de compostos químicos, possuir modelo de escoamento e condições operacionais que, quando selecionadas adequadamente, respeitam a integridade das células.

O objetivo principal deste trabalho consistiu em empregar a microfiltração tangencial para a concentração e purificação de biomassa de uma microalga com parede celular e sem flagelo, a *Chlorella* sp. e a microalga dinoflagelada e sem parede celular reconhecível *Dunaliella tertiolecta*. Também foi avaliada a possibilidade de utilização do permeado obtido da recuperação da biomassa como meio de cultivo.

Os objetivos específicos deste trabalho estão listados a seguir:

- caracterizar a membrana de poli (fluoreto de vinilideno) (PVDF) quanto a compactação e permeância hidráulica;
- analisar o efeito das condições operacionais (pressão transmembrana e taxa de cisalhamento) do sistema de microfiltração sobre a integridade celular das microalgas *Chlorella* sp. e *Dunaliella tertiolecta*;

- definir a tendência ao *fouling* e a resistência ao fluxo devido ao *fouling* da *Chlorella* sp. e *Dunaliella tertiolecta* em diferentes velocidades tangenciais das suspensões;
- definir parâmetros operacionais (pressão transmembrana e velocidade tangencial) para as etapas de concentração e purificação das microalgas *Chlorella* sp. e *Dunaliella tertiolecta*;
- concentrar as suspensões de *Chlorella* sp. e *Dunaliella tertiolecta*;
- concentrar e purificar as suspensões de *Chlorella* sp. e *Dunaliella tertiolecta*;
- estudar os mecanismos de *fouling* através do modelo de Hermia modificado por Field;
- avaliar a disponibilidade do permeado do processo de microfiltração das microalgas *Chlorella* sp. e *Dunaliella tertiolecta* como meio de cultivo para ambas as microalgas.

A dissertação está dividida em cinco capítulos. Além da seção introdutória, no Capítulo 2 intitulado Fundamentos Teóricos e Revisão Bibliográfica apresenta-se uma revisão da literatura abrangendo as características das microalgas, suas formas de cultivo e os processos de recuperação de biomassa, com ênfase na microfiltração tangencial. Os fundamentos teóricos sobre a aplicação do modelo de Hermia e a reciclagem do meio de cultivo, também foram abordados neste capítulo. No Capítulo 3 intitulado Materiais e Métodos são apresentados o equipamento, o procedimento experimental, bem como as análises realizadas durante o desenvolvimento experimental do trabalho e a metodologia para a estimação de parâmetros. No Capítulo 4 intitulado Resultados e Discussões são apresentados e avaliados os resultados obtidos na determinação das condições operacionais, incluindo o efeito sobre a estrutura celular, concentração das biomassas de *Chlorella* sp. e *Dunaliella tertiolecta*, purificação das biomassas de ambas as microalgas, além dos resultados sobre os mecanismos de *fouling* através do modelo de Hermia e a utilização do permeado como meio de cultivo. E, finalmente, no Capítulo 5 intitulado Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros, são elencadas as conclusões de acordo com os resultados obtidos na parte experimental, além de algumas sugestões para trabalhos futuros.

CAPÍTULO 2

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O objetivo deste capítulo é apresentar a fundamentação teórica e a revisão bibliográfica, abordando os tópicos relevantes para este trabalho, entre os quais podem ser citados: as características e os sistemas de cultivo das microalgas, os principais métodos de recuperação de biomassa de microalgas, com destaque para a técnica de microfiltração. Por fim, será realizada uma breve discussão a respeito do reuso do meio de cultivo para o crescimento das microalgas.

2.1 MICROALGAS

As microalgas são microrganismos uni ou multicelulares e de estruturas simples, fotossintéticas pois apresentam pigmentos orgânicos capazes de converter luz em energia. As clorofilas, os carotenoides e as ficobilinas são exemplos destes pigmentos, sendo a clorofila-*a*, a principal responsável pelo sistema de absorção de luz. As clorofilas *b*, *c* e *d* são pigmentos acessórios da fotossíntese, sendo que a maioria das algas possui alguma delas (LOURENÇO, 2006).

As microalgas marinhas são produtoras primárias e apresentam um importante papel em ecossistemas marinhos (FENG *et al.*, 2005). Apresentam-se tanto na forma de procariontes quanto de eucariontes (KHAN *et al.*, 2009; MATA, MARTINS E CAETANO, 2009) sendo exemplos de microrganismos procarióticos as cianobactérias (Cyanophyceae) e de microalgas eucarióticas as algas verdes (Chlorophyceae) (WANG, B. *et al.*, 2008).

As algas são parte importante em qualquer cadeia alimentar aquática devido a sua capacidade de fixar dióxido de carbono (CO₂), utilizando-o como fonte de carbono. Em vista disso, as microalgas apresentam-se como uma alternativa para a mitigação do dióxido de

carbono através da reação de fotossíntese.

Conforme Tortora, Funke e Case (2012), a maioria das algas é encontrada nos oceanos, embora algumas possam ser encontradas na terra ou em árvores quando há suficiente umidade disponível.

O crescimento fotossintético das microalgas ocorre com o fornecimento de luz, água, calor, dióxido de carbono e sais inorgânicos. A água é necessária para o suporte físico, para a reprodução e para difusão dos nutrientes (TORTORA, FUNKE E CASE, 2012). O meio de cultivo é responsável pelo suprimento dos elementos inorgânicos que constituem as células, como nitrogênio, fósforo, ferro e em alguns casos, silício (CHISTI, 2007). Na Tabela 2.1 estão apresentadas as principais fontes de macro e micronutrientes, suas funções para as células e faixas de concentração adotadas na maioria dos processos.

Tabela 2.1 - Fontes de macro e micronutrientes presentes no meio de cultivo para o crescimento de microalgas.

Fonte de Nutrição	Principais Compostos	Função	Faixa de Concentração
Fonte de Carbono (macro)	CO ₂ , HCO ₃ ⁻ , CO ₃ ⁻	Fornecer C para toda a célula	1,0 – 10 g L ⁻¹
Fonte de Nitrogênio (macro)	NO ₃ ⁻ , Uréia, N ₂	Fornecer N para toda a célula	10 – 2 000 mg L ⁻¹
Fósforo	Hidrofosfato, fosfato	Fornecer P para todas as reações nas células	10 – 500 mg L ⁻¹
Enxofre	Sulfato	Fornecer S para proteínas e reações	1,0 – 200 mg L ⁻¹
Sais inorgânicos	K, Ca, Na, Mg	Manter a estrutura e a atividade celular	0,1 – 100 mg L ⁻¹
Elementos-traço	Fe, Zn, Mn, Pb, Cd	Atuar como fator coenzima	0,01 – 10 mg L ⁻¹
Vitaminas	B, C e E.	Ajudar na divisão celular	0,01 – 1 000 µg L ⁻¹

Fonte: Adaptado de Zeng *et al.*, (2011).

As microalgas podem ser classificadas de acordo com a pigmentação, ciclo de vida e estrutura celular básica e conforme Khan *et al.*, (2009), podem ser divididas em quatro grupos, conforme dados apresentados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Classificação das algas e número aproximado de espécies conhecidas.

Algas	Número de espécies conhecidas (aproximadamente)
Diatomáceas (Bacillariophyceae)	10 ⁵
Algas verdes (Chlorophyceae)	8 × 10 ³
Algas azuis-verdes (Cyanophyceae)	2 × 10 ³
Algas douradas (Chrysophyceae)	10 ³

Fonte: Adaptado de Khan *et al.*, (2009).

As microalgas possuem uma composição rica em minerais, vitaminas, lipídeos, pigmentos e proteínas, apresentando, assim, grande aplicabilidade industrial nos setores cosmético (SPOLAORE *et al.*, 2006), farmacêutico, como exemplos, os antioxidantes e antibióticos (WICAKSANA *et al.*, 2012), de biocombustíveis através do óleo obtido de sua biomassa (GAVRILESCU E CHISTI, 2005) e de alimentos (KHAN *et al.*, 2009). Também apresenta grande potencial em tratamento de efluentes por utilizarem nitrogênio e fósforo como nutrientes, impedindo que o acúmulo destes seja nocivo ao meio ambiente.

As microalgas também desempenham um papel crucial na aquicultura, melhoram o valor nutricional de produtos alimentares e rações para animais. Com relação à produção de biodiesel através de microalgas, o desafio encontra-se em alavancar os valores de concentração obtidos no cultivo e no investimento em técnicas de recuperação de biomassa, etapa necessária antes da extração dos lipídeos (RÍOS *et al.*, 2012).

2.1.1 Metabolismo das microalgas

Quanto ao metabolismo, as microalgas podem apresentar três conformações principais: autotrófico, mixotrófico e heterotrófico. Em metabolismo autotrófico a energia é obtida através da absorção de energia luminosa e consumo de carbono inorgânico (CO_2). A Figura 2.1 representa o mecanismo utilizado pelas microalgas nesse metabolismo.

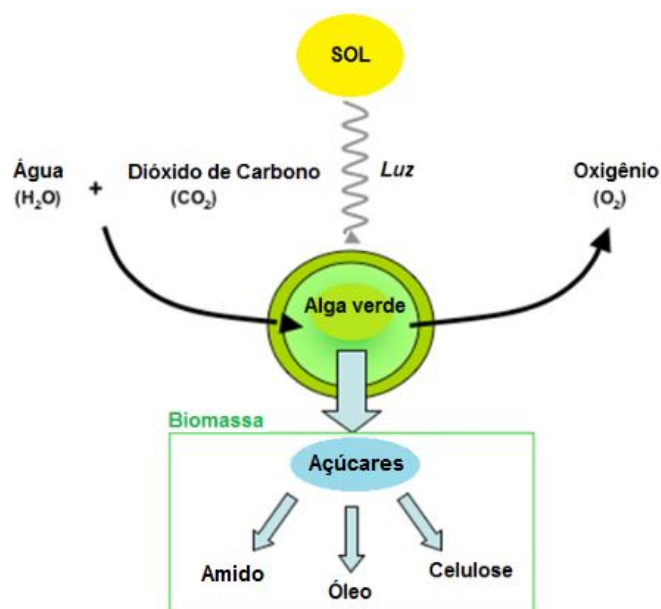


Figura 2.1 - Esquema simplificado da fotossíntese da microalga no metabolismo autotrófico.
Fonte: Adaptado de *Sustainable Green Technologies Inc. – Algae FAQ*.

O metabolismo mixotrófico é caracterizado quando a energia é obtida tanto do consumo do carbono inorgânico (CO_2) quanto do carbono orgânico com a presença de luz e calor. O metabolismo heterotrófico é aquele em que a microalga utiliza componentes orgânicos como fonte de energia e não necessita de energia luminosa. A Figura 2.2 mostra, de uma forma simplificada, as principais diferenças entre os metabolismos que podem ser realizados pelas microalgas.

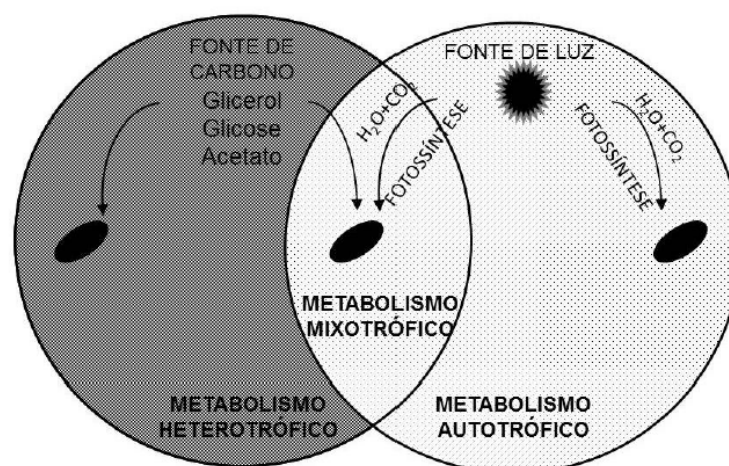


Figura 2.2 - Diferenças principais entre os metabolismos das microalgas.
Fonte: Adaptado de Mariano, (2010).

Existem outros tipos e subtipos de metabolismos, como por exemplo, o fotoautotrófico, onde o microrganismo requer íons inorgânicos minerais, e o fotoautotrófico obrigatório, no qual o microrganismo não consegue crescer no escuro. Os organismos fotoheterotróficos utilizam luz como fonte de energia e compostos orgânicos como nutrientes. Quando a microalga requer pequenas quantidades de componentes orgânicos essenciais, como vitaminas e aminoácidos, são chamadas de auxotróficas. Esses microrganismos são capazes de mudar de metabolismo como resposta a mudanças nas condições ambientais (MATA, MARTINS E CAETANO, 2009).

2.1.2 Microalga *Chlorella* sp.

A microalga *Chlorella* sp. é uma alga verde, unicelular, de geometria esférica, globular ou elipsoidal, não móvel (não possui flagelos), com tamanho de células variando entre 2,0 μm e 10 μm . A Figura 2.3 apresenta uma imagem da *Chlorella* sp..

Esta microalga apresenta como característica a alta tolerância ao dióxido de carbono (SUNG *et al.*, 1999), facilidade de cultivo em laboratório (MATA, MARTINS E CAETANO, 2009), rápido crescimento, alto conteúdo de óleo, ácidos graxos com cadeia de 16 e 18 carbonos

são predominantes, sendo portanto, ideais para a produção de biodiesel (XU, MIAO E WU, 2006; CHEIRSILP E TORPEE, 2012). Além disso, a microalga *Chlorella* sp. apresenta boa adaptação às condições de cultivo (WIDJAJA, CHIEN E JU, 2009; ZHANG *et al.*, 2010) e cresce tanto em metabolismo autotrófico, quanto heterotrófico e mixotrófico (XU, MIAO E WU, 2006), além de estar consolidada comercialmente como suplemento alimentar e produzida por mais de setenta companhias.

A *Chlorella* foi a primeira microalga a ser cultivada em grande escala em 1960 pela empresa japonesa Nihon Chlorella. Na década de 80, já existiam aproximadamente 26 fábricas de grande escala na Ásia, produzindo mensalmente cerca de 1 000 kg de biomassa (SPOLAORE *et al.*, 2006).

Esta microalga é uma importante fonte de ácido eicosapentanoico (FENG *et al.*, 2005) e apresenta um histórico de benefícios à saúde. Segundo Barrow e Sahidi (2007), a ingestão de extrato da *Chlorella* sp. possibilita o aumento da concentração de hemoglobina e diminuição do nível de açúcar no sangue. Os autores também mencionam que nos anos de 1942 e 1946 uma “sopa” de plâncton consistindo principalmente de *Chlorella* sp.. foi usada como auxílio alimentar para os pacientes com hanseníase, proporcionando aumento de energia, peso e saúde nestes pacientes.

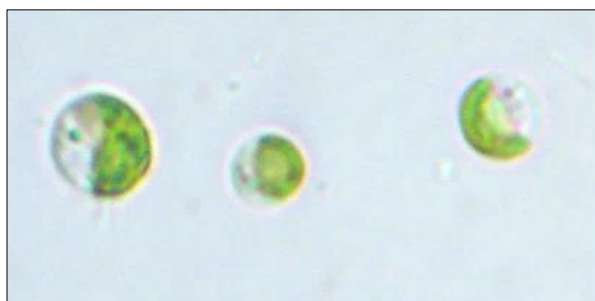


Figura 2.3 – Fotografia da microalga *Chlorella* sp..
Fonte: Próprio autor.

2.1.3 Microalga *Dunaliella tertiolecta*

A microalga *Dunaliella tertiolecta* é uma alga verde, dinoflagelada, da divisão Chlorofita, fitoplanctônica de ampla distribuição no ambiente marinho de geometria elipsoidal e tamanho de célula variando entre 6,0 μm e 14 μm (TANG *et al.*, 2011). Demonstra alta habilidade de sobrevivência em um elevado estresse osmótico, devido principalmente ao acúmulo de glicerol intracelular (GOYAL, 2007).

A *D. tertiolecta* não apresenta parede celular (OUKARROUM *et al.*, 2012 ; LOSEVA *et al.*, 2007) e as células se encolhem ou incham como resposta ao aumento ou decréscimo de concentração salina no meio externo (FISHER *et al.*, 1996). Além disso, foi relatada mudança na composição de lípideo intracelular de microalgas deste gênero como resposta a mudança de salinidade do meio de cultivo (TAKAGI, KARSENKO E YOSHIDA, 2006). A Figura 2.4 apresenta uma imagem da *D. tertiolecta*.

A *D. tertiolecta* tem como características ser um microrganismo de fácil cultivo, absorvendo nutrientes inorgânicos de águas residuais e águas salobras, apresenta alta tolerância ao sal (FABREGAS *et al.*, 1986), à temperatura e à luz, além de apresentar significativa taxa de crescimento e elevado conteúdo de lípideos e de carotenoides (TANG *et al.*, 2011).

Horiuchi *et al.*, (2003) apontaram que o cultivo com o gênero *Dunaliella* é vantajoso para a produção de óleo quando realizado em um meio não estéril sob condições de alta salinidade. Além disso, esta microalga é capaz de fixar o dióxido de carbono. Conforme Jin e Melis (2003), algumas cepas do gênero *Dunaliella* são cultivadas comercialmente em grandes sistemas abertos e em conjunto com 30 mil espécies. Países como Austrália, Índia e Israel realizam a produção comercialmente.



Figura 2.4 – Fotografia da microalga *Dunaliella tertiolecta*. Reproduzido de Portal Brasil. (<http://www.brasil.gov.br/imagens/revista-digital/educacao-3/dunaliella-1/view>)

2.2 SISTEMAS DE CULTIVO

O cultivo de microalgas é realizado tanto em sistemas abertos quanto fechados. Os sistemas abertos são amplamente utilizados, existindo diversas formas, tamanhos e materiais utilizados, com diferentes tipos de agitação e inclinação (REDAELLI, 2012) sendo, geralmente, sistemas a céu aberto com luz natural para a iluminação.

Conforme Terry e Raymond (1985) apud Molina Grima *et al.*, (2003), sistemas fechados como os fotobiorreatores podem ser localizados a céu aberto ou em locais fechados, e em geral apresentam as seguintes configurações: coluna de bolhas anelar e tubular, placa e *airlift*. O fotobiorreator *airlift* utiliza o bombeamento de ar para promover agitação e mistura, possuindo uma divisória interna para direcionar o fluxo da cultura.

Os fotobiorreatores tendem a ser mais caros que os sistemas abertos, contudo, o sistema permite um melhor controle dos parâmetros de cultivo (pH, temperatura, intensidade luminosa, concentração e quantidade de nutrientes) (HARUN *et al.*, 2010) garantindo biomassa de melhor qualidade (LOURENÇO, 2006), além de evitar a perda de dióxido de carbono por evaporação. Esse tipo de sistema também permite que o cultivo seja realizado com apenas uma espécie de microalga, garantindo um cultivo de duração mais longa (KHAN *et al.*, 2009).

Atualmente, amplas pesquisas são focadas em projeto de fotobiorreatores e suas condições de operação. São reconhecidos quatro tipos básicos de produção de células: batelada, semi-contínuo, contínuo e massivo (LOURENÇO, 2006).

O modo batelada é caracterizado pelas modificações intensas na composição do meio de cultura ao longo do desenvolvimento do cultivo. Neste tipo de cultivo, as células são inoculadas em meio de cultura fresco e nenhum outro componente é adicionado ao longo do desenvolvimento do cultivo. É válido ressaltar que amostras podem ser retiradas em determinados momentos, mas o volume removido não deve ser substituído por novo meio de cultura (LOURENÇO, 2006). A Figura 2.5 ilustra o comportamento da taxa de crescimento e a concentração de nutrientes, durante o cultivo das microalgas em modo batelada.

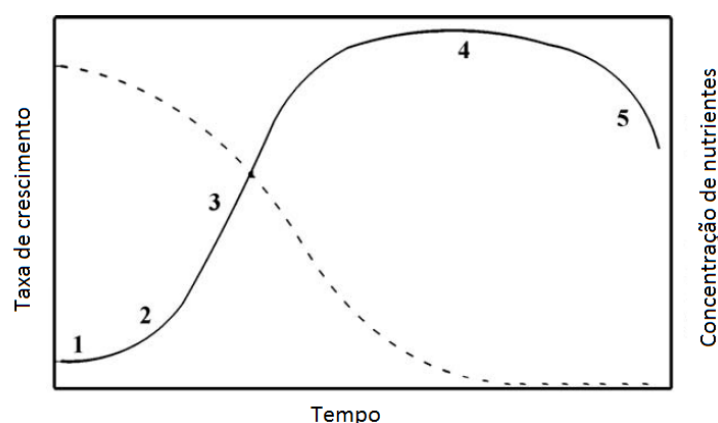


Figura 2.5 - Representação esquemática da taxa de crescimento das microalgas (linha sólida) e a concentração de nutrientes (linha pontilhada). Fonte: Adaptado de Mata, Martins e Caetano, (2009).

Conforme apresentado na Figura 2.5, existem cinco fases diferentes de crescimento: (1) fase *lag* que representa o período de adaptação das microalgas no meio de cultivo, na qual não é percebido quando a diferença entre as condições de cultivo (preexistente e nova) são discretas ou nulas; (2) fase de crescimento exponencial, onde a taxa de crescimento torna-se maior e aproximadamente constante por curto período, sendo o valor variável em função das características da espécie e das condições operacionais; (3) fase de crescimento linear, marcada pela maior redução de nutrientes no meio, podendo durar alguns dias; (4) fase estacionária, onde o cultivo atinge rendimento final máximo, expresso como o maior número possível de células por mililitro de cultivo; (5) fase de declínio ou fase de morte, evidenciada pela morte e lise de muitas células, além da presença de substâncias auto inibidoras de crescimento.

É possível observar através da Figura 2.5 que o consumo dos nutrientes dissolvidos (nitrogênio, fósforo, silício, ferro, cobalto, etc.) aumenta significativamente à medida que as microalgas elevam sua densidade celular.

Em cultivos em modo batelada ocorre a excreção de diversas substâncias que são os produtos do metabolismo das células ou até mesmo moléculas que se dissolvem no meio em função da morte e lise de parte das células cultivadas (YU *et al.*, 2012). Quando o cultivo apresenta elevada densidade celular, essas substâncias tendem a se acumular gerando problema ao desenvolvimento do cultivo (LOURENÇO, 2006).

Segundo Discart *et al.*, 2014 é inevitável a excreção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) durante o cultivo. Os EPS são definidos como uma mistura complexa de carboidratos, proteínas, polissacarídeos, DNA e lipídeos sintetizados pelas bactérias, algas e fungos (KIPPER DA SILVA, 2009). Alguns metabólitos orgânicos são naturalmente excretados pelas microalgas durante o crescimento (FOGG, 1971; HADJ-ROMDHANE *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2012) ou subitamente liberados quando ocorre a lise das células, sendo alguns destes tóxicos, como por exemplo, os ácidos graxos e as substâncias derivadas da oxidação (WU *et al.*, 2006; BOSMA *et al.*, 2008).

Conforme Lourenço (2006), em cultivos semi-contínuos uma parcela do meio de cultivo juntamente com as algas é removida e substituída por novo meio de cultura, sem a presença de células, sendo esta uma forma de elevada produção de células por intervalo de tempo. Os cultivos contínuos ocorrem com as células individuais suspensas em volume constante com permanente saída de cultura com as células de microalgas e entrada de meio no cultivo. O cultivo massivo é caracterizado por alta densidade de células e/ou grandes volumes de cultivos e tem como finalidade a produção de alimento vivo para animais marinhos e biomassa de algas para fins biotecnológicos.

2.3 PROCESSOS DE RECUPERAÇÃO DE BIOMASSA

A recuperação da biomassa de microalgas envolve a aplicação de diversas operações unitárias, tais como sedimentação, centrifugação, floculação, filtração e autofloculação. Para remover grandes quantidades de água do meio de cultura, um ou mais métodos de separação são utilizados, e os mesmos constituem-se em processos físicos, químicos ou biológicos.

A combinação de etapas para a recuperação da biomassa é discutida em diversos artigos e as seguintes opções são apresentadas: floculação adicional, sedimentação com floculação, floculação-flotação, bio-floculação e centrifugação, bio-floculação e floculantes inorgânicos, floculantes inorgânicos e filtração, filtração e centrifugação, floculantes inorgânicos e flotação, flotação e agregação ultrassônica (MOLINA GRIMA *et al.*, 2003; BRENNAN E OWENDE, 2010; UDUMAN *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2011; RAWAT *et al.*, 2011; SALIM *et al.*, 2011; PRAGYA, PANDEY E SAHOO, 2013).

Conforme relatado em trabalho de Mohn (1978), um fator a ser considerado é a umidade da biomassa colhida, porque a umidade influencia substancialmente a viabilidade econômica das etapas de recuperação de biomassa. A secagem é um processo com um maior custo econômico em comparação com a desidratação mecânica, por isso metodologias como filtração ou centrifugação devem precedê-la (MOLINA GRIMA *et al.*, 2003).

A escolha do método depende das características das microalgas, tais como: tamanho das células, densidade celular e qualidade desejada para o produto final (BRENNAN E OWENDE, 2010; RAWAT *et al.*, 2011).

Considerando a produção de biocombustíveis, a etapa subsequente ao cultivo é um desafio de viabilidade econômica, uma vez que representa de 20 % a 30 % do custo total de produção. Portanto, a seleção do método de separação da biomassa é amplamente discutida por diversos autores (BRENNAN E OWENDE, 2010; RAWAT *et al.*, 2011; MOLINA GRIMA *et al.*, 2003), uma vez que o combustível a partir de microalgas ainda não é competitivo com o combustível fóssil (PARK, CRAGGS E SHILTON, 2011).

Ríos *et al.*, (2012), relatam os esforços na produção das microalgas com o aumento do desempenho de fotobiorreatores e modificações genéticas das microalgas e, que ainda não existe um método eficiente e econômico para a colheita da biomassa, sendo esta etapa um grande desafio devido a fragilidade e o tamanho das células (entre 3,0 µm e 30 µm).

Um método de colheita universal não existe, sendo ainda uma área de pesquisa intensa, com possibilidade de desenvolvimento de sistemas de colheita adequados com viabilidade

econômica para determinadas espécies de algas (MATA, MARTINS E CAETANO, 2009; UDUMAN *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2013).

A seguir serão apresentados brevemente os principais métodos aplicados para a colheita de biomassa ou com potencial para serem utilizados. Será dado destaque para o processo de microfiltração, que é o processo utilizado neste trabalho.

2.3.1 Centrifugação

A centrifugação é um processo de separação mecânica que utiliza a força centrífuga para provocar a separação dos componentes de um sistema sólido-líquido ou líquido-líquido. O campo centrífugo provoca a “queda” da fase mais pesada através da fase mais leve, na direção radial afastando-se do eixo de rotação (FOUST, CLUMP E ANDERSEN, 1982). Pode ser usada na separação de líquidos imiscíveis. Esta é uma operação unitária extensivamente aplicada na área de microbiologia.

A técnica de centrifugação é eficaz para separar as microalgas do meio de cultura em curto período de tempo (KIM *et al.*, 2013). Entretanto a alta força gravitacional aliada a alta força de cisalhamento desta técnica, pode danificar a estrutura celular da microalga causando o rompimento da célula (KNUCKEY *et al.*, 2006), além de tornar o processo demorado e dispendioso em casos de grandes volumes de cultura (RAWAT *et al.*, 2011).

Heasman *et al.*, (2000) apud Molina Grima *et al.*, (2003), estudaram diferentes condições operacionais da centrifugação sobre a recuperação de biomassa e obtiveram os seguintes resultados: eficiência de recuperação maior que 95 % a uma força equivalente a 13 000 g, diminuindo para 60 % em 6 000 g e 40 % em 1 300 g. Os autores também concluíram que a viabilidade de recuperação das células depende fortemente da espécie de microalga e do método de centrifugação.

Esta operação unitária é recomendada quando o produto desejado requer elevada qualidade, sem a contaminação química e bacteriológica do material processado (MATA, MARTINS E CAETANO, 2009), porque os dispositivos da centrifugação são facilmente limpos e esterilizados. Conforme Uduman *et al.*, (2010) e Rawat *et al.*, (2011), a técnica apresenta como principal desvantagem o alto custo operacional e de investimento.

Considerando a utilização das microalgas para a produção de biodiesel, alguns autores (SANDER E MURTHY, 2010; RAWAT *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2013) argumentam sobre a quantidade de energia requerida pela técnica, desfavorecendo os balanços energéticos de

dióxido de carbono. Ressaltam, ainda, que uma alternativa é a realização de uma pré-concentração para tornar o processo economicamente viável.

2.3.2 Flocculação

A flocculação é um processo em que partículas dispersas são agregadas em conjunto para formar partículas de grandes dimensões, chamadas de flocos (CHEN *et al.*, 2011), o princípio básico baseia-se na colisão entre as partículas, ocorrendo aderência entre as mesmas através de mecanismo de dispersão de cargas.

Produtos químicos, chamados de agentes de flocculação são usualmente adicionados para auxiliar o processo e são classificados em dois tipos principais: flocculantes inorgânicos e flocculantes orgânicos (UDUMAN *et al.*, 2010). Idealmente, os flocculantes utilizados devem ser de baixo custo, não tóxicos e eficazes em baixas concentrações e precisam ser escolhidos de modo que o processamento posterior não receba qualquer efeito negativo (MOLINA GRIMA *et al.*, 2003). Como relatado por Papazi, Makridis e Divanach (2010), a adição de sais metálicos ocasiona a lise das células.

As microalgas possuem carga negativa, o que evita a agregação de células em suspensão, e a quebra deste sistema estável caracteriza uma eficiente forma de separação (CHEN *et al.*, 2011). A carga da superfície pode ser neutralizada ou reduzida pela adição de flocculantes, tais como cátions polivalentes e polímeros catiônicos.

A flocculação também pode ser realizada com o uso de microrganismos que são capazes de agir como polieletrólitos. Oh *et al.*, (2001) estudaram o flocculante microbiano (AM49) para a colheita de *Chlorella vulgaris* e obtiveram uma eficiência de recuperação de 83 % na faixa de pH entre 5,0 a 11. Salim, Vermuë e Wijffels, (2012), utilizaram a bioflocculação como pré-concentração antes da centrifugação, sendo estudadas quatro diferentes microalgas flocculantes (*Ankistrodesmus falcatus*, *Ettlia texensis*, *Neochloris oleabundans* e *Tetraselmis suecica*) para a colheita das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus obliquus* e como resultado obtiveram uma diminuição do custo energético com relação ao processo de centrifugação.

A flocculação pode ser utilizada individualmente para a recuperação da biomassa ou aplicada como uma pré-concentração, melhorando o desempenho de outras técnicas, como a sedimentação, centrifugação e filtração. Com relação aos flocculantes inorgânicos, CHEN *et al.* (2011), apontam como desvantagens a alta sensibilidade aos níveis de pH e que a eficiência depende das espécies das microalgas, além de que, muitas vezes, é necessário uma grande

quantidade de coagulante para provocar a separação. Cabe ressaltar que a presença de floculante pode impossibilitar o uso da biomassa para a aquicultura (MOLINA GRIMA *et al.*, 2003).

2.3.3 Autofloculação

A técnica de autofloculação é um tipo de floculação espontânea associada a um aumento de pH, devido ao consumo de dióxido de carbono fotossintético e a precipitação de compostos inorgânicos durante o cultivo de microalgas (RAWAT *et al.*, 2011; PRAGYA, PANDEY E SAHOO, 2013).

O cultivo prolongado sob a luz solar com fornecimento limitado de dióxido de carbono auxilia a autofloculação de células de algas para a colheita. Em estudo realizado com a adição de hidróxido de sódio (NaOH) em experiência de escala laboratorial revelou que para determinados valores de pH a autofloculação é favorecida (CHEN *et al.*, 2011). Vandamme *et al.*, (2012) utilizaram íons cálcio e magnésio em alto valor de pH para induzir a autofloculação de *Chlorella vulgaris* e constataram que este é um método eficaz como pré-concentração, contudo exige uma dosagem elevada de magnésio ($> 0,1$ mM).

Kim *et al.*, (2013) ressaltam que a autofloculação deve ser cuidadosamente utilizada como método de colheita de biomassa e que geralmente uma quantidade elevada de íons cálcio, magnésio e fósforo precisa ser utilizada para agregar as células de microalgas. Portanto, meios de cultivo ricos em íons, tais como a água do mar e águas residuais, podem ser apontados como ideais para esta técnica.

2.3.4 Sedimentação

A sedimentação é um método mecânico adotado para separar as partículas de um fluido por ação da força gravitacional. As partículas podem ser sólidas ou gotas líquidas e o fluido um líquido ou gás em repouso ou em movimento.

A sedimentação é adequada para remoção de contaminantes ou componentes de interesse inseridos em um fluido, como por exemplo, sólidos de resíduos líquidos ou mesmo a poeira do ar ou de correntes gasosas. Em outros casos as partículas são suspensas em fluidos para obter a separação através de fracionamento e, conseqüentemente, os componentes se separam em frações que diferem no tamanho ou na massa específica, ou seja, a sedimentação

ocorre até se atingir regiões distintas, uma com fluido límpido e outra com uma lama com maior teor de sólidos (FOUST, CLUMP E ANDERSEN, 1982; MCCABE, SMITH E HARRIOTT, 1993; GEANKOPLIS, 2003).

Para a recuperação de biomassa de microalgas, a sedimentação demonstra uma alta eficiência energética e é amplamente utilizada em diversas espécies, geralmente em tratamento de águas residuárias (RAWAT *et al.*, 2011). A recuperação da microalga *Spirulina* apresentou bons resultados utilizando este método de separação por evidenciar alta densidade e grande tamanho de célula (12 μm) (CHEN *et al.*, 2011; PRAGYA, PANDEY E SAHOO, 2013).

Edzwald (1993), utilizando o processo de sedimentação, observou uma fraca decantação de microalgas devido à baixa densidade das partículas. Constatou, ainda, que o uso de agentes flocculantes melhora a sedimentação das microalgas. A aplicação desta técnica é apropriada quando o valor agregado do produto é baixo (MATA, MARTINS E CAETANO, 2009; CHEN *et al.*, 2011).

2.3.5 Flotação

A flotação é um método de separação gravitacional capaz de separar sólidos com diferentes características, como tamanho e densidade, de correntes líquidas, através do contato das partículas com ar ou bolhas de gás, levando-as para a superfície do líquido.

Nesta técnica as células de microalgas são capturadas por bolhas de gás e desta forma encaminhadas para o topo do líquido, onde são recolhidas. Segundo Rawat *et al.*, (2011), o método é efetivo em escala laboratorial para os microrganismos unicelulares e com pequeno tamanho de células. Mais especificamente, a técnica de flotação é eficaz na separação de microalgas com diâmetro entre 10 μm e 500 μm (YOON E LUTTRELL, 1989; CHEN *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2013).

O rendimento da técnica é dependente do tamanho das bolhas formadas e estas podem ser denominadas da seguinte maneira: nanobolhas com dimensões menores que 1,0 μm ; microbolhas entre 1,0 μm e 999 μm e bolhas finas entre 1,0 mm e 2,0 mm (KIM *et al.*, 2013).

Em dois estudos realizados por Hanotu, Bandulasena e Zimmerman (2012) e Barrut *et al.*, (2012) foi demonstrado que bolhas menores apresentaram melhor desempenho do que bolhas de maiores dimensões. Isto ocorre porque as bolhas menores apresentam maior facilidade de carregar as células de microalgas para o topo da superfície do líquido. Tais resultados foram corroborados pelo trabalho de Zimmerman *et al.* (2011), no qual é

demonstrado que bolhas menores exibem maior longevidade e uma maior capacidade de carregar as partículas, uma vez que aumentam a relação área superficial/volume.

A interação entre as células e as bolhas também é determinada pela carga da superfície das microalgas e a sua hidrofobicidade. Geralmente, as células de microalgas são hidrofílicas e as bolhas são hidrofóbicas, contudo ambas são carregadas negativamente e uma alteração neste sistema é capaz de beneficiar a separação (KIM *et al.*, 2013).

A aplicação da flotação é dividida em flotação por ar dissolvido, flotação dispersa e flotação eletrolítica. A flotação por ar dissolvido implica na redução da pressão de um fluxo de água pré-saturada com ar em excesso para produzir bolhas de tamanhos entre 10 µm a 100 µm (UDUMAN *et al.*, 2010). Sua eficácia aumenta se o tamanho da célula de microalga é maior. Portanto, esta técnica está associada com o uso de flocculantes para agregar as células e facilitar a separação (PRAGYA, PANDEY E SAHOO, 2013).

Na flotação por ar disperso, bolhas entre 700 µm e 1 500 µm são formadas por agitação em alta velocidade com injeção de ar no sistema e interagem com a superfície das células carregadas negativamente. O desempenho melhora se a carga negativa das bolhas formadas diminuir, isto pode ser realizado pela adição de surfactantes catiônicos ou outros agentes químicos que favoreçam a formação de cargas positivas (CHEN *et al.*, 2011; RAWAT *et al.*, 2011).

2.4 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS

A evolução dos processos de separação por membranas (PSM) data a partir do início da década de 1970 com a utilização de membranas sintéticas. Esse avançado sistema de separação foi adicionado aos processos clássicos de separação como destilação, filtração, adsorção, troca iônica, centrifugação, extração por solvente, cristalização, entre outros (HABERT, BORGES E NOBREGA, 2006).

Basicamente as membranas são definidas como uma barreira que separa duas fases e que restringe total ou parcialmente o transporte de uma ou várias espécies químicas presentes nas fases.

As membranas orgânicas podem ser poliméricas ou biológicas, estando as poliméricas, com suas variadas propriedades químicas e físicas, consolidadas no mercado de membranas sintéticas comerciais. Já as membranas inorgânicas estão divididas entre cerâmicas e metálicas, e são produzidas há mais de 20 anos, porém, somente recentemente começaram a disputar

mercado com as membranas poliméricas. As membranas inorgânicas apresentam como vantagem uma maior vida útil e maior facilidade de limpeza, contudo, o custo é maior em comparação com as membranas poliméricas.

De um modo geral, em relação à morfologia as membranas podem ser classificadas em duas grandes categorias: membranas densas e membranas porosas. As membranas ainda podem diferir com relação às suas características morfológicas ao longo de sua espessura, e neste caso, são divididas em isotrópicas e anisotrópicas.

As membranas isotrópicas apresentam as mesmas características ao longo da sua espessura. As membranas anisotrópicas são caracterizadas por uma região superior muito fina (aproximadamente $1,0\ \mu\text{m}$), mais fechada (com poros ou não) chamada de pele, suportada por uma estrutura porosa. Quando ambas as regiões são constituídas por um único material a membrana é do tipo anisotrópica integral. Caso materiais diferentes sejam empregados no preparo de cada região a membrana será do tipo anisotrópica composta.

A Figura 2.6 apresenta, de forma esquemática, as morfologias mais comuns observadas na seção transversal de membranas comerciais.

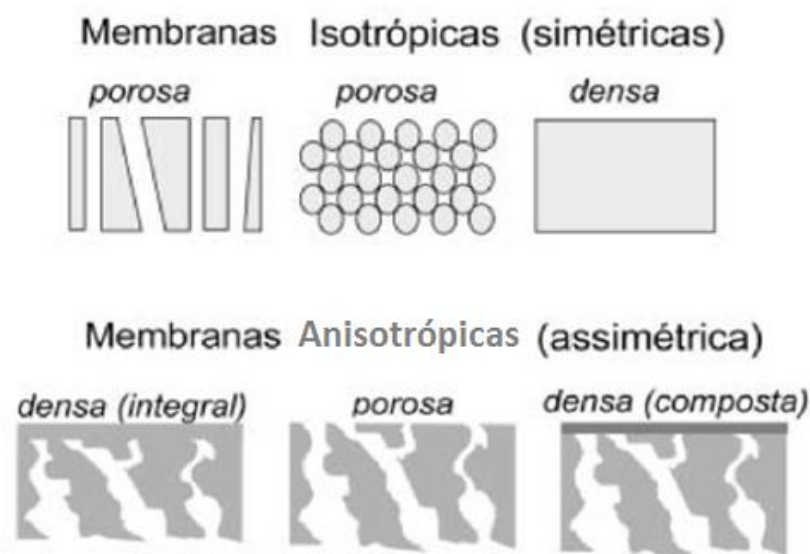


Figura 2.6 - Representação esquemática da seção transversal dos diferentes tipos de morfologias das membranas sintéticas. Fonte: Adaptado de Habert, Borges e Nobrega, (2006).

De acordo com a Figura 2.6, pode-se observar que tanto as membranas densas como as porosas podem ser isotrópicas ou anisotrópicas, ou seja, podem ou não apresentar as mesmas características morfológicas ao longo de sua espessura. A estrutura da membrana informa o mecanismo de separação e, portanto sua aplicação (MULDER, 1996).

Nos processos de separação, uma molécula ou partícula é transportada através da membrana de uma fase para outra pela ação de uma força motriz que atua na molécula ou partícula. A extensão dessa força motriz é determinada por um potencial ou por uma diferença de potencial através da membrana, conforme demonstra a Equação 2.1.

$$\text{Força motriz} = \frac{\Delta X}{l} \quad (2.1)$$

onde ΔX é a diferença de potencial e l é a espessura da membrana.

A força motriz é expressa por dois diferentes potenciais: a diferença de potencial químico (Δu) e a diferença de potencial elétrico (Δe). Como os processos com membranas são geralmente isotérmicos, o gradiente de potencial químico pode ser expresso apenas em termos do gradiente de pressão e de concentração (ou pressão parcial).

O tipo de força motriz aplicado ao processo, bem como, a morfologia da membrana são os responsáveis pelo transporte, sendo dois tipos de mecanismos considerados: o convectivo e o difusivo.

O mecanismo convectivo ocorre em membranas porosas, e neste caso a separação está diretamente associada à relação entre o tamanho das espécies presentes e o tamanho dos poros da membrana, conceito aplicado aos processos de microfiltração (MF), ultrafiltração (UF) e nanofiltração (NF).

Na Tabela 2.3, pode-se observar os diferentes processos de separações por membranas, que utilizam a diferença de pressão como força motriz. Cabe ressaltar que os processos de MF e UF são atualmente empregados com sucesso na concentração de biomassa de microalgas e podem encontrar muitas aplicações na fotobiotecnologia (FRAPPART *et al.*, 2011). Ainda, destaca-se que, com a intensa melhora nas técnicas de fabricação de membranas e sua ampla aplicação, os custos das membranas vêm diminuindo consideravelmente tornando estes processos mais acessíveis (ZHANG *et al.*, 2010; RÍOS *et al.*, 2012).

Tabela 2.3 – PSM que utilizam a diferença de pressão através da membrana como força motriz relacionados pelo tamanho de poros das membranas e respectivas pressões de operação.

PSM	Tamanho dos poros (nm)	Faixa de pressão (bar)
Microfiltração (MF)	50 – 10 000	0,1 – 2,0
Ultrafiltração (UF)	1,0 – 100	1,0 – 5,0
Nanofiltração (NF)	< 1,0	5,0 – 20
Osmose Inversa (OI)	0,1 – 1,0	10 – 100

Fonte: Adaptado de Mulder, (1996).

Uma possível configuração de processo de separação por membranas é o acoplamento dos fotobiorreatores com as membranas em modo contínuo. Desta forma, existe a possibilidade

de tornar mais eficiente o processo de concentração e purificação tanto da biomassa quanto de metabólitos provenientes das microalgas (VANDANJON *et al.*, 1999; ROSSIGNOL *et al.*, 2000; FRAPPART *et al.*, 2011).

Segundo Hwang *et al.* (2013), diferentes formas de realizar a colheita das microalgas baseados em processos com membranas são propostos, incluindo sistemas com membranas submersas, microfiltração tangencial e microfiltração dinâmica. Entre esses sistemas, a microfiltração tangencial apresenta grande potencial na recuperação de biomassa, menor consumo de energia e adicionalmente promove a preservação da estrutura, das propriedades e da motilidade das microalgas coletadas (ROSSIGNOL *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2011; HWANG *et al.*, 2013).

Grande parte dos trabalhos publicados sobre a colheita de microalgas confirma a eficácia da microfiltração e da ultrafiltração na configuração de escoamento tangencial (ZHANG *et al.*, 2010; BILAD *et al.*, 2012).

A ultrafiltração e a microfiltração com configuração de escoamento tangencial efetuam a separação em temperatura ambiente, garantindo condição ideal para a manutenção das células. Além disso, estes processos, apresentam capacidade de concentrar a suspensão de microalgas de forma seletiva, sendo adequados para recuperação de células de algas com tamanhos entre 3,0 μm e 30 μm (ZHANG *et al.*, 2010), não havendo necessidade de adição de produtos químicos que possam contaminar ou acumular sobre as microalgas (CHEN *et al.*, 2011; VANDAMME *et al.*, 2011; BILAD *et al.*, 2012; WICAKSANA *et al.*, 2012). A MF e UF operam em condições de baixas pressões transmembranas e velocidades tangenciais, assegurando a integridade das células (AHMAD *et al.*, 2012).

A seguir, o processo de microfiltração será apresentado com maiores detalhes, incluindo alguns conceitos importantes para a compreensão dos estudos realizados neste trabalho.

2.4.1 Microfiltração

A microfiltração é uma técnica de separação por membranas que utiliza membranas porosas com diâmetro de poro entre 0,1 μm a 10 μm e apresenta como força motriz o gradiente de potencial químico expresso em termos da diferença de pressão através das membranas (0,1 bar a 2,0 bar) para separar partículas do tamanho de micrometros, tais como bactérias, células de leveduras, coloides, partículas em suspensão, entre outras.

As partículas que ficam retidas possuem tamanho maior que o maior diâmetro de poro da membrana. O tamanho dos poros dessas membranas e o fluxo permeado são tipicamente maiores em comparação a processos com membranas de ultrafiltração e nanofiltração (GEANKOPLIS, 2003).

O processo de microfiltração pode ser operado em duas configurações de escoamento: transversal ou perpendicular (*dead-end*) e tangencial ou fluxo cruzado (*crossflow*). A Figura 2.7 demonstra os dois modelos de escoamento.

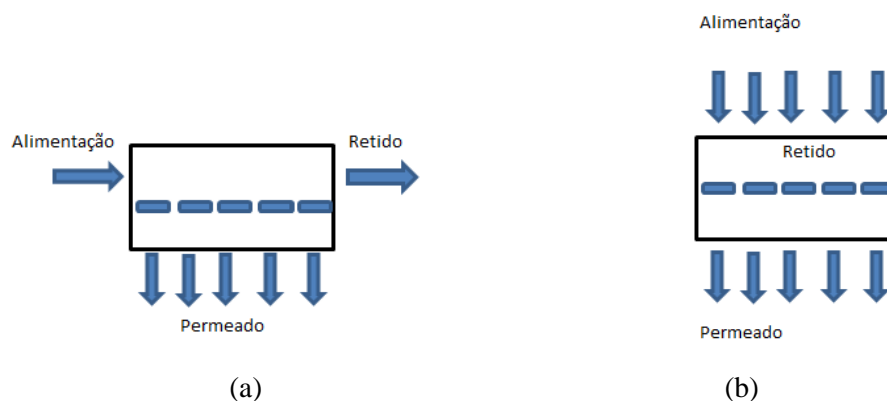


Figura 2.7 - Diferentes configurações de escoamento do processo de microfiltração: (a) tangencial ou cruzado (*crossflow*), (b) perpendicular ou transversal (*dead-end*).

Na configuração transversal o sistema é semelhante a uma filtração convencional, ou seja, a corrente de alimentação e permeado passam perpendicularmente a membrana e, desta forma os componentes retidos se acumulam sobre a sua superfície, formando um tipo de torta sobre a mesma (MULDER, 1996). A espessura desta torta aumenta com o tempo de filtração, causando o decréscimo do fluxo permeado.

No escoamento tangencial a corrente de alimentação passa tangencialmente à superfície da membrana, produzindo uma corrente de concentrado (retido) com a maioria das partículas da suspensão e um fluxo permeado que atravessa a membrana.

A diferença do escoamento tangencial para o transversal resulta em um comportamento distinto do fluxo permeado com o tempo. No modo tangencial, ocorre um decréscimo mais lento do fluxo permeado devido a menor formação de uma camada de torta (RIPPERGER E ALTMANN, 2002) e conforme Song (1998) e Stamatakis e Tien (1993) em escoamento tangencial apenas uma fração das partículas se deposita sobre a superfície da membrana.

As observações do parágrafo anterior permitem compreender que na recuperação de biomassa de microalgas o escoamento tangencial é vantajoso, pois resulta em maiores valores

de fluxo permeado e apresenta a capacidade de manter as células das microalgas em suspensão (AHMAD *et al.*, 2012).

A viabilidade econômica da microfiltração depende do fluxo permeado e da capacidade de processamento do sistema (RÍOS *et al.*, 2012). Segundo Huang *et al.*, (2012) uma metodologia adequada de concentração melhora o desempenho da extração do óleo das algas ou até mesmo de outros compostos, apontando o uso de membranas para concentração de *Chlorella* sp. por consistir em um método seguro e confiável. Os autores ainda comentam as vantagens em comparação com a centrifugação, aos processos de floculação-flotação e sedimentação. A desvantagem, segundo os autores, está no *fouling* progressivo que provoca o declínio do fluxo permeado.

2.4.2 Parâmetros operacionais do processo de MF

Fluxo permeado

O fluxo de permeado através das membranas de microfiltração pode ser descrito pela lei de Darcy, onde o fluxo permeado (J) é diretamente proporcional a pressão transmembrana (ΔP) (Mulder, 2006), como descreve a Equação 2.2.

$$J = L_p \Delta P \quad (2.2)$$

onde a constante L_p é referente à permeância hidráulica da membrana ($L \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ bar}$) que contém as características estruturais da membrana e ΔP a pressão transmembrana (bar).

Parâmetros como a pressão transmembrana (PTM) e a velocidade tangencial do fluido, a qual influencia diretamente na taxa de cisalhamento sobre as microalgas, estão diretamente relacionadas à viabilidade celular e à síntese de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), sendo este último um severo causador de *fouling* (MORINEAU-THOMAS, JAOUEN E LEGENTILHOMME, 2002; FRAPPART *et al.*, 2011). O *fouling* ocorre devido à interação entre as espécies presentes na solução de alimentação com a membrana, resultando no decréscimo do fluxo permeado com o tempo de operação. A estabilização do fluxo permeado pode demorar de minutos, horas ou até alguns dias (HABERT, BORGES E NOBREGA, 2006).

Conforme Wicaksana *et al.*, (2012), a interação entre as microalgas e os EPS se mostram dependentes do cisalhamento, do fluxo permeado imposto pela PTM e pelas características da membrana e da suspensão, bem como a natureza do depósito sobre a membrana. A liberação dos EPS está diretamente relacionada à formação de um *fouling* severo

nas membranas devido à sua capacidade de formação de biofilme, uma vez, que os EPS podem agregar as células de microalgas gerando o acúmulo das mesmas sobre a superfície da membrana.

Para uma condição ótima de processo o fluxo permeado precisa se manter elevado, e altas velocidades tangenciais e pressões transmembranas podem garantir esse resultado e se estas condições forem bem definidas elas podem evitar a formação elevada de *fouling*. Entretanto, deve-se atentar que altos valores destes parâmetros afetam o custo energético do processo, já que requerem maior força de bombeamento. Neste caso, uma forma de melhorar o processo, envolve mudanças na geometria do módulo ou alterações nas condições operacionais.

Gaucher *et al.*, (2002) e Velikovska *et al.*, (2004) relataram a importância de controlar as condições hidrodinâmicas, como a pressão transmembrana e a taxa de cisalhamento, em baixos valores como meio de reduzir o *fouling*. Song (1998), em referência à microfiltração tangencial, comenta que os parâmetros *PTM* e velocidade tangencial são os que mais afetam os fenômenos de *fouling*. Portanto, a observação do fluxo crítico e do fluxo limite são de extrema importância para diminuir o rápido decréscimo do fluxo permeado com o tempo.

O fluxo crítico é definido como o maior fluxo permeado em que não é observada a diminuição do fluxo com o tempo, ou seja, é o fluxo no qual a pressão transmembrana começa a se desviar da linearidade obtida pela passagem de água pura pelo sistema. O fluxo crítico é influenciado pelas condições hidrodinâmicas do processo, tamanho de partículas da solução, força iônica, potencial zeta, morfologia e tamanho de poro da membrana (CHONG, WONG E FANE, 2008).

Segundo Field *et al.* (1995) um dos meios de minimizar a rápida redução do fluxo permeado é operar o processo abaixo do fluxo crítico. A operação acima do fluxo crítico tende a aumentar o arraste das partículas para a superfície da membrana, ocasionando *fouling* irreversível. Portanto, um estudo visando a determinação desse parâmetro permite evitar que condições como *PTM* e velocidade tangencial afetem negativamente o processo.

O fluxo limite é observado em experimentos onde a solução é operada a diferentes pressões transmembranas e este valor é alcançado no momento em que o aumento da pressão não resulta em aumento de fluxo, ou seja, o fluxo permeado deixa de ser linear, tendendo a estabilização.

Frappart *et al.* (2011) utilizaram a ultrafiltração em módulo plano e módulo dinâmico para testar, respectivamente, o regime laminar e o regime turbulento sobre a integridade celular

das microalgas *Cylindrotheca fusiformis* e *Skeletonema costatum*. Em regime laminar, os autores calcularam a taxa de cisalhamento utilizando a Equação 2.3 da lei de Poiseuille.

$$\dot{\gamma} = \frac{8}{e} v \quad (2.3)$$

onde e é a espessura do canal de permeação em metros e v é a velocidade tangencial no canal em m s^{-1} , obtida pela divisão da vazão pela área transversal do canal.

O módulo dinâmico de filtração é um sistema que apresenta como princípio realizar a maximização do gradiente de velocidade sobre a superfície da membrana, aumentando desta forma a tensão de cisalhamento em um regime turbulento de escoamento (RÍOS *et al.*, 2012). Existem diversos tipos de filtração dinâmica, como exemplos os sistemas rotacionais de membranas ou de discos e os sistemas vibratórios (JAFFRIN, 2008).

O sistema utilizado por Frappart *et al.* (2011), consistiu em um disco rotatório acoplado em uma membrana estacionária. Este módulo permite o estudo de parâmetros, como a velocidade angular do disco (rad s^{-1}) e o fator de velocidade aplicado pelo sistema. O objetivo principal é a redução do *fouling* da membrana pela geração de uma alta taxa de cisalhamento independentemente do escoamento da solução de alimentação.

Ainda conforme Frappart *et al.* (2011), foi observado que o fluxo permeado em módulo dinâmico quase dobrou de valor quando comparado com módulo plano em escoamento tangencial. Entretanto, os autores afirmam que trabalhos adicionais são necessários para melhor compreensão dos efeitos hidrodinâmicos sobre as microalgas e a medição do consumo energético visando um acoplamento com fotobiorreator onde as células devem ser mantidas vivas para produzir metabólitos recuperáveis.

A relação benéfica sobre o desempenho do processo com o uso de uma maior força de cisalhamento sobre a membrana não é consenso entre diversos autores. Rios *et al.*, (2010) afirmam a redução do *fouling* em regime turbulento em consequência da elevação da força de cisalhamento sobre a membrana. No entanto, Bilad *et al.*, (2012) e Discart *et al.*, (2013), afirmam que essa condição proporciona um severo *fouling*, uma vez que aumenta a liberação de substâncias poliméricas extracelulares (EPS).

Seletividade

A seletividade é um fator decisivo no desempenho de processos de separação por membranas, visto que informa a facilidade que um determinado composto possui para separar-se de outro. Dois parâmetros são utilizados como medida de seletividade: o coeficiente de retenção observada (R_{obs}) e o fator de separação (α).

Em processos onde a força motriz é a pressão transmembrana, como a microfiltração (MF), a nanofiltração (NF), a osmose inversa (OI) e a ultrafiltração (UF), o parâmetro que melhor traduz a seletividade é o coeficiente de retenção.

A Equação 2.4 expressa o coeficiente de retenção observada (R_{obs}), ou seja, a capacidade seletiva da membrana em relação a uma dada espécie:

$$R_{obs} = 1 - \frac{C_P}{C_O} \quad (2.4)$$

onde: C_O é a concentração da espécie na alimentação (g L^{-1}) e C_P é a concentração da espécie no permeado (g L^{-1}).

Resultados de R_{obs} proporcionam os seguintes significados físicos: quando R_{obs} for nulo, a membrana não tem capacidade seletiva para esta espécie e quando R_{obs} for igual a 1,0, a espécie em questão não está presente no permeado, ou seja, a membrana foi capaz de rejeitá-la completamente.

Fator de concentração volumétrico

O fator de concentração volumétrico (FCV) é um parâmetro importante de análise de dados, porque está diretamente associado ao fluxo permeado.

$$FCV = \frac{V_O}{V_R} = \frac{V_O}{V_O - V_P} \quad (2.5)$$

onde V_O e V_P são o volume inicial da solução de alimentação (mL) e o volume de permeado produzido (mL) e V_R é o volume retido (mL).

2.4.3 Polarização por concentração e *fouling*

O maior problema encontrado em membranas de microfiltração, tanto em escala laboratorial quanto industrial, é o declínio do fluxo com o tempo (MULDER, 1996), em função dos fenômenos de polarização por concentração e *fouling*. Estes fenômenos são dependentes, ou seja, um pode ser o causador do outro. Por exemplo, uma elevada polarização por concentração tende a aumentar os fenômenos de *fouling*.

A polarização por concentração é inerente a qualquer processo de transporte seletivo, e é um fenômeno de camada limite, que acontece em decorrência do aumento da concentração do soluto sobre a superfície da membrana, provocando uma resistência adicional à transferência de massa do solvente através da membrana, que resulta na queda do fluxo permeado. Operar o sistema com pressão transmembrana abaixo do valor crítico, utilizar elevados números de Reynolds através do aumento da velocidade tangencial e baixos fatores de concentração são estratégias para diminuir o efeito da camada polarizada de concentração. Deve-se ressaltar que este fenômeno é reversível, pois uma vez terminada a operação com a solução e realizada uma limpeza química, é possível restaurar o fluxo permeado (HABERT, BORGES E NOBREGA, 2006).

Na filtração de microalgas, o fenômeno da polarização por concentração é maior em função da superfície negativa das células, que afeta a interação com a membrana e as substâncias solubilizadas (RÍOS *et al.*, 2012). Neste caso o uso de membranas levemente carregadas negativamente pode minimizar este fenômeno.

Como dito anteriormente, os fenômenos de *fouling* são responsáveis pela contínua queda do fluxo permeado com o tempo e são complexos quanto ao tipo e quanto ao momento em que ocorrem. As interações entre as partículas da solução e a superfície da membrana definem a intensidade do *fouling* e uma possível classificação divide o *fouling* em externo e interno. Um exemplo de *fouling* externo é a formação de torta como resultado do depósito dos solutos e o aumento da concentração destes na superfície da membrana.

As partículas da solução podem causar o bloqueio parcial ou total dos poros e quando são menores que os poros da membrana apresentam possibilidade de serem adsorvidas no seu interior, causando a diminuição de seu diâmetro. O entupimento dos poros é dependente do tamanho e da morfologia das partículas processadas.

Conforme Song (1998), o declínio do fluxo permeado causado pelo bloqueio de poros ocorre na maioria dos casos em três fases distintas, explícitas através da típica curva de fluxo permeado *versus* tempo, demonstrado na Figura 2.8.

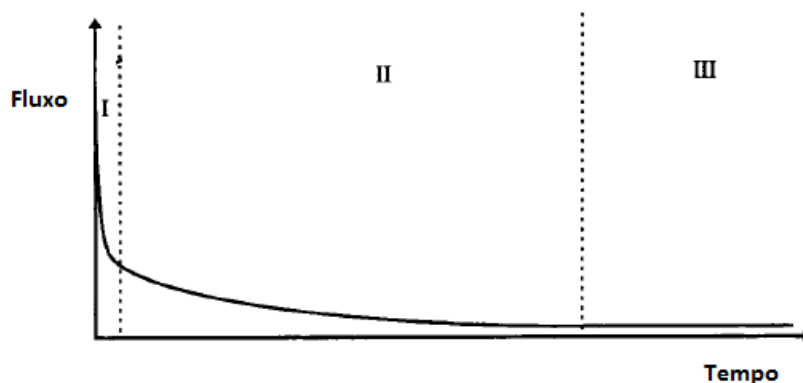


Figura 2.8 - Representação esquemática de três fases do declínio do fluxo permeado: (I) declínio inicial rápido; (II) declínio do fluxo permeado gradualmente a longo prazo e (III) fluxo independente do tempo.

Fonte: Adaptado de Song, (1998).

De acordo com a Figura 2.8, são apresentadas as três fases de declínio de fluxo, sendo elas: fase I - onde os poros são parcialmente bloqueados pelas partículas presentes na solução de alimentação e a área efetiva de filtração diminui, causando um declínio inicial rápido no fluxo permeado; fase II - onde ocorre a formação de uma camada de torta na superfície da membrana, responsável por uma diminuição gradual do fluxo; fase III - onde o fluxo permeado atinge o estado estacionário (SONG, 1998).

O percentual de *fouling* pode ser calculado pela comparação entre a permeância à água destilada antes (DWP_b em $L\ m^{-2}\ h^{-1}\ bar^{-1}$) e após (DWP_a em $L\ m^{-2}\ h^{-1}\ bar^{-1}$) os testes de filtração com a solução através da Equação 2.6 (WU *et al.*, 2007).

$$\% Fouling = \left(1 - \frac{DWP_a}{DWP_b} \right) \times 100 \quad (2.6)$$

Os valores de DWP_b e DWP_a são obtidos a partir do coeficiente angular da reta formada pelos pontos de fluxo de água destilada *versus* pressão antes e após a passagem da solução pela membrana.

2.4.4 Resistências ao fluxo permeado

O declínio do fluxo em filtração por membranas é o resultado do desenvolvimento de uma série de resistências particulares, cada uma contribuindo para o decréscimo do fluxo permeado. A resistência total representa a soma das seguintes resistências: resistência da membrana, resistência devido à polarização por concentração e resistências associadas ao fenômeno de *fouling*.

A resistência total (R_T) é calculada utilizando a Equação 2.7.

$$R_T = \frac{\Delta P}{\mu J} \quad (2.7)$$

onde ΔP é a pressão transmembrana (Pa), J é o fluxo permeado da solução (m s^{-1}) e μ é a viscosidade dinâmica da solução (Pa s).

Quando a solução é processada, todas as resistências que causam o declínio do fluxo estão ocorrendo de forma interligada e complexa. A resistência da membrana está presente, estando relacionada a fatores característicos da membrana, como tamanho e distribuição dos poros, espessura da membrana, caráter hidrofílico do material. Para membranas novas, este valor varia em função da compactação, que por sua vez depende da morfologia da membrana. A resistência da membrana é determinada realizando os testes somente com água pura, como mostra a Equação 2.8.

$$R_M = \frac{\Delta P}{\mu_{\text{água}} J_{\text{água}}} \quad (2.8)$$

E substituindo a Equação 2.2 na Equação 2.8, a resistência da membrana é calculada de acordo com a Equação 2.9.

$$R_M = \frac{1}{\mu_{\text{água}} L_p} \quad (2.9)$$

onde L_p é a permeância hidráulica ($\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1} \text{bar}^{-1}$).

Uma forma de determinar o *fouling* total é a realização de experimentos visando a determinação da permeância de água pura antes (DWP_b) e depois da passagem da solução (DWP_a). Quando ocorre passagem de água pura após a passagem da solução, a resistência ao fluxo é o somatório da resistência devido ao *fouling* e a resistência da membrana. Dessa forma é possível observar a interação da solução com a membrana com a obtenção de uma nova

permeância após sua passagem (DWP_a). Utiliza-se a Equação 2.10 para determinar a resistência devido ao *fouling*.

$$R_F = \frac{1}{\mu_{\text{água}} DWP_a} - R_M \quad (2.10)$$

A resistência devido à polarização por concentração (R_{pc}) ocorre durante a filtração da solução e pode agravar os fenômenos de *fouling*. Sua determinação pode ser obtida através da Equação 2.11.

$$R_{pc} = R_T - R_F - R_M \quad (2.11)$$

onde R_T , R_F e R_M podem ser determinadas pelas equações explicitadas anteriormente e todas apresentam a unidade em m^{-1} .

2.4.5 Modos de operação

A microfiltração tangencial apresenta distintos modos de operação, que são aplicados dependendo do objetivo do processo. Geralmente, o sistema é alimentado contendo uma mistura em que determinadas substâncias são retidas, e duas correntes de saída são obtidas: uma corrente de permeado que atravessa a membrana e uma corrente de retido que concentra as substâncias que são rejeitadas pela membrana. A seguir, estão listados os três modos mais utilizados de operação referentes a microfiltração, sendo eles: reciclo total, batelada e diafiltração (DF).

O reciclo total é um modo de operação em que as correntes de retido e permeado retornam ao tanque de alimentação, objetivando a caracterização da membrana, estudo da interação da solução filtrada com a membrana e determinação das melhores condições de operação. Na Figura 2.9 está apresentado de forma simplificada um fluxograma para o modo reciclo total.

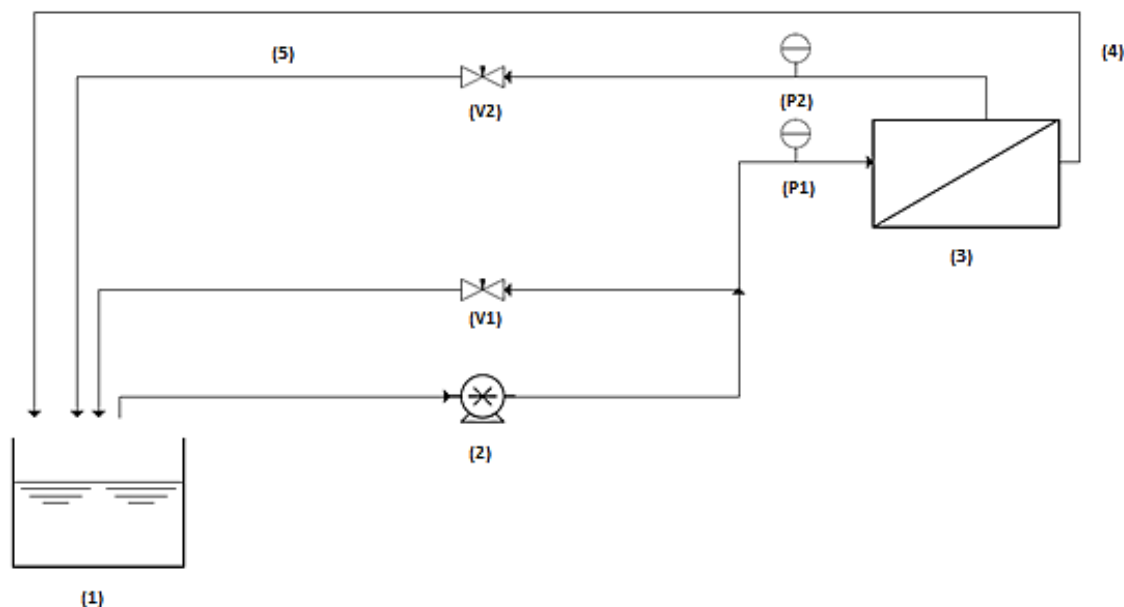


Figura 2.9 - Ilustração do modo reciclo total: (1) tanque de alimentação; (2) bomba de deslocamento positivo; (3) módulo com a membrana; (4) corrente de permeado e (5) corrente de retido; (V1 e V2) válvulas agulha; (P1 e P2) manômetros.

No modo batelada representado na Figura 2.10, o objetivo é concentrar a solução através da remoção do permeado do sistema, enquanto a corrente de retido retorna para o tanque de alimentação. Neste modo de operação é maior o tempo médio de residência das partículas dentro do sistema e a área de membrana exigida é menor em comparação com modos de operação como alimentação e purga e multiestágios, conseqüentemente reduz os custos com investimentos, energéticos e com a substituição das membranas (LIPNIZKI, BOELSMAND E MADSEN, 2002).

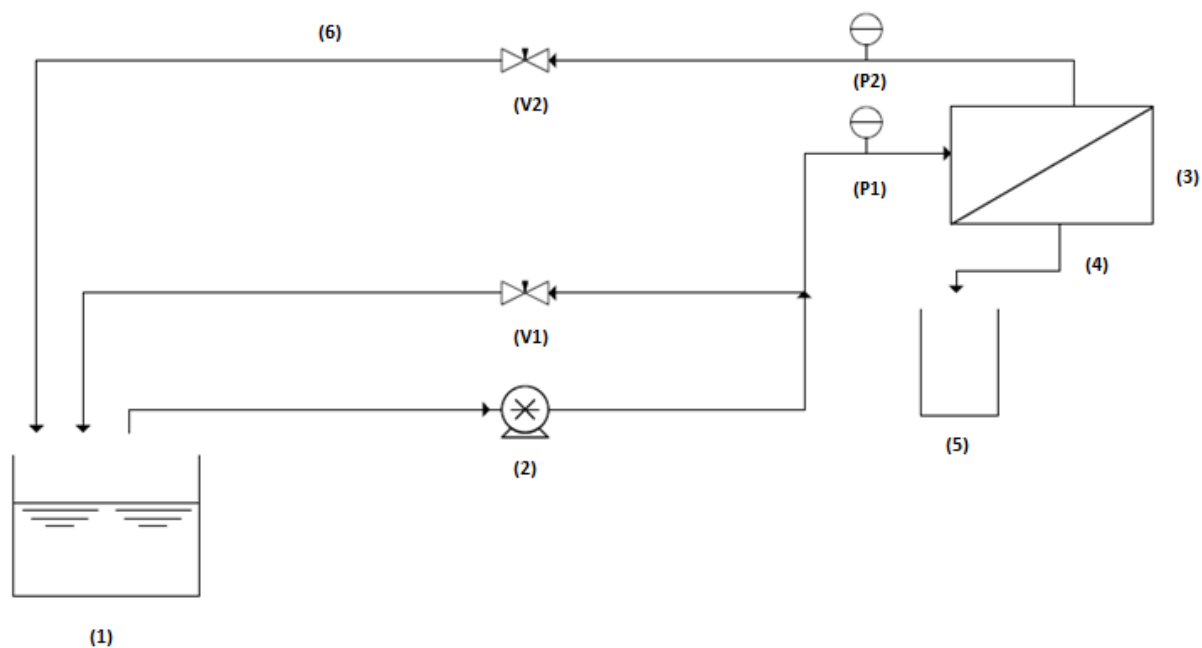


Figura 2.10 - Ilustração do modo batelada: (1) tanque de alimentação; (2) bomba de deslocamento positivo; (3) módulo com a membrana; (4) corrente de permeado; (5) tanque para o permeado e (6) corrente de concentrado; (V1 e V2) válvulas agulha; (P1 e P2) manômetros.

A diafiltração é um modo de operação onde solvente é adicionado na solução de alimentação com o intuito de retirar os microsolutos (impurezas) através da corrente de permeado, realizando portanto, a purificação do soluto de interesse que é retido pela membrana. Se o interesse estiver nas substâncias presentes na corrente de permeado, a diafiltração é capaz de aumentar sua recuperação, uma vez que este é arrastado pelo solvente. Este modo pode ser operado de forma contínua e descontínua. Na Figura 2.11 está apresentado de forma simplificada um fluxograma para o modo de operação diafiltração.

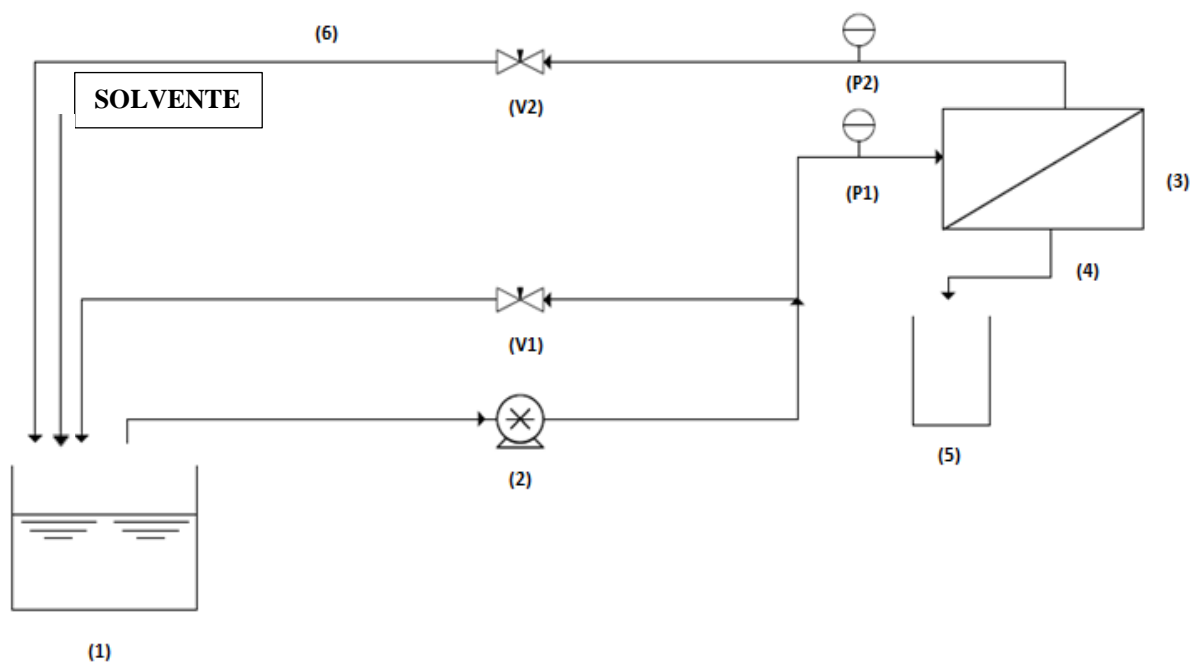


Figura 2.11 - Ilustração do modo diafiltração: (1) tanque de alimentação; (2) bomba de deslocamento positivo; (3) módulo com a membrana; (4) corrente de permeado; (5) tanque para o permeado e (6) corrente de concentrado; (V1 e V2) válvulas agulha; (P1 e P2) manômetros.

A operação diafiltração em modo contínuo consiste na alimentação sucessiva de solvente em vazão igual a vazão de permeado, em condições adequadas de pH e temperatura, sendo apropriada quando a concentração da solução é alta e não exista a possibilidade de diminuir o volume da solução de alimentação.

No modo diafiltração descontínuo, uma quantidade de solvente é adicionada por etapas, gerando um menor volume de permeado, sendo possível otimizar a quantidade de volume de solvente e o número de vezes em que é adicionado. A DF pode ser efetuada após pré-concentração em modo batelada (LIPNIZKI, BOELSMAND E MADSEN, 2002), até a retirada desejada de volume de permeado, sendo interrompida a adição de solvente, permitindo a concentração final da solução.

De acordo com estudo de Fikar, Kovács e Czernak (2010), existe três conceitos básicos de operação utilizando membrana - modo de concentração, modo de diluição a volume constante e modo de diluição a volume variável, diferindo os três em relação à utilização de lavagem com água como diluente.

No modo de operação de concentração, sem lavagem, o solvente não é introduzido no tanque de alimentação, resultando em uma diminuição contínua do volume da solução de alimentação. No modo de diluição a volume constante, o volume da solução de alimentação é

mantido constante por adição contínua de um diluente a uma taxa igual à taxa de permeação (FOLEY, 2006).

A operação em modo de diluição a volume variável foi proposta por Jaffrin e Charrier, (1994) e revista por Foley, (2006), sendo esta baseada na capacidade de concentrar simultaneamente o macrosoluto e retirar o microsolutos, com adição contínua de água ao tanque de alimentação em uma taxa proporcional, mas menor que a taxa de permeação.

Um processo típico de filtração pode envolver os dois modos de operação batelada e DF em três etapas, sendo elas: 1) pré-concentração (batelada), objetivando reduzir o volume da solução de alimentação e remover pequena quantidade de microsolutos; 2) diafiltração combinada com batelada, onde os microsolutos são retirados por adição de solvente introduzido no sistema. Com isso, é possível aumentar a recuperação do produto de interesse no permeado, ou ainda, aumentar a purificação dos componentes da corrente de retido e; 3) pós-concentração (batealda), utilizada para retirar maior quantidade do volume da solução e concentrar o macrosoluto até uma condição desejada ou possível (MADSEN, 2001; WANG, ZHANG E OUYANG, 2002; LIMAYEM, CHARCOSSET E FESSI, 2004; WANG, L. *et al.*, 2008).

2.4.6 Modelo de Hermia

O modelo empírico proposto por Hermia no ano de 1982 foi originalmente descrito para escoamentos no modo transversal conforme mostra a Equação 2.12. O modelo permite estudar os mecanismos de *fouling*, considerando quatro fenômenos responsáveis pela diminuição no fluxo permeado: bloqueio intermediário, bloqueio padrão, bloqueio completo e formação de torta.

$$\frac{d^2t}{dV^2} = k \left(\frac{dt}{dV} \right)^n \quad (2.12)$$

O modelo de Hermia propõe, em escoamento transversal, a redução contínua do fluxo permeado até o mesmo atingir o valor zero, diferentemente do escoamento em modo tangencial, onde o fluxo sofre uma redução, mas não atinge valor igual à zero, sendo que o *fouling*, neste modo, é essencialmente influenciado pelo cisalhamento.

Field *et al.*, (1995), modificaram a Equação 2.12 para a utilização em escoamento no modo tangencial, de acordo com a Equação 2.13.

$$- \frac{dJ}{dt} J^{n-2} = k(J - J^*) \quad (2.13)$$

onde k e n são constantes que caracterizam o mecanismo do processo de permeação e de *fouling*, e J é o fluxo permeado a cada ponto e J^* é o fluxo permeado no estado estacionário.

A Equação 2.13 pode ser utilizada como um critério de identificação dos diversos mecanismos de bloqueio de poros, quando o parâmetro n assume quatro valores discretos: $n = 2,0$ (modelo de bloqueio completo dos poros), $n = 1,5$ (modelo de bloqueio padrão dos poros, no interior do poro), $n = 1,0$ (modelo de bloqueio intermediário dos poros) e $n = 0$ (modelo de bloqueio de poros devido à formação de torta).

No modelo de formação de torta ($n = 0$) as partículas apresentam elevada concentração e podem ser depositadas na superfície da membrana em conjunto com outras partículas formadoras de torta devido ao maior tamanho em comparação com os poros da membrana.

O modelo para poros completamente bloqueados apresenta valor de $n = 2,0$ e considera o *fouling* somente na superfície da membrana, sem a agregação entre as partículas. Neste modelo as partículas são maiores que os poros da membrana, sendo que toda partícula que chega a superfície bloqueia completamente a entrada dos poros da membrana.

O modelo de bloqueio intermediário de poros ($n = 1,0$) é menos restrito quanto a agregação das partículas, e leva em consideração que algumas partículas tem a capacidade de se agruparem com outras já aderidas à superfície. O *fouling* ocorre quando as partículas possuem tamanho similar aos poros da membrana, ocorrendo somente na superfície da mesma.

No modelo de bloqueio padrão/interno dos poros ($n = 1,5$) o *fouling* ocorre devido às partículas apresentarem menor tamanho em relação aos poros da membrana, proporcionando o depósito das mesmas no interior dos poros. Neste caso o volume dos poros da membrana diminui proporcionalmente ao volume de permeado gerado.

A Figura 2.12 apresenta uma ilustração sobre os diferentes fenômenos *de fouling* abordados no modelo de Hermia modificado por Field.

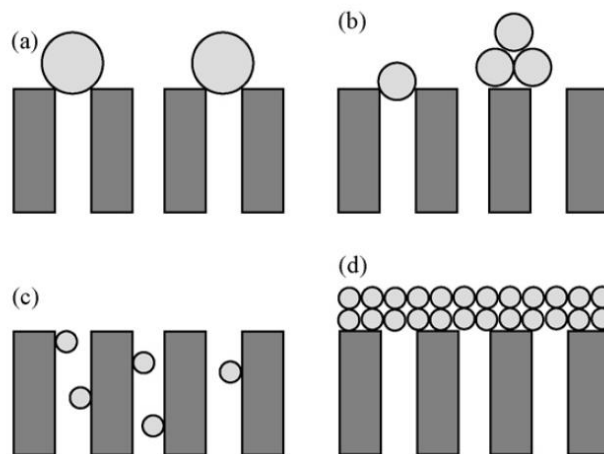


Figura 2.12 – Ilustração dos mecanismos de *fouling* interpretados no modelo de Hermia. (a) bloqueio completo ($n = 2,0$); (b) bloqueio intermediário ($n = 1,0$); (c) bloqueio padrão/interno ($n = 1,5$) (d) bloqueio por formação de torta ($n = 0$). Fonte: Adaptado de Vela *et al.*, (2008).

Vela *et al.*, (2008) utilizaram o Modelo de Hermia para avaliar o tipo de *fouling* em experimentos de ultrafiltração com solução de polietilenoglicol (PEG) em diferentes pressões transmembranas (0,1 MPa a 0,4 MPa) e velocidades de alimentação (1,0 m s⁻¹, 2,0 m s⁻¹ ou 3,0 m s⁻¹). O modelo mais apropriado, para todas as condições testadas, foi o de formação de torta, seguido pelo modelo de bloqueio intermediário. Contudo, os modelos apresentaram restrição quando o sistema foi operado em baixas velocidades tangenciais e altas pressões transmembranas possivelmente devido a diferentes mecanismos de *fouling* atuando de forma combinada. Também foi verificado que o bloqueio de poros foi mais significativo em baixas pressões.

Mah *et al.*, (2012) utilizaram membrana de PVDF de massa molar de corte (MMC) de 30 kDa para estudar os mecanismos de *fouling* na filtração de óleo de palma na concentração de 0,001 g L⁻¹ - 0,1 g L⁻¹, ácido oleico na concentração de 0,003 g L⁻¹ - 0,1 g L⁻¹, e misturas de óleo de palma e de ácido oleico em pH variando de 2,0 a 9,0. Os autores observaram alto valor da correlação (R^2) para o modelo de formação de torta, seguido pelos modelos de bloqueio intermediário, bloqueio padrão e por último bloqueio completo, sendo independentes da concentração e pH de operação. Os autores ainda concluíram que o modelo de Hermia corresponde bem os dados experimentais, com pequenas variações observadas.

Tendo em vista a aplicação deste modelo para compreensão dos mecanismos de *fouling* durante a filtração de microalgas, o modelo de Hermia ainda não foi utilizado, tanto nos moldes originais de Hermia considerando escoamento transversal, quanto no modelo modificado por Field.

2.5 RECICLO DO MEIO DE CULTIVO

As membranas de microfiltração são capazes de reter partículas do tamanho de micrometros, portanto as membranas utilizadas nesta técnica não provocam a retenção de sais e moléculas de média massa molar. Além disso, esta técnica não exige a adição de qualquer substância química para realizar a separação. Desta forma, apresenta-se como boa alternativa o uso do permeado da colheita da biomassa como meio de cultivo para o crescimento das microalgas (RÍOS *et al.*, 2012).

Discart *et al.* (2014) relatam que a reciclagem do meio de cultivo levanta questionamentos quanto ao acúmulo de matéria orgânica, contra-íons e nutrientes não assimilados, confirmando a importância sobre o entendimento deste comportamento para a otimização do processamento de microalgas. Quando o meio de cultura é reciclado, os íons Cl^- , Na^+ , Ca_2^+ são fracamente assimilados, ou mesmo não assimilados pelas microalgas e acumulam-se no meio ocasionando mudanças de salinidade e inclusive pode provocar a biofloculação (ALYABYEV *et al.*, 2007; VANDAMME *et al.*, 2012; BILAD *et al.*, 2014; DISCART *et al.*, 2014).

É importante ressaltar que durante o cultivo das microalgas ocorre a liberação inevitável de matéria orgânica e isto pode inibir o crescimento da biomassa de acordo com o modo de cultivo utilizado (heterotrófico, autotrófico e mixotrófico) e a espécie de microalga cultivada.

O aspecto de reciclagem do permeado obtido pelo processo de MF tem importante aplicação em sistemas abertos de cultivo onde muitas vezes o volume atinge milhares de metros cúbicos, tornando o meio de cultura um item primordial no custo de produção das microalgas (HADJ-ROMDHANE *et al.*, 2013). Dessa forma, a reciclagem do meio de cultura é uma questão-chave para o desenvolvimento de culturas em grande escala de produção, visando minimizar o consumo de água e nutrientes.

Tendo como foco a produção de biocombustíveis com base nas microalgas, os resultados do estudo de (YANG *et al.*, 2011) confirmam a competitividade dos biocombustíveis à base de microalgas, destacando a necessidade de reciclagem da água, com a obtenção dos seguintes resultados: para geração de 1,0 kg de biodiesel, 3 726 kg de água, 0,33 kg de nitrogênio, e 0,71 kg de fosfato são necessários caso for utilizada água doce sem reciclagem. Quando utiliza-se a água reciclada da colheita, o consumo de água atinge 84 % e nutrientes 55 %. Empregando água do mar/águas residuais o consumo de água chega a 90 % e elimina a necessidade de todos os nutrientes, exceto fosfato. Além disso, a variação geográfica e as

espécies precisam ser investigadas para garantir a utilização de uma espécie apropriada em um local com alto potencial para a produção de biodiesel a partir de microalgas.

Livansky *et al.*, (1996) apud Hadj-Romdhane *et al.*, (2013) relataram que a reciclagem do meio de cultura durante o crescimento de *Scenedesmus obliquus* permitiu economia de 63 % do volume de água e 16 % de nutrientes. Em estudo de Hadj-Romdhane *et al.*, (2012), foi estimado que o uso de um meio de cultura otimizado em relação as necessidades fisiológicas de *Chlorella vulgaris* permitiu economizar cerca de 75 % de água e 62 % de nutrientes.

No caso de um sistema considerando o uso de membranas, Bilad *et al.*, (2014), testaram o impacto do reciclo do permeado de um fotobiorreator com membrana (MPBR) para o cultivo de *Chlorella vulgaris*. Como resposta, os autores não observaram mudanças no crescimento da microalga e a redução de água captada para o cultivo foi de 77 %.

Hadj-Romdhane *et al.*, (2013), realizaram experimentos durante 63 dias em fotobiorreator *airlift*. Nestes experimentos, os autores observaram acúmulo regular de matéria orgânica, principalmente polissacarídeos, excretados em cultivos utilizando como meio de cultura o que foi reciclado da colheita de microalga *Chlorella vulgaris* através de centrifugação. Os autores concluíram que a reutilização do meio de cultura de microalgas pode ter efeitos inibitórios ou tóxicos para a produção de biomassa, devido à liberação de metabólitos orgânicos pelas células durante o cultivo.

2.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste capítulo foram expostos os fundamentos teóricos e uma revisão bibliográfica sobre a produção de biomassa de microalgas com o foco na etapa de colheita. Diante das diversas possibilidades de configuração de processo e as diferenças morfológicas entre as espécies de microalgas, pode-se observar uma crescente necessidade de pesquisa.

A literatura apresenta inúmeros estudos sobre a etapa de produção das microalgas devido a aplicação da biomassa das microalgas em diferentes setores industriais. Embora haja um grande foco de pesquisa em desenvolvimento de fotobiorreatores e nas suas condições de funcionamento, ainda existe escassez no desenvolvimento de sistemas de separação para a colheita da biomassa. Conforme exposto, o método de separação deve respeitar alguns requisitos, podendo inclusive, ser específico para determinada espécie de microalga.

Dentre as tecnologias para a colheita de biomassa os processos de separação com membranas têm ganhado espaço, principalmente as técnicas de microfiltração e ultrafiltração.

As condições operacionais destas técnicas também são interessantes para processos contínuos e integrados de produção com a separação, uma vez que este tipo de sistema exige a viabilidade celular das microalgas em maior espaço de tempo sobre a ação de forças cisalhantes. Portanto, é essencial compreender a interação membrana-suspensão para a criação de estratégias que evitem que as maiores desvantagens dos processos com membranas (*fouling* e polarização por concentração) produzam uma brusca queda na eficiência da etapa de recuperação de biomassa.

Outro aspecto importante de estudo, visando o aumento da viabilidade econômica do processo, é o reuso da água proveniente da separação como meio de cultivo para as microalgas, reduzindo dessa forma, o consumo de água e nutrientes. A purificação da biomassa de microalgas também é um atraente campo de pesquisa devido a necessidade de operar as biorrefinarias de forma integrada, ou seja, todas as correntes do processo são utilizadas. No caso de produção de biomassa de microalgas esta medida possibilita interligar as correntes geradas pela separação, inclusive, entre as diferentes espécies destes microrganismos. Portanto, estas medidas podem ser capazes de atenuar o atual desafio de utilizar a biomassa de microalgas como matéria-prima para a produção de biodiesel e também para a produção de materiais de menor valor agregado.

Diante dos desafios desta área de pesquisa, este trabalho visa à aplicação de um sistema de microfiltração tangencial, tendo em vista que o processo de produção de microalgas tem continuamente avançado atingido maiores concentrações de biomassa. Dessa forma, observa-se que os métodos de colheita precisarão atingir maiores patamares de eficiência, considerando também a viabilidade celular das microalgas filtradas e a possibilidade de reuso da água proveniente da separação.

CAPÍTULO 3

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente capítulo apresenta a metodologia e os materiais utilizados neste trabalho. Inicialmente são apresentados os aspectos referentes às microalgas e o sistema de filtração. Após, apresenta-se a metodologia experimental, tanto para o cultivo das microalgas como para a realização dos experimentos de microfiltração e os experimentos para avaliação da capacidade do reuso do permeado como meio de cultivo, além da descrição da estimação dos parâmetros utilizando modelo Hermia-Field. O capítulo é encerrado com a descrição das análises físico-químicas realizadas e a análise estatística aplicada.

3.1 MICROALGAS E MEIO DE CULTIVO

Neste trabalho foram utilizadas duas espécies de microalgas marinhas, *Chlorella* sp. e *Dunaliella tertiolecta*, cujas cepas foram cedidas pelo professor Sérgio Lourenço, do Laboratório de Fisiologia e Cultivo de Algas do Departamento de Biologia Marinha da Universidade Federal Fluminense, e estão mantidas no banco de algas no Laboratório de Bioengenharia do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da UFRGS.

O meio de cultivo base utilizado tanto para a *Chlorella* sp. quanto para a *Dunaliella tertiolecta* é o meio Guillard - "f1/2" (LOURENÇO, 2006) modificado, utilizando água do mar artificial com a seguinte composição: 34 g L⁻¹ de sal marinho (Red Sea), 300 mg L⁻¹ de nitrato de sódio, 1,0 mL L⁻¹ de solução de fosfato de sódio (5,0 g L⁻¹ NaH₂PO₃.H₂O), 30 mg L⁻¹ de silicato de sódio, 1,0 mL L⁻¹ de solução de metais-traço, 1,0 mL L⁻¹ de solução de vitaminas e 1,0 mL L⁻¹ de solução-tampão de pH. A solução de metais-traço contém: 9,8 mg L⁻¹ de

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 22 mg L^{-1} de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 180 mg L^{-1} de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $6,3 \text{ mg L}^{-1}$ de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $4,36 \text{ g L}^{-1}$ de Na_2EDTA e $3,15 \text{ g L}^{-1}$ de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. A solução de vitaminas contém: 100 mg L^{-1} de tiamina, $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de cianocobalamina e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de biotina.

O meio foi esterilizado em autoclave ($121 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 min). A solução de vitaminas foi esterilizada por microfiltração. A solução tampão de pH serve para manter o mesmo entre 7,5 e 8,5.

Em pesquisa realizada por Jarenkow (2014) foram avaliadas diferentes concentrações de nitrato de sódio para o meio de cultivo, sendo alcançada uma maior produção de biomassa no valor de 300 mg L^{-1} de NaNO_3 . Portanto, essa mesma concentração foi utilizada neste trabalho. Para a microalga *Dunaliella tertiolecta*, conforme Chies da Fré (2011), o meio de cultivo com adição de 17 g L^{-1} de NaCl forneceu maior produtividade de biomassa, sendo então, esta concentração utilizada no presente trabalho para a referida microalga. Ambos os trabalhos pertencem ao mesmo grupo de pesquisa do presente estudo.

3.2 MEMBRANA DE MICROFILTRAÇÃO

A membrana de microfiltração utilizada é fabricada pela SYNDER FILTRATION (Califórnia, Estados Unidos). As características da membrana fornecida pelo fabricante são: polímero base é o poli(flúoreto de vinilideno) (PVDF) com suporte de poliéster, tamanho de poro nominal de $0,22 \text{ }\mu\text{m}$; a membrana pode operar em faixas de pH de 1,0 a 10, temperatura máxima de $95 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.3 DESCRIÇÃO DO SISTEMA DE FILTRAÇÃO

O fluxograma simplificado do sistema de MF utilizado está apresentado na Figura 3.1; o sistema é composto pelos seguintes equipamentos: um tanque de alimentação (1) com capacidade de 2,0 L, uma bomba diafragma (2), marca SHURFLO® (Brasil), um módulo de aço inoxidável para membrana plana (3) com área útil de membrana de $0,0058 \text{ m}^2$. A solução de alimentação é resfriada por uma serpentina, inserida no interior do tanque de alimentação que está conectada ao banho termostático, modelo RM 12 da LAUDA (Alemanha).

As válvulas agulha V1 e V2 são utilizadas para regular a velocidade tangencial e a pressão do fluido dentro do módulo. Dois indicadores de pressão manométrica com escala de 0

até 5,0 bar foram empregados a fim de avaliar a perda de carga do módulo e a pressão transmembrana, sendo um instalado na entrada do módulo (P1) e outro na saída (P2).

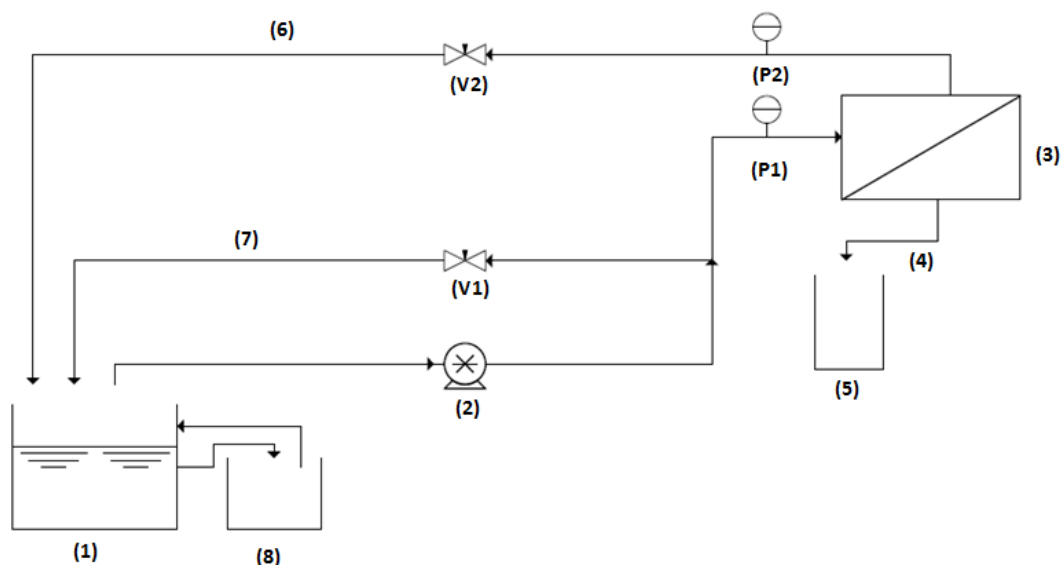


Figura 3.1 – Fluxograma simplificado do sistema de bancada, onde: tanque de alimentação (1); bomba diafragma (2); módulo plano (3); corrente de permeado (4); recipiente para coleta de permeado (5); corrente de concentrado (6); corrente de recirculação (7) e banho termostático (8). V1-V2 válvulas agulha, P1-P2 manômetros.

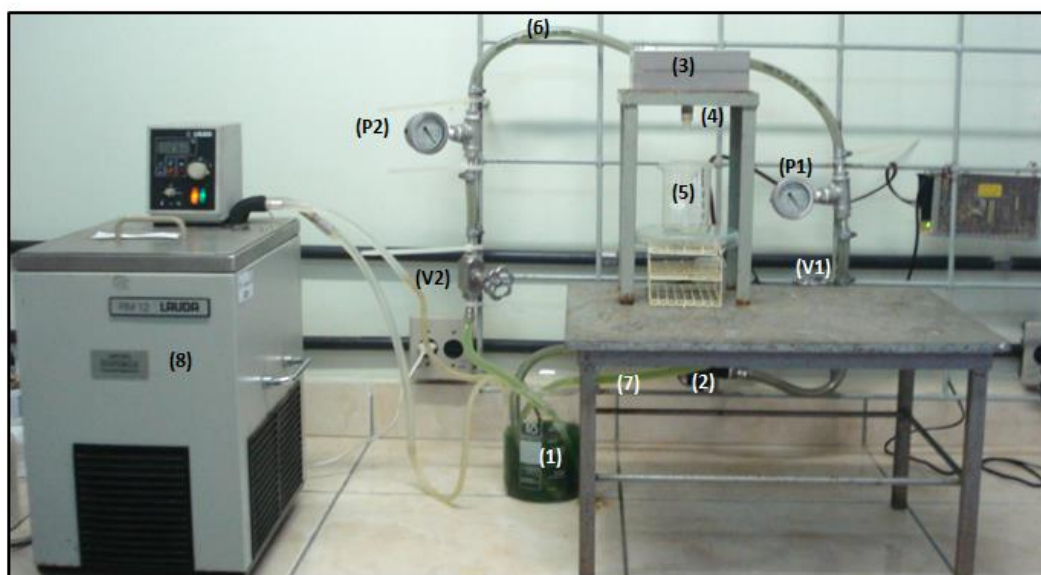


Figura 3.2 – Imagem do esquema do sistema de bancada, onde: tanque de alimentação (1); bomba diafragma (2); módulo plano (3); corrente de permeado (4); recipiente para coleta de permeado (5); corrente de concentrado (6); corrente de recirculação (7) e banho termostático (8). V1-V2 válvulas agulha, P1-P2 manômetros.

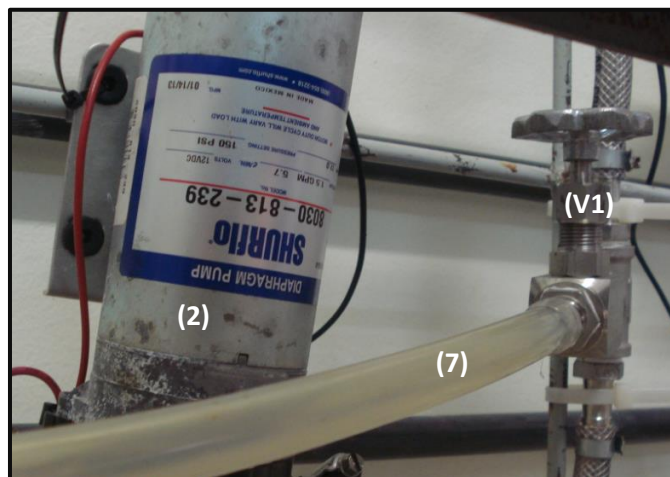


Figura 3.3 - Fotografia detalhada do sistema de recirculação: bomba diafragma (2); corrente de recirculação (7) e válvula agulha (V1).

No modo de operação tangencial, a corrente de alimentação é dividida em duas, sendo uma a corrente de retido e a outra a corrente de permeado.

3.4 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

A apresentação da metodologia experimental engloba a descrição dos seguintes tópicos: preparo do pré-inóculo, experimentos de cultivo das microalgas, experimentos de microfiltração, avaliação de reuso do permeado como meio de cultivo e, por fim, as análises físico-químicas realizadas nas amostras.

3.4.1 Preparação do pré-inóculo

O pré-inóculo foi preparado em frascos Erlenmeyer de 500 mL, sendo empregados 10 mL da cultura-mãe do banco de cultivo e 100 mL de meio de cultivo estéril. Os pré-inóculos foram colocados em estufa rotatória (Figura 3.4) com agitação de 16 rpm, iluminados por lâmpadas eletrônicas totalizando $3,0 \pm 1,0$ klx e à temperatura de 28 ± 1 °C.

As microalgas permaneceram duas semanas na estufa rotatória, sendo adicionados mais 100 mL de meio de cultivo estéril ao final da primeira semana. Ao término da segunda semana os pré-inóculos estavam prontos para serem utilizados nos fotobiorreatores.



Figura 3.4 - Fotografia dos frascos com os pré-inóculos contendo as microalgas dentro da estufa rotatória.

3.4.2 Cultivos das microalgas nos fotobiorreatores

Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores do tipo *airlift* (Figura 3.5), confeccionados em acrílico, com volume útil de 2,4 L, providos de um trocador de calor conectado a banho termostático.

Para a limpeza/asepsia dos fotobiorreatores, preencheu-se os mesmos com água destilada e 10 mL de solução comercial de hipoclorito de sódio (12 %), e após 15 min, o cloro ativo foi neutralizado com 2,5 mL L⁻¹ de solução de tiosulfato de sódio 250 g L⁻¹ por 2,0 h. Essa água de lavagem foi descartada e os meios de cultivo estéril foram inseridos nos fotobiorreatores.

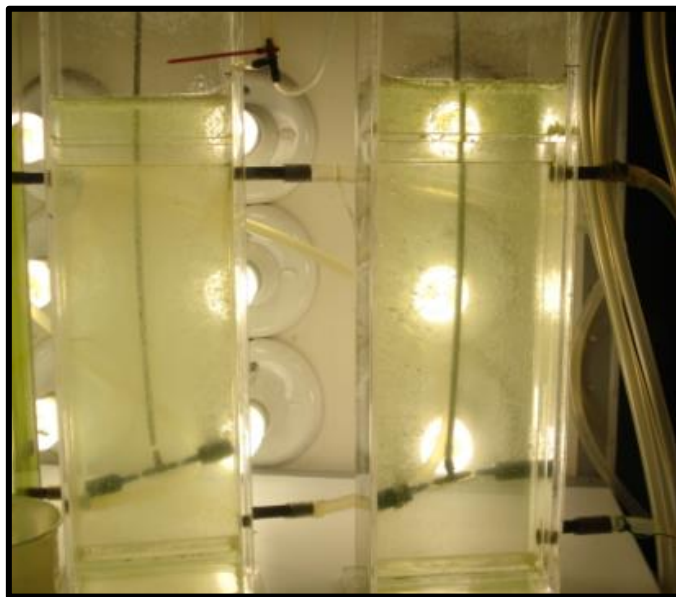


Figura 3.5 - Fotografia dos fotobiorreatores em *start-up*.

Durante a realização dos cultivos, foi realizada a adição diária de 5,0 mL de solução de metais-traços e fosfato. Cada fotobiorreator foi conectado a rotâmetro para medir a corrente de ar comprimido filtrado, com vazão igual a $1,0 \text{ L min}^{-1}$ (0,22 μm , MIDISART®2000 / SARTORIUS STEDIM BIOTECH).

O crescimento das microalgas foi monitorado por densidade ótica a 750 nm com espectrofotômetro UV/visível (AMERSHAM BIOSCIENCES modelo ULTROSPEC 3100 PRO) e correlacionada peso-seco.

Os cultivos de ambas as microalgas operaram com intensidade luminosa de 17,5 klx e temperatura de $28 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo encerrados ao término da fase exponencial de crescimento (fase log). Neste ponto, as microalgas estavam prontas para a etapa de separação pelo sistema de microfiltração. Os experimentos de microfiltração, listados a seguir, foram realizados em triplicatas.

3.4.3 Ensaio de compactação da membrana de MF

A compactação é o adensamento da microestrutura da membrana, causando um decréscimo do fluxo permeado de água pura com o tempo em uma pressão de operação mais elevada que a pressão adotada com a solução problema, permitindo que não ocorra distorção na interpretação sobre os efeitos de *fouling* da solução, além de garantir uma operação estável quando a solução problema é filtrada.

A compactação foi efetuada sempre como a primeira etapa de todos os experimentos deste trabalho, na condição de pressão de 4,5 bar e de temperatura de 27 ± 1 °C. O fluxo permeado foi medido a cada 10 min utilizando proveta de 100 mL e cronometrando o tempo para o preenchimento da mesma. Quando o fluxo permaneceu constante com o tempo, considerou-se que a membrana encontrava-se compactada.

O fluxo permeado representa a vazão de permeado por unidade de área da membrana, sendo calculado através da Equação 3.1.

$$J = \frac{V}{A t} \quad (3.1)$$

onde J é o fluxo permeado em ($L m^{-2} h^{-1}$), V é o volume (L) de permeado coletado num tempo t (h) e A é a área de permeação do sistema em m^2 .

3.4.4 Determinação de permeância hidráulica da membrana de MF

O procedimento para a determinação de permeância hidráulica consiste na passagem da água destilada em diferentes pressões transmembranas. Neste trabalho foram coletados dados de fluxo permeado em cinco diferentes pressões (0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 bar), possibilitando a construção do gráfico do fluxo permeado *versus* a pressão; o coeficiente angular obtido na equação da reta é o valor de permeância hidráulica ($L m^{-2} h^{-1} bar^{-1}$).

3.4.5 Determinação de parâmetros operacionais do processo de MF para as suspensões de *Chlorella sp.* e *D. tertiolecta*

Na etapa de determinação dos parâmetros operacionais do processo de MF, operou-se o sistema no modo de reciclo total. Foram testadas duas velocidades tangenciais ($0,6 m s^{-1}$ e $0,8 m s^{-1}$) que correspondem a uma taxa de cisalhamento de $4 800 s^{-1}$ e $6 400 s^{-1}$, respectivamente, em quatro pressões transmembranas (0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 bar) para *Chlorella sp.* e cinco pressões transmembranas (0,15; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 bar) para *D. tertiolecta*. A temperatura foi mantida em 27 ± 1 °C para todos os experimentos.

O resultado deste experimento permitiu determinar a pressão transmembrana e a velocidade tangencial mais adequada para a realização das etapas seguintes de concentração e diafiltração para ambas as microalgas; esta escolha foi realizada levando-se em conta os valores de fluxo crítico e de fluxo limite, além disso, considerou-se o efeito destas condições sobre a

estrutura celular pela análise de microscopia ótica, microscopia eletrônica de transmissão (MET) e contagem de células por câmara Neubauer.

3.4.6 Determinação de percentual de *fouling*

A partir dos experimentos em modo de reciclo total foram obtidos os resultados para a determinação do percentual de *fouling* que a suspensão de biomassa causa sobre a membrana. A seguinte estratégia foi adotada: medição do fluxo permeado de água destilada antes e após os experimentos de filtração da biomassa algácea.

Imediatamente após a compactação da membrana em pressão transmembrana de 4,5 bar, mede-se o fluxo permeado de água destilada nas seguintes pressões: 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 bar. Ao término das medidas do fluxo de água, a água foi retirada do sistema, sendo substituída pela suspensão de microalgas para nova medição do fluxo permeado em diferentes *PTM*, em modo de reciclo total. Em seguida a suspensão algácea foi retirada e o sistema foi alimentado com água destilada e o fluxo de água foi medido nas mesmas condições operacionais iniciais. A temperatura dos experimentos foi mantida constante e igual a 27 ± 1 °C.

A tendência ao *fouling* foi determinada para as velocidades tangenciais de $0,6 \text{ m s}^{-1}$ e $0,8 \text{ m s}^{-1}$ para ambas as suspensões de microalgas, utilizando-se a Equação 2.6. Vale ressaltar que cada experimento foi realizado com uma membrana nova e que todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.4.7 Estimação de parâmetros do Modelo de Hermia modificado por Field quanto aos mecanismos de *fouling*

Os dados experimentais utilizados para a estimação dos parâmetros do modelo foram dos experimentos de concentração das suspensões de microalgas. A estimação dos parâmetros: fluxo permeado, fluxo permeado no estado estacionário e erro inicial do primeiro ponto de fluxo permeado foram realizados através de software EMSO (SOARES E SECCHI, 2003).

A Equação (2.13), proposta por Field *et al.*, (1995), foi utilizada para cada um dos três experimentos realizados com as microalgas *Chlorella sp.* e *D. tertiolecta*. Através de diferentes valores de *n*, foi possível observar a adequação dos dados experimentais aos modelos representantes de cada fenômeno de *fouling*.

Para verificar a adequação do modelo aos dados experimentais, foi calculado o coeficiente de determinação (R^2), raiz do erro médio quadrático ($RMSE$) e a soma quadrática. Os dois últimos calculados através das equações descritas abaixo.

$$SQ = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_1)^2 \quad (3.2)$$

onde: y_i é o valor estimado e \hat{y}_1 é o valor real dos dados.

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_1)^2}{n_t}} \quad (3.3)$$

onde: n_t é o número de termos.

3.4.8 Experimento de MF para concentração – modo batelada

Os experimentos de concentração da biomassa foram realizados no modo batelada, neste caso, apenas a corrente de concentrado ou retido retorna ao tanque de alimentação e o permeado é recolhido no tanque de permeado. Os parâmetros operacionais, velocidade tangencial e pressão de operação, foram selecionados de acordo com os resultados obtidos nos experimentos executados em modo de reciclo total.

O experimento foi conduzido à temperatura de 27 ± 1 °C, iniciado após a compactação da membrana e com uma suspensão de microalgas na concentração de $0,9 \pm 0,1$ g L⁻¹. Nesta etapa foram determinados o fator de concentração volumétrico (FCV) através da Equação 2.5, o fluxo permeado através da Equação 3.1 e os dados de fluxo foram utilizados para avaliar os mecanismos de *fouling* através do modelo de Hermia modificado por Field.

Para a realização dos testes de concentração, o sistema foi preenchido com 0,25 L de solução que representa o volume morto (mangueiras e conexões do sistema). Em um recipiente de 2,0 L, foi adicionado 1,25 L de suspensão de microalgas totalizando um volume de 1,5 L. O fluxo permeado foi medido a cada 10 min e amostras de concentrado e permeado foram retiradas a cada hora para determinação da condutividade elétrica e do pH.

Para relacionar o valor da condutividade elétrica (mS cm⁻¹), em termos de concentração salina (g L⁻¹), foi construída uma curva padrão para os meios de *D. tertiolecta* e *Chlorella* sp.. Para tanto, foram preparadas diferentes concentrações do meio de cultura e medidas suas

respectivas condutividades elétricas. A equação linear permitiu correlação entre os valores de condutividade elétrica encontrados nos experimentos com sua respectiva concentração salina.

3.4.9 Experimento de MF para a purificação de biomassa - modo batelada combinado com modo diafiltração

Nos experimentos de purificação o modo batelada foi combinado com o modo diafiltração, o sistema foi operado de forma semelhante ao utilizado nos experimentos de concentração. Os experimentos de purificação envolvem três etapas: pré-concentração da suspensão algácea, seguida de duas diafiltrações e uma etapa de concentração final.

As diafiltrações foram executadas no modo batelada com adição de 250 mL de água destilada ao tanque de alimentação, desta forma, ocorre a permeação dos microsolutos e, conseqüentemente, resulta em uma diminuição da concentração salina do meio.

O fluxo permeado foi medido a cada 10 min e amostras do concentrado e permeado de todas as etapas foram retiradas para determinação de pH e condutividade elétrica.

3.4.10 Avaliação de reuso do permeado da MF como meio de cultivo

O objetivo desta etapa do estudo foi determinar a possibilidade de reuso do permeado retirado nos experimentos de concentração das microalgas como meio de cultivo para o crescimento das microalgas.

Os experimentos, descritos a seguir, foram realizados em duplicata para efeito de comparação. Em todos os experimentos as microalgas, com seus respectivos meios de cultivo, foram postos em Erlenmeyers de 500 mL.

Experimento 1: adição de 10 mL da cultura-mãe de banco de cultivo e 100 mL de meio de cultivo padrão estéril com todos os componentes listados no item 3.1. No caso do meio de cultivo padrão de *D. tertiolecta*, ocorreu o suplemento de 17 g L⁻¹ de NaCl. Este meio de cultivo foi denominado de meio padrão.

Experimento 2: adição de 10 mL da cultura-mãe de banco de cultivo e 100 mL de permeado com acréscimo de 300 mg L⁻¹ de nitrato de sódio, uma vez que este macronutriente é totalmente consumido no cultivo. Este meio de cultivo foi denominado permeado simples.

Experimento 3: adição de 10 mL da cultura-mãe de banco de cultivo e 100 mL de permeado com adição de 300 mg L⁻¹ de nitrato de sódio, além de todos os micronutrientes (1,0 mL L⁻¹ de solução de fosfato de sódio, 1,0 mL L⁻¹ de solução de silicato de sódio, 1,0 mL L⁻¹ de solução de solução de metais-traço e 1,0 mL L⁻¹ de solução de vitaminas). Este meio de cultivo foi denominado de permeado enriquecido.

Todos os meios de cultivo (padrão, permeado simples e permeado enriquecido com micronutrientes), foram autoclavados durante 15 min a 120 °C. Posteriormente, ocorreu a adição das soluções de micronutrientes para o meio padrão e o meio enriquecido.

Os frascos foram dispostos em estufa rotatória com iluminação de lâmpadas eletrônicas, totalizando $3,0 \pm 1,0$ klx, agitação de 16 rpm e temperatura de 28 ± 1 °C. O crescimento foi acompanhado por medida de densidade ótica da cultura, a 750 nm com espectrofotômetro AMERSHAM BIOSCIENCES modelo ULTROSPEC 3100 PRO. Alíquotas de aproximadamente 1,0 mL foram coletadas diariamente.

3.5 ANÁLISES

A microscopia ótica, a contagem em câmara de Neubauer e a microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas para avaliar a integridade celular das microalgas após os experimentos de MF; para efeito comparativo, amostras das duas microalgas foram avaliadas antes e após os experimentos. As medidas de condutividade elétrica e de pH foram realizadas durante os experimentos de concentração e de purificação. As medidas de viscosidade cinemática foram realizadas para auxiliar na escolha de parâmetros operacionais. A determinação de proteínas e de carboidratos está relacionada com a concentração de EPS, que é um parâmetro importante para avaliar a utilização do permeado recolhido dos experimentos de concentração como meio de cultivo para o crescimento das microalgas.

3.5.1 Microscopia ótica

A microscopia ótica é uma forma simples e eficaz de verificar a morfologia das microalgas. Através das imagens é possível observar o efeito dos parâmetros operacionais do sistema (velocidade tangencial, pressão transmembrana e taxa de cisalhamento) sobre a estrutura das microalgas, analisando as células que sofreram lise, mobilidade para a *D. tertiolecta* e a conformação celular para ambas as microalgas.

Amostras das microalgas, antes e depois dos ensaios de microfiltração, foram analisadas em lentes com aumento de 20×, 40× e 100× em microscópio óptico OLYMPOS, do Laboratório BiotechLab, do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da UFRGS.

3.5.2 Câmara Neubauer

As câmaras de contagem são instrumentos de precisão feitos de vidro óptico especial, que associadas a um microscópio, são utilizadas para determinar a concentração de células ou de outras partículas em suspensão em amostras líquidas através de contagem. Essas câmaras são frequentemente utilizadas para determinar a concentração de células do sangue e também concentrações de diversas amostras contendo bactérias, esporos de fungos e microalgas.

A Figura 3.6 mostra a câmara de contagem de Neubauer, utilizada neste trabalho. A câmara possui duas redes de quadrantes, a grelha (arranjo de quadrados de tamanhos diferentes) gravada sobre a câmara, tornando possível a contagem de células. A contagem é realizada tanto no quadrado central com mais divisões internas quanto nos quatro quadrados externos com menores subdivisões; estas divisões podem ser observadas na Figura 3.7. Uma lâmina de vidro é colocada sobre a amostra e precisa se manter no lugar a uma altura especificada (usualmente 0,1 mm).

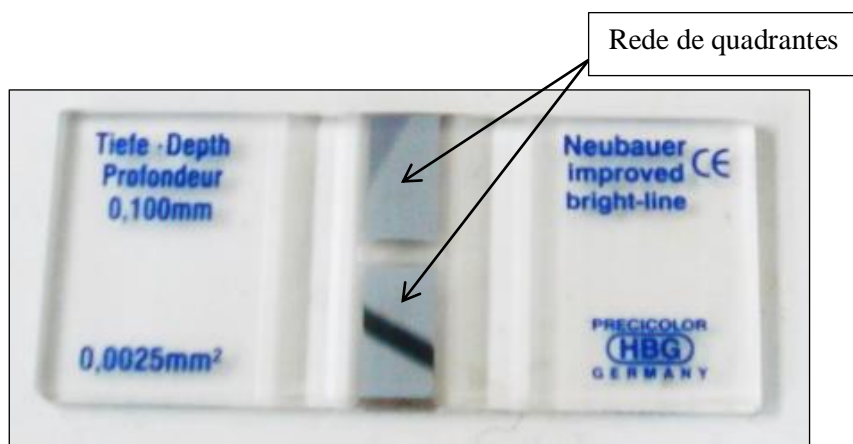


Figura 3.6 - Fotografia da câmara Neubauer.

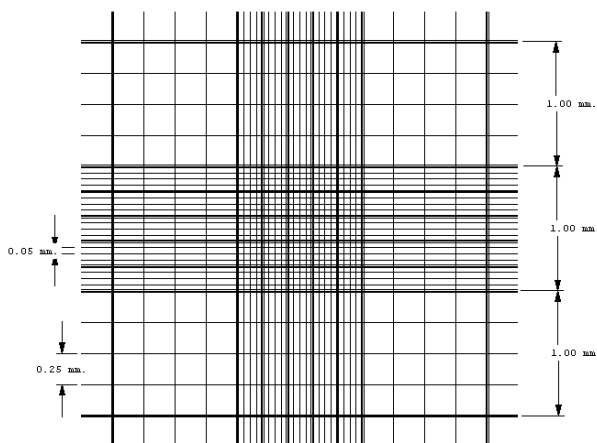


Figura 3.7 - Rede de quadrantes cravado na câmara Neubauer.

3.5.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão permite observar a estrutura intracelular dos microrganismos, sendo possível visualizar as organelas e até mesmo os produtos acumulados intracelulares. O preparo das amostras, que tiveram duração de uma semana, e as análises foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFRGS.

A imagens foram obtidas através de microscópio eletrônico de transmissão JEM modelo 120 EXII. Este equipamento se destina ao estudo de amostras orgânicas e inorgânicas e opera numa tensão entre 80 kV e 100 kV, com resolução para imagem de ponto de 0,45 nm, resolução de linha de 0,20 nm e faixa de magnificação entre 5 000× a 500 000×. O microscópio possui uma câmera CCD para aquisição de imagens e uma câmera para negativos.

3.5.4 Análise de condutividade elétrica

A medida de condutividade elétrica determina indiretamente a concentração de íons na solução, sendo possível observar a presença de substâncias com carga em amostras líquidas. Desta forma, foi possível observar a redução da concentração de íons na solução via associação com curva padrão de condutividade elétrica *versus* concentração salina nos meios de cultivo.

As medidas de condutividade elétrica foram realizadas em condutímetro DIGIMED DM-32, realizando-se leituras diretamente na amostra. O eletrodo utilizado é do tipo DMC-010M e $K = 1,0 \text{ cm}^{-1}$. O equipamento foi calibrado diariamente com solução padrão de condutividade elétrica de $1\,412 \mu\text{S cm}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, conforme instruções do fabricante.

3.5.5 Análise de pH

Os valores de pH foram realizados com fita indicadora de pH Neutralit (Merck/ faixa de 0 a 14 e precisão de 1,0) nas amostras de concentrado e permeado dos experimentos de concentração e nos experimentos de purificação da biomassa.

3.5.6 Determinação da viscosidade cinemática

A determinação da viscosidade cinemática foi realizada por viscosímetro capilar Schott Oswald para ambas as microalgas na concentração final do cultivo ($0,9 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$), temperatura específica dos experimentos de microfiltração (27 °C). O equipamento foi calibrado com água MiliQ antes de cada medida.

3.6 ANÁLISE DE EPS

As substâncias poliméricas extracelulares podem ser excretadas durante o cultivo e as microalgas podem até mesmo aumentar sua liberação em situação de estresse mecânico. Estes componentes podem estar agregados às células ou livres em solução. Essas substâncias são determinadas pelos métodos de Dubois e Lowry. Estes dois métodos estão brevemente descritos a seguir.

3.6.1 Determinação de Proteína total – método de Lowry

O princípio do método colorimétrico de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) baseia-se em uma mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente Folin-Ciocalteu), que sofre uma redução quando reage com proteínas, na presença do catalisador cobre (Cu^{2+}) e produz um composto com absorção máxima em 750 nm. O método foi utilizado para a determinação de proteínas totais no permeado de ambas microalgas obtido da etapa de concentração. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro UV Visível modelo T80 da PG, em cubetas de quartzo com 1,0 cm de caminho ótico.

3.6.2 Determinação de Carboidratos – método de Dubois

O método de Dubois (Dubois *et al.*, 1956) foi utilizado para a determinação das concentrações de carboidratos no permeado de ambas microalgas obtido da etapa de concentração. O método colorimétrico determina a concentração de açúcares e carboidratos através da reação com fenol em meio ácido. A complexação dos produtos formados com o fenol produz uma absorvância proporcional à quantidade de açúcares na amostra no comprimento de onda de 490 nm. A leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro UV Visível modelo T80 da PG em cubetas de quartzo com 1,0 cm de caminho ótico.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada nos experimentos em modo de reciclo total para comparação de médias dos valores de percentagem de *fouling* obtidos em diferentes velocidades tangenciais de ambas as suspensões de microalgas. Também foi utilizado para comparar as médias obtidas na viabilidade celular de ambas microalgas depois da passagem pelo sistema de MF sobre duas taxas de cisalhamento. O pacote estatístico do Excel foi utilizado para realização do teste *t*.

CAPÍTULO 4

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos nos três modos de operação da microfiltração (MF), com o objetivo de estudar a interação da suspensão com a membrana, a concentração e a purificação da biomassa. Primeiramente são descritos e discutidos os resultados obtidos dos cultivos de ambas as suspensões de microalgas e posteriormente os parâmetros operacionais dos experimentos em modo de reciclo total. Os itens seguintes abordam os experimentos em modo batelada para concentração e o modo diafiltração (DF) para a purificação das biomassas. Ao término são discutidos os resultados dos experimentos que avaliaram os fenômenos de *fouling* tanto em modo de reciclo total quanto em modo batelada, além dos experimentos sobre a viabilidade da utilização do permeado de ambas as microalgas como meio de cultivo.

4.1 RESULTADOS DO CULTIVO DAS MICROALGAS

Os cultivos das microalgas *Chlorella* sp. e *D. tertiolecta* foram realizados em fotobiorreatores *airlift* em modo batelada de operação. Ambas cresceram em meio de cultivo modificado Guillard “f1/2” com acréscimo de 300 mg L^{-1} de NaNO_3 para ambas as microalgas e um suplemento de 17 g L^{-1} de NaCl para a *D. tertiolecta*.

Os cultivos das microalgas operaram com intensidade luminosa de 17,5 klx e temperatura de 28 ± 1 °C e foram monitorados diariamente por densidade ótica a 750 nm e correlacionada com peso-seco. A Figura 4.1 mostra as curvas cinéticas obtidas durante o crescimento das microalgas utilizadas neste estudo.

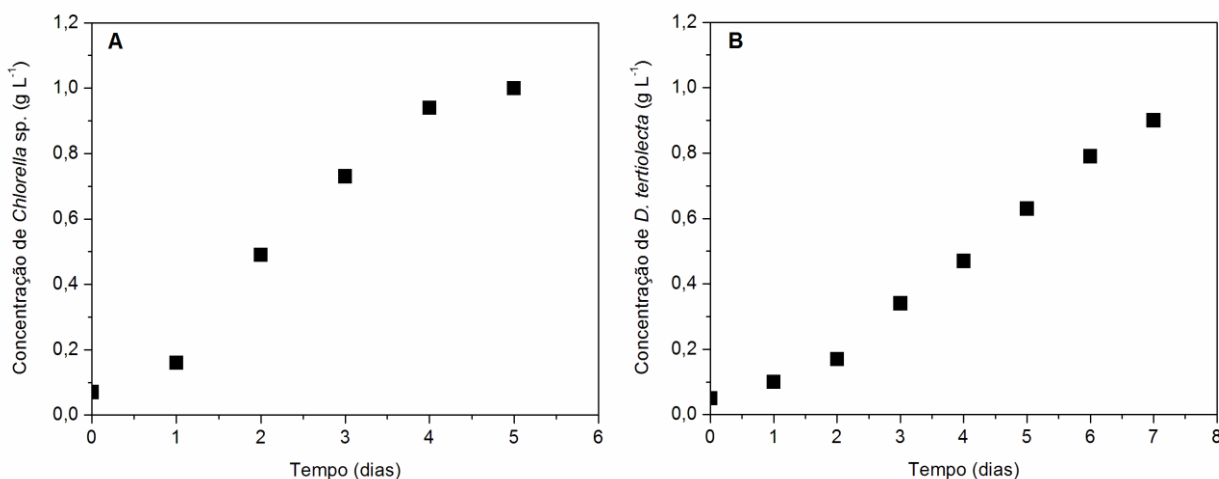


Figura 4.1 – Curvas cinéticas de *Chlorella* sp. (A) e *D. tertiolecta* (B). Condições de operação: meio de cultivo modificado Guillard “f1/2”, intensidade luminosa de 17,5 klx e temperatura de 28 ± 1 °C.

Neste trabalho, para efeito de avaliação dos experimentos de microfiltração, as microalgas *Chlorella* sp. e *D. tertiolecta* foram mantidas nos biorreatores até atingirem uma condição de início de estado estacionário, com uma concentração de biomassa de $0,9 \pm 0,1$ g L⁻¹. Para atingir esta concentração observa-se que o cultivo da microalga *D. tertiolecta* precisou de um maior tempo no biorreator (7 dias) em comparação com o cultivo da microalga *Chlorella* sp., que atingiu o valor desejado em 5 dias.

Ao término do cultivo em concentração de biomassa de $0,9 \pm 0,1$ g L⁻¹, pH igual a 7,0 e temperatura de 27 ± 1 °C as suspensões de microalgas foram utilizadas para a realização dos experimentos de microfiltração. Cabe ressaltar que todos os ensaios com o sistema de MF foram realizados em triplicata, sendo utilizadas membranas novas para cada experimento.

4.2 RESULTADOS DE COMPACTAÇÃO E PERMEÂNCIA HIDRÁULICA PARA A MEMBRANA DE MF

A etapa de compactação tem como objetivo realizar o adensamento das microestruturas da membrana. Dessa forma, erros de interpretação, quanto aos fenômenos de *fouling* que ocorrem durante a filtração da suspensão, são minimizados. O efeito da compactação pode ser acentuado em microfiltração, devido à estrutura mais aberta dessas membranas. As condições utilizadas para

a compactação das membranas de PVDF foram: água destilada em *PTM* de 4,5 bar e temperatura de 27 ± 1 °C em tempo médio de operação de 2,0 h. O fluxo permeado inicial foi de $2\,675 \pm 1\,913$ L m⁻² h⁻¹ e após duas horas foi reduzido em 90 %, resultando em um fluxo permeado médio igual a 261 ± 89 L m⁻² h⁻¹.

Após a compactação, determinou-se a permeância hidráulica inicial das membranas de MF com a passagem de água destilada na faixa de pressão de 0,1 bar até 1,0 bar. A permeância hidráulica média, representada pelo coeficiente angular da reta, foi igual a 78 ± 7 L m⁻² h⁻¹ bar⁻¹.

4.3 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS OPERACIONAIS

A determinação dos parâmetros operacionais para a realização dos experimentos de concentração e purificação das biomassas foi realizada levando-se em consideração as características da membrana e das suspensões de alimentação.

O estudo de parâmetros, como a pressão, a velocidade de escoamento tangencial e a temperatura, é importante, pois estes parâmetros influenciam o fluxo permeado, a seletividade e as interações membrana-suspensão. No caso específico de suspensões de microalgas, um cuidado extra que deve ser observado é em relação à velocidade tangencial, uma vez que esta influencia diretamente a taxa de cisalhamento.

Neste trabalho os experimentos de microfiltração para as suspensões de microalgas foram realizados na temperatura de 27 ± 1 °C, a fim de manter uma condição ideal para a manutenção da viabilidade celular das microalgas, uma vez que esta temperatura está próxima da temperatura de seu cultivo.

A seguir são apresentados e discutidos os resultados obtidos para definição dos parâmetros operacionais da microfiltração tangencial e o efeito destes sobre a estrutura celular das microalgas.

4.3.1 Taxa de cisalhamento e velocidade tangencial

As microalgas são sensíveis às forças cisalhantes, desta forma, taxas de cisalhamento não adequadas para um determinado tipo de microalga podem causar a liberação de EPS como forma de proteção física das microalgas e até mesmo provocar a lise celular, causando a perda de metabólitos intracelulares. Em processos de separação por membranas, a liberação de EPS tende a

agravar os fenômenos de *fouling*, afetando negativamente a eficiência da separação, visto que aumenta a resistência ao fluxo.

A escolha de uma equação adequada para a determinação da taxa de cisalhamento depende do número de Reynolds, o qual foi calculado para as duas velocidades tangenciais utilizadas, considerando-se a viscosidade cinemática das suspensões obtidas experimentalmente em condições de término de cultivo, concentração de $0,9 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$ e temperatura de $27 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, e o diâmetro hidráulico do módulo de membranas, como mostra a Equação 4.1.

$$Re = \frac{v d_h}{\nu} \quad (4.1)$$

onde: v é a velocidade tangencial (m s^{-1}), d_h é o diâmetro hidráulico (m) e ν é a viscosidade cinemática ($\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$).

Os valores obtidos para o número de Reynolds confirmaram o escoamento em regime laminar para todas as condições testadas, permitindo o uso da lei de Poiseuille (Equação 2.3) para determinação da taxa de cisalhamento. Na Tabela 4.1 estão apresentados os resultados obtidos destas variáveis para as duas microalgas estudadas.

Tabela 4.1 - Características hidrodinâmicas do escoamento das suspensões de microalgas: viscosidade cinemática, velocidade tangencial, diâmetro hidráulico, n° de Reynolds e taxa de cisalhamento.

Microalga	Viscosidade cinemática ($\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$)	Velocidade tangencial (m s^{-1})	Diâmetro hidráulico (m)	Número de Reynolds	Taxa de cisalhamento (s^{-1})
<i>Chlorella sp.</i>	$9,2 \times 10^{-7}$	0,6	$2,0 \times 10^{-3}$	1 318	4 800
		0,8		1 734	6 400
<i>D. tertiolecta</i>	$9,8 \times 10^{-7}$	0,6		1 238	4 800
		0,8		1 629	6 400

4.3.2 Pressão transmembrana (PTM)

A microfiltração tem como força motriz o potencial químico expresso em termos do gradiente de pressão, uma vez que os gradientes de concentração e de temperatura podem ser desprezados. Neste sentido, a *PTM* é um parâmetro que influencia diretamente o desempenho do processo. As membranas de microfiltração, geralmente, oferecem menos resistência ao fluxo do que as membranas utilizadas em processos de ultrafiltração, nanofiltração e osmose inversa, para os quais também é empregado o gradiente de pressão como força motriz, resultando em pressões de processo menores. Esta característica da microfiltração é uma vantagem para a recuperação de biomassa de microalgas, uma vez que determinadas espécies destes microrganismos são sensíveis a elevadas pressões, pois apresentam uma parede celular frágil.

Experimentos com a suspensão de microalgas em modo de reciclo total, permitem a determinação do fluxo crítico e do fluxo limite, que são influenciados pelas condições hidrodinâmicas do processo e pelas interações membrana suspensão.

Na escolha dos parâmetros operacionais *PTM* e velocidade tangencial os seguintes pontos foram considerados: comportamento do fluxo permeado em cada *PTM*, podendo ou não apresentar valores de fluxo crítico e de fluxo limite; integridade celular das microalgas frente à aplicação de duas taxas de cisalhamento e da pressão. O modo reciclo total garantiu a condição de estado estacionário. Os experimentos foram realizados com variação da *PTM* na faixa de 0,25 bar a 1,0 bar para *Chlorella* sp. e 0,15 bar a 1,0 bar para *D. tertiolecta*, concentração inicial de microalgas de $0,9 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$, pH igual a 7,0 e temperatura de operação de $27 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Na Figura 4.2 estão apresentados os fluxos permeados em função da *PTM* para duas velocidades de escoamento ($0,6 \text{ m s}^{-1}$ e $0,8 \text{ m s}^{-1}$); a Figura 4.2(A) apresenta os resultados para a suspensão de *Chlorella* sp. e a Figura 4.2(B) para a *D. tertiolecta*. Observa-se que para a suspensão de *Chlorella* sp. ocorreu um aumento linear do fluxo permeado com o aumento de pressão, para as duas velocidades tangenciais testadas; para a velocidade de $0,6 \text{ m s}^{-1}$ foram obtidos valores de fluxo permeado entre $15 \pm 1 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ e $34 \pm 2 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$; para a velocidade de $0,8 \text{ m s}^{-1}$, o fluxo foi ligeiramente superior com valores entre $19 \pm 2 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ e $43 \pm 3 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$.

A suspensão de *D. tertiolecta* apresentou um comportamento diferente para o fluxo permeado à medida que se aumentava a *PTM*. Neste caso foram observados os valores de fluxo crítico e de fluxo limite. Para a velocidade de $0,6 \text{ m s}^{-1}$ o valor de fluxo crítico foi igual a $20 \pm 2 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ observado entre 0,15 bar e 0,2 bar e o fluxo limite de $27 \pm 2 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ em 0,75 bar. Para a velocidade de $0,8 \text{ m s}^{-1}$ os valores de fluxo crítico ($19 \pm 2 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ entre 0,15 bar e 0,2 bar) e de fluxo limite ($31 \pm 1 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ em 0,75 bar) foram estatisticamente iguais aos obtidos para a velocidade de $0,6 \text{ m s}^{-1}$.

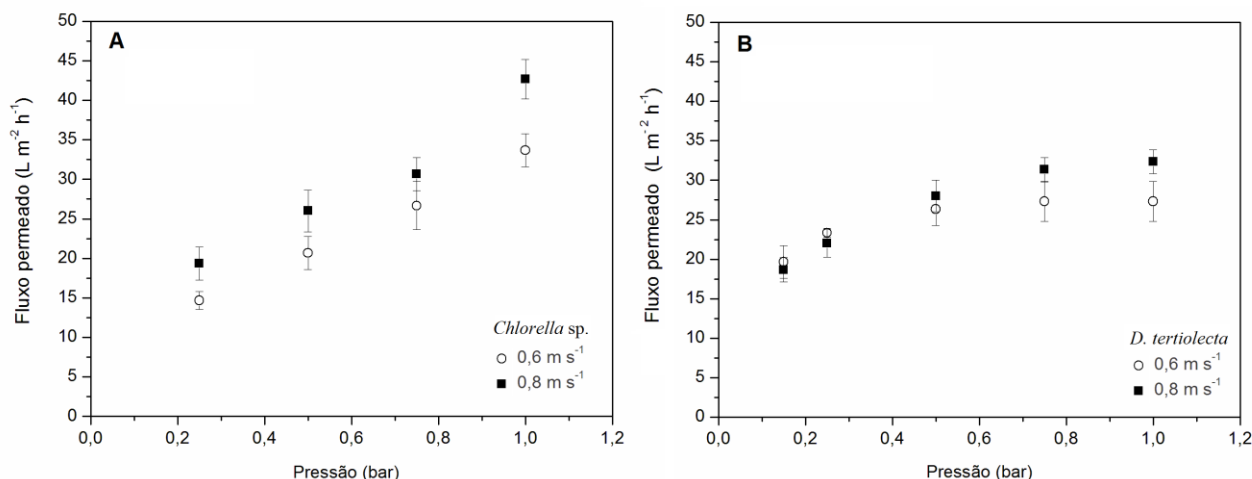


Figura 4.2 – Fluxo permeado em função da pressão transmembrana para duas velocidades de escoamento da corrente de alimentação ($0,6 m s^{-1}$ e $0,8 m s^{-1}$) para as suspensões de microalgas: (A) *Chlorella sp.* e (B) *D. tertiolecta*.

O fluxo crítico é o resultado do equilíbrio entre forças de arraste sobre o soluto e a interação do mesmo na superfície da membrana, o qual resulta na formação de uma camada limite. Observa-se que estes efeitos estão presentes para a *D. tertiolecta*, não sendo claramente observado na suspensão de *Chlorella sp.*.

Um aumento da velocidade tangencial de $0,6$ para $0,8 m s^{-1}$ não resultou em diferentes valores de fluxo limite para a suspensão de *D. tertiolecta*. O valor de fluxo limite representa o valor de fluxo permeado em que um aumento de pressão não resulta em um aumento do fluxo, nesta região a transferência de massa do processo é controlada pela difusão e, em processos de concentração, há uma elevada tendência ao *fouling*.

As diferenças no comportamento das duas microalgas em relação a parâmetros como fluxo crítico e fluxo limite podem ser atribuídas às características morfológicas de cada espécie, pois as condições operacionais do sistema de filtração foram as mesmas. A *Chlorella sp.* é uma microalga de geometria esférica, sem mobilidade, distinta da *D. tertiolecta* de geometria elipsoidal, com dois flagelos, portanto, com mobilidade. De acordo com a análise de microscopia ótica não foi observada a presença de células no permeado para as suspensões de microalgas, demonstrando desta forma a retenção total pela membrana.

O trabalho de Rossignol e colaboradores, (ROSSIGNOL *et al.*, 1999), apresenta um estudo de filtração de suspensões de duas espécies de microalgas, a *S. costatum* e a *Haslea ostrearia* utilizando membrana de PVDF com tamanho de poro nominal de $0,1 \mu m$. Os resultados obtidos para o fluxo permeado demonstraram a influência das características das espécies de microalgas filtradas, tais como a morfologia. Os autores observaram que a densidade de torta

depositada sobre a membrana foi maior para *H.ostrearia* do que para a *S. costatum*, que é uma microalga formadora de cadeia. Além disso, foi observado que para a suspensão de *H. ostrearia* com concentração de 40 mg L^{-1} (base seca) houve um pequeno aumento do fluxo permeado com o aumento da pressão e, em pressões maiores que 1,0 bar, o fluxo mostrou-se independente da pressão.

Giorno, Mazzei e Giorno (2013), utilizaram um módulo plano, com membrana de celulose regenerada de MMC de 100 kDa e área de permeação de $1,73 \times 10^{-2} \text{ m}^2$ para a ultrafiltração da microalga *Nannochloropsis*. Foi observado fluxo crítico igual a $24 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ em *PTM* de 0,2 bar e velocidade de $0,3 \text{ m s}^{-1}$, semelhante ao obtido neste trabalho.

No trabalho de Hung e Liu, 2006, foi utilizada uma membrana de PVDF de $0,22 \text{ }\mu\text{m}$, com a área de permeação de $4,0 \text{ cm}^2$, para filtração de *Chlorella* sp.. Os autores estudaram o efeito da *PTM* de 0,4 bar, 0,5 bar e 0,6 bar e velocidade tangencial de $0,43 \text{ m s}^{-1}$ em regime laminar e $0,84 \text{ m s}^{-1}$ em regime turbulento. O fluxo permeado inicial aumentou com a mudança de pressão de 0,4 bar ($1\ 609 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) para 0,5 bar ($2\ 153 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$). Entretanto na pressão de 0,6 bar o fluxo não aumentou, sendo igual a $2\ 131 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$. Este comportamento foi observado nos dois regimes de escoamento.

Ainda de acordo com o estudo de Hung e Liu, (2006), na *PTM* de 0,6 bar, sob condição de regime laminar, o fluxo permeado apresentou maior queda com o tempo. Nesta pressão a mudança de regime laminar para turbulento não alterou significativamente a queda do fluxo permeado. O fluxo permeado final dos autores também foi elevado, sendo igual a $306 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, $339 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ e $284 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ nas pressões de 0,4 bar, 0,5 bar e 0,6 bar, respectivamente. Deve-se ressaltar que os elevados valores de fluxo permeado obtidos no trabalho mencionado é em grande parte devido a baixa concentração de *Chlorella* sp. utilizada ($13,9 \text{ mg L}^{-1}$).

De acordo com os resultados obtidos nesta etapa do estudo, foi escolhida a *PTM* de 0,5 bar para a filtração de *Chlorella* sp. e de 0,15 bar para a *D. tertiolecta*. Optou-se pela operação dos experimentos de concentração em pressões baixas e no caso da suspensão de *D. tertiolecta* abaixo do fluxo crítico ($\sim 0,2$ bar), uma vez que para pressões acima do fluxo crítico existe uma tendência maior à ocorrência de *fouling*. Giorno, Mazzei e Giorno (2013), também reportam que a identificação do fluxo crítico permite identificar a máxima pressão transmembrana que pode ser utilizada para limitar a ocorrência de *fouling* irreversível.

Em relação à velocidade tangencial foi selecionada a velocidade de $0,6 \text{ m s}^{-1}$, pois se observa um pequeno aumento de fluxo em velocidade de $0,8 \text{ m s}^{-1}$ para a suspensão de *Chlorella* sp., em pressão de 0,5 bar, e para a suspensão de *D. tertiolecta*, o fluxo é muito semelhante nas duas velocidades tangenciais, na pressão de 0,15 bar. A operação em velocidade tangencial de

0,6 m s⁻¹ aplica uma menor taxa de cisalhamento (4 800 s⁻¹), evitando assim a maior liberação de EPS e lise celular. Além disso, operar o sistema de MF em baixa velocidade tangencial proporciona menor consumo energético.

4.3.3 Integridade celular

As condições de escoamento e a força motriz influenciam a integridade celular das microalgas, portanto faz-se necessária a avaliação desta integridade; neste trabalho foram realizadas três análises que, em conjunto, demonstram o efeito das condições de operação sobre as suspensões de microalgas: contagem em câmara Neubauer, microscopia ótica e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Estas análises foram realizadas em amostras processadas em modo de reciclo total (concentração celular constante) e auxiliaram na escolha da pressão transmembrana e da velocidade tangencial para as etapas posteriores deste trabalho.

- **Câmara Neubauer**

Na Figura 4.3 estão apresentados os resultados de contagem de células não viáveis para a suspensão de *Chlorella* sp. em dois momentos, ao término do cultivo e depois dos experimentos de MF, em diferentes taxas de cisalhamento.

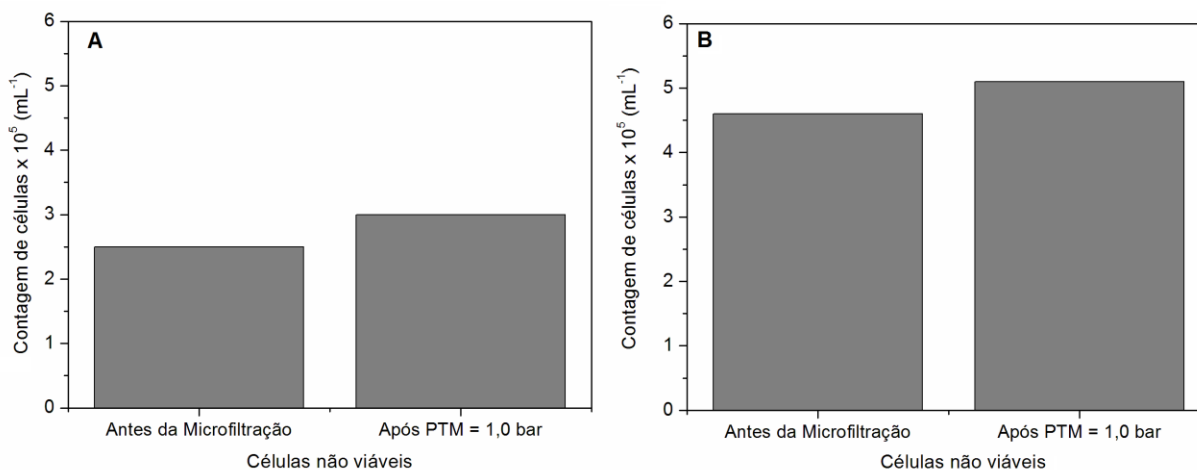


Figura 4.3 – Número de células não viáveis de *Chlorella* sp. (A) taxa de cisalhamento de 4 800 s⁻¹ (B) taxa de cisalhamento de 6 400 s⁻¹.

Conforme os resultados apresentado na Figura 4.3 observa-se que o número de células não viáveis antes da passagem pela membrana, ou seja, ao término do cultivo, é elevado, isto é consequência do comportamento das células durante o cultivo. De acordo com Lourenço (2006), é comum ocorrer a lise de células durante os cultivos em modo batelada.

Os valores médios de células não viáveis após a passagem pelo sistema de filtração em operação com uma faixa de pressão de 0,25 bar até 1,0 bar, não apresentaram diferença significativa quando comparados com os valores iniciais para as duas taxas de cisalhamento testadas ($p = 0,38$); após a operação na taxa de cisalhamento de $4\ 800\ \text{s}^{-1}$, referente à velocidade de $0,6\ \text{m}\ \text{s}^{-1}$, o número de células não viáveis apresentou valor igual a $(3,1 \pm 0,7) \times 10^5\ \text{mL}^{-1}$, sendo o valor inicial igual a $(2,5 \pm 0,7) \times 10^5\ \text{mL}^{-1}$. Para a taxa de cisalhamento de $6\ 400\ \text{s}^{-1}$, os valores de células não viáveis foram $(4,6 \pm 0,8) \times 10^5\ \text{mL}^{-1}$ antes dos experimentos e $(5,1 \pm 0,7) \times 10^5\ \text{mL}^{-1}$ depois dos experimentos.

Para a suspensão de *D. tertiolecta* foi necessário retirar amostras após a passagem pela primeira pressão de operação (0,15 bar), uma vez que resultados preliminares demonstraram elevada lise das células ao término dos experimentos. A Figura 4.4 apresenta os resultados encontrados através de contagem em câmara Neubauer para a microalga *D. tertiolecta*.

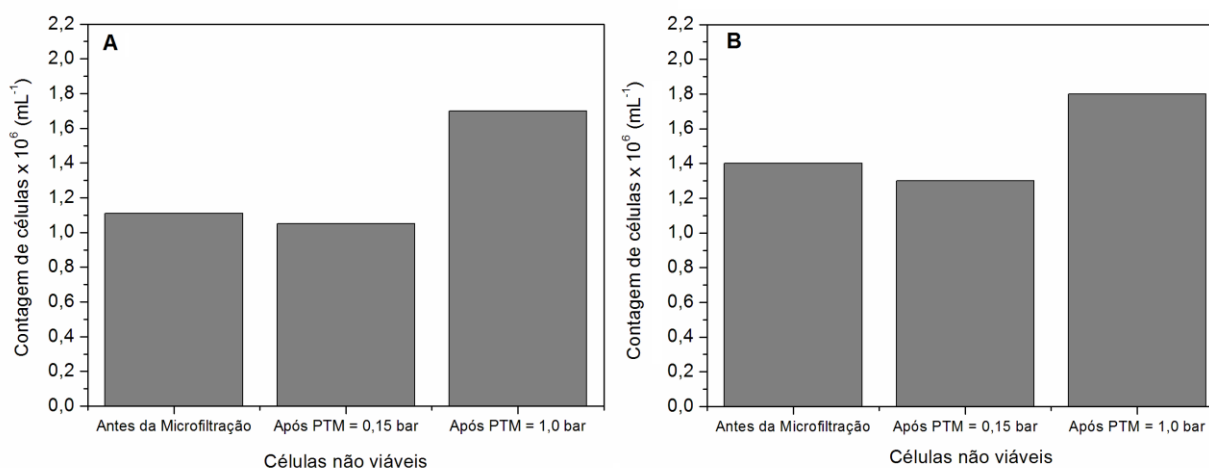


Figura 4.4 – Número de células não viáveis de *D. tertiolecta*: (A) taxa de cisalhamento de $4\ 800\ \text{s}^{-1}$ (B) taxa de cisalhamento de $6\ 400\ \text{s}^{-1}$.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 4.4(A), o número de células não viáveis inicial de *D. tertiolecta* foi igual a $(1,1 \pm 0,2) \times 10^6\ \text{mL}^{-1}$. Para a taxa de cisalhamento de $4\ 800\ \text{s}^{-1}$, o valor obtido foi de $(1,05 \pm 0,04) \times 10^6\ \text{mL}^{-1}$ para a pressão de 0,15 bar e no final do experimento aumentou para $(1,70 \pm 0,01) \times 10^6\ \text{mL}^{-1}$. Não houve diferença significativa entre as células não viáveis antes e depois do processo para a pressão de 0,15 bar ($p = 0,57$), contudo houve um aumento significativo nestas células após o processo a 1,0 bar ($p = 0,01$).

O mesmo comportamento é observado para a taxa de cisalhamento de $6\ 400\ \text{s}^{-1}$. A diferença foi significativa ao término do experimento ($p = 0,03$), porém não ocorreu diferença significativa para o valor de células não viáveis na primeira pressão de trabalho ($p = 0,72$). As seguintes concentrações de células não viáveis foram obtidas: antes do experimento

$(1,40 \pm 0,06) \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$, após a pressão de 0,15 bar o valor foi de $(1,30 \pm 0,08) \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ e ao final do experimento (pressão de 1,0 bar) o valor aumentou para $(1,80 \pm 0,03) \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$.

Vale ressaltar que pode existir um efeito combinado entre taxa de cisalhamento e tempo de operação, visto que a suspensão foi alimentada no sistema e para uma mesma taxa de cisalhamento variou-se a pressão de 0,15 bar até 1,0 bar. Além disso, para as condições experimentais deste trabalho a *Chlorella* sp. apresentou maior estabilidade do que a *D. tertiolecta*.

- **Microscopia ótica**

A estrutura celular da *Chlorella* sp. pode ser visualizada na Figura 4.5 em aumentos de resolução de 20×, 40× e 100× antes da passagem pelo sistema na Figura 4.5(a), após experimento na taxa de cisalhamento de $4\,800 \text{ s}^{-1}$ na Figura 4.5(b) e após experimento na taxa de cisalhamento de $6\,400 \text{ s}^{-1}$ na Figura 4.5(c).

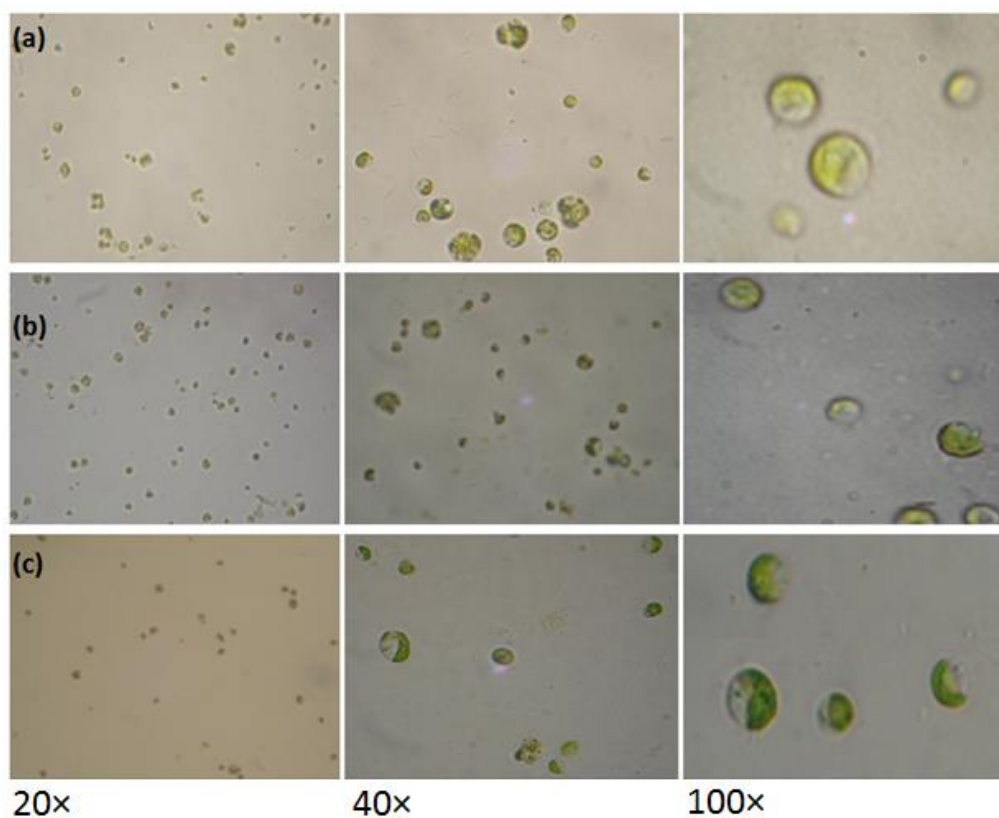


Figura 4.5 - Fotografia da estrutura de *Chlorella* sp. (a) antes da passagem pelo sistema de filtração (b) após experimento na taxa de cisalhamento de $4\,800 \text{ s}^{-1}$ e (c) após experimento na taxa de cisalhamento de $6\,400 \text{ s}^{-1}$.

Observa-se que a *Chlorella* sp. não apresentou diferença visual na sua estrutura celular após os experimentos de microfiltração para as duas taxas de cisalhamento e quatro pressões transmembranas (0,25 bar até 1,0 bar). Portanto, constata-se que esta microalga apresenta parede celular resistente a essas condições operacionais.

As imagens apresentadas na Figura 4.6 mostram o efeito das condições operacionais sobre a estrutura celular da *D. tertiolecta*.

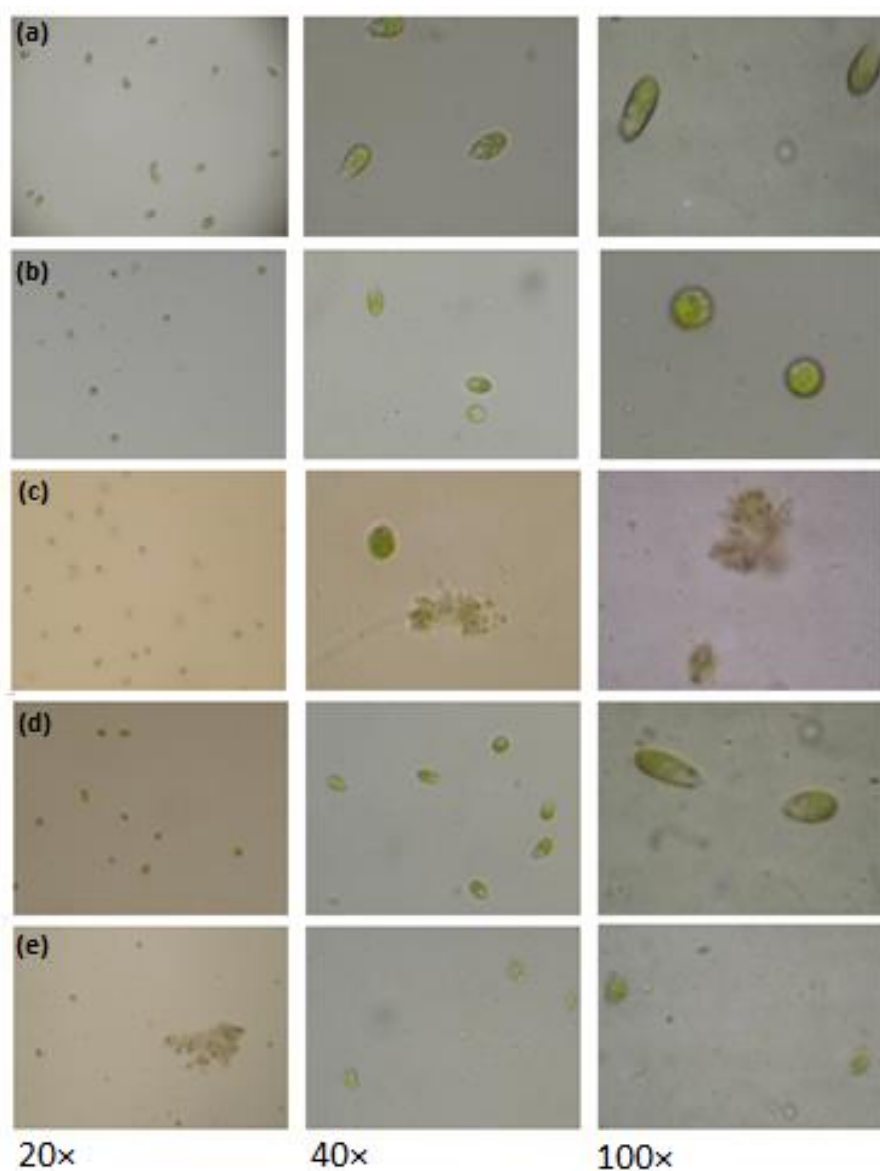


Figura 4.6 - Fotografia da estrutura de *D.tertiolecta*. (a) antes da passagem pelo sistema de filtração. Em taxa de cisalhamento de $4\ 800\ s^{-1}$: (b) Após *PTM* de 0,15 bar e (c) Após *PTM* de 1,0 bar. Em taxa de cisalhamento de $6\ 400\ s^{-1}$: (d) Após *PTM* de 0,15 bar e (e) Após *PTM* de 1,0 bar.

Conforme as imagens da Figura 4.6, verifica-se o efeito da taxa de cisalhamento, identificando-se o encolhimento das células e a completa ruptura celular. As fotografias apresentadas na Fig. 4.6(c) para os aumentos de 40x e 100x e na Fig. 4.6(e) para todos os aumentos mostram a ocorrência de lise das células.

A imagem da microalga *D. tertiolecta* na Figura 4.6 após experimento em pressão de 0,15 bar pode ser visualizada na Fig.4.6(b) na taxa de cisalhamento de $4\ 800\ s^{-1}$ e Fig.4.6(d) na taxa de $6\ 400\ s^{-1}$. Nestas condições, observa-se que não ocorreu elevada lise celular, mas é

possível observar uma deformação das células e que a mobilidade celular sofreu uma queda. Conforme já mencionado a literatura confirma que as células desta microalga não apresentam parede celular (LOSEVA *et al.*, 2007).

No estudo de Frappart *et al.*, (2011), foi utilizada uma taxa de cisalhamento igual a $16\ 000\ s^{-1}$ em dois sistemas de filtração (tangencial plano e dinâmico), com duas diatomáceas de morfologias diferentes, a *Skeletonema costatum* formadora de cadeias conectadas por sílica e a fusiforme *Cylindrotheca fusiformis*. Os autores observaram fragmentação da *S. costatum* após os experimentos de filtração, enquanto que a *C. fusiformis* não mostrou alteração celular visível.

- **Microscopia Eletrônica de Transmissão**

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é uma técnica que permite uma análise sobre a estrutura intracelular das microalgas. A MET demonstrou o efeito das condições de operação da MF sobre a conformação interna das células, mais especificamente, sobre as organelas. As Figuras 4.7 e 4.8 mostram as organelas de *Chlorella* sp. antes e após os experimentos de MF, respectivamente.

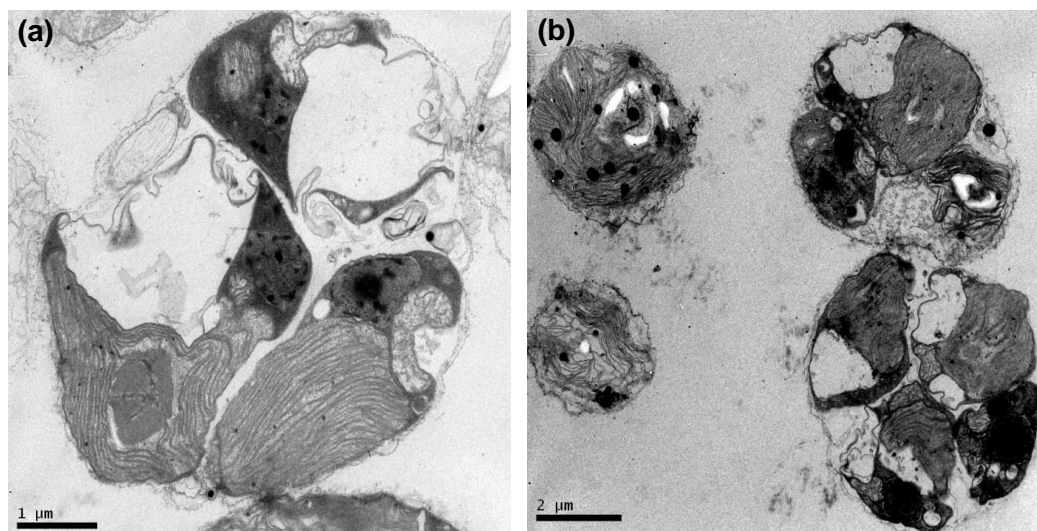


Figura 4.7 – Estrutura celular da *Chlorella* sp. antes dos experimentos de microfiltração, magnificação de (a) 20 000× (b) 10 000×.

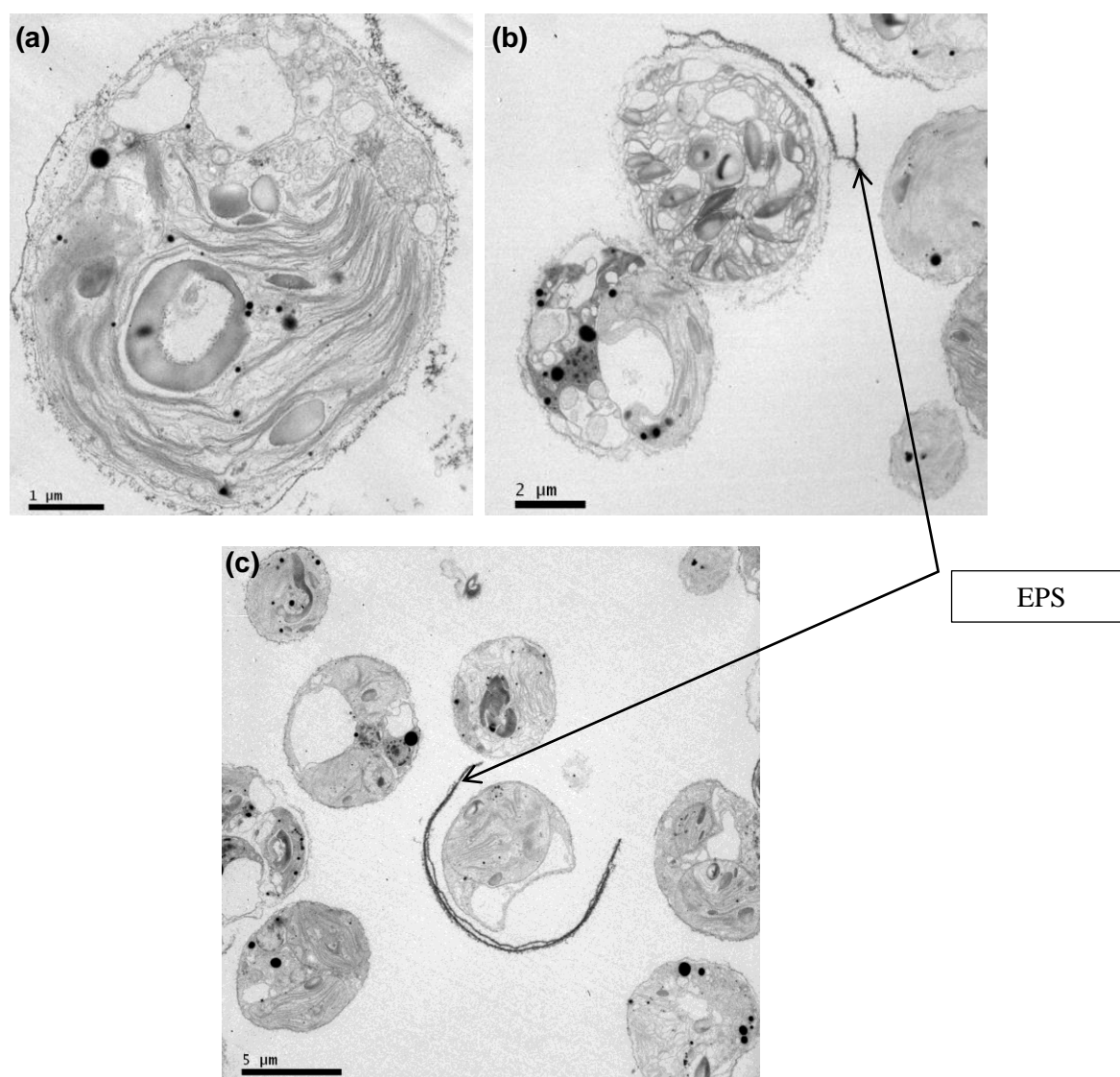


Figura 4.8 - Estrutura celular da *Chlorella* sp. após os experimentos de microfiltração, magnificação de (a) 20 000× (b) 7 500× (c) 5 000×.

As imagens da Figura 4.8 representam o efeito da taxa de cisalhamento sobre a estrutura interna da microalga *Chlorella* sp.. É possível constatar que as organelas não sofreram um efeito sobre a sua distribuição. Entretanto, algumas imagens da estrutura celular parecem evidenciar a liberação dos EPS, principalmente na imagem da Fig.4.8(c), com barra de 5,0 μm e magnificação de 5 000×, onde o EPS não solubilizado envolve a célula, efeito já identificado por Morineau-Thomas *et al.*, 2002.

Também é possível observar através das imagens das Figuras 4.7 e 4.8 as diferentes formas de organização das organelas nas células de *Chlorella* sp. e a diferença de tamanho das células.

Na Figura 4.9 está apresentada a estrutura celular da *D. tertiolecta* após o cultivo. Para esta microalga não foi possível obter imagens adequadas após os experimentos devido à lise celular já constatada pelas outras análises de integridade celular realizadas; também observa-se a diferença da estrutura celular de *D. tertiolecta* em relação à *Chlorella* sp. e a ausência de homogeneidade na geometria e na organização das organelas de *D. tertiolecta*.

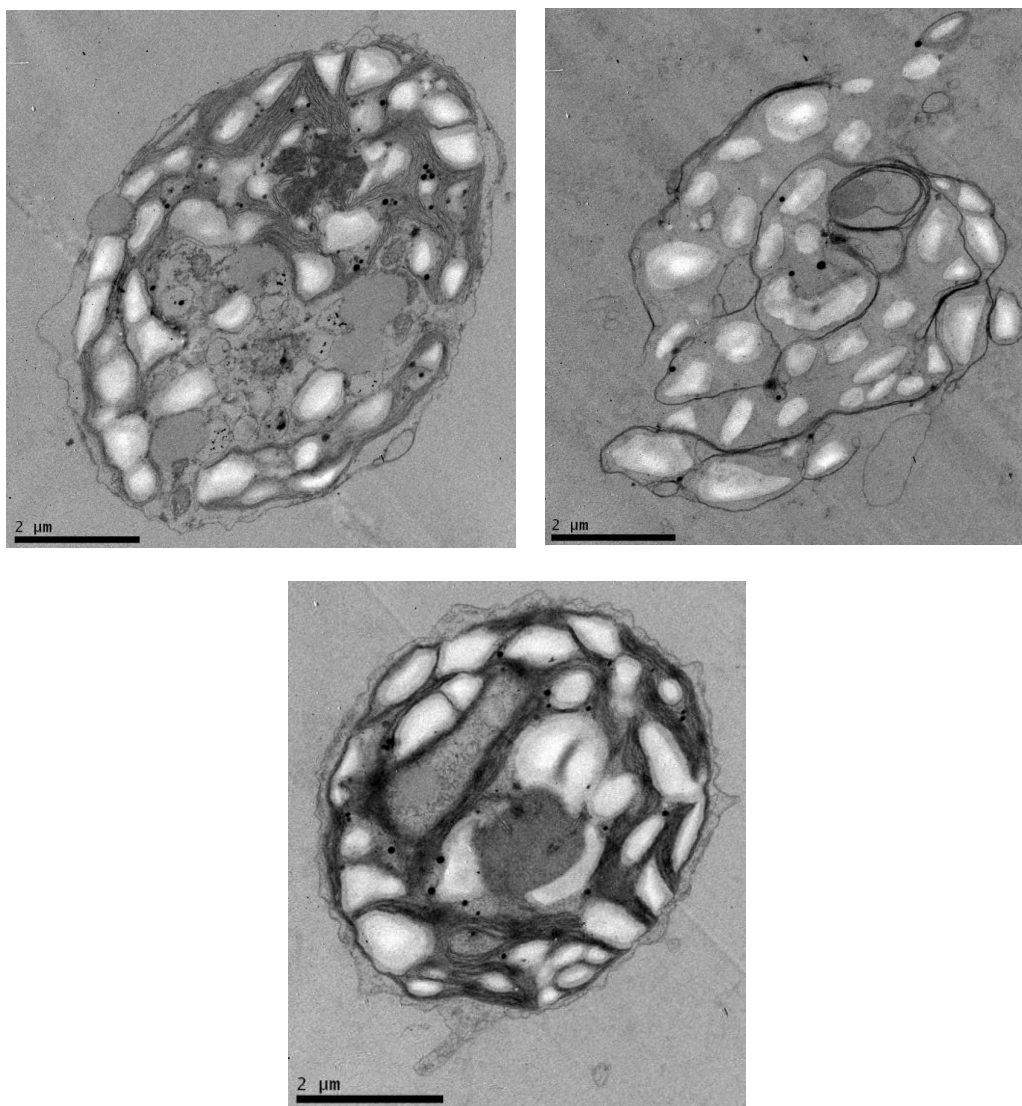


Figura 4.9 - Estrutura celular da *D. tertiolecta* (magnificação de 15 000×) antes dos experimentos de microfiltração.

4.4 CONCENTRAÇÃO -EXPERIMENTOS EM MODO BATELADA

Os experimentos desta etapa tiveram como objetivo a determinação do fator de concentração volumétrico (*FCV*) e a avaliação do comportamento do fluxo permeado com o tempo, em pressão transmembrana constante. As condições de operação foram definidas nos experimentos realizados no modo reciclo total e com as análises de integridade celular;

concentração inicial de biomassa de $0,9 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$, pH igual a 7,0, temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e velocidade de escoamento igual a $0,6 \text{ m s}^{-1}$ foram as condições utilizadas para as duas suspensões de microalgas. Foi utilizada a pressão transmembrana de 0,5 bar para a suspensão de *Chlorella* sp. e 0,15 bar para a suspensão de *D. tertiolecta*.

Na Figura 4.10 está apresentado o comportamento do fluxo permeado com o tempo de operação para cada suspensão de microalgas: Fig 4.10(A) *Chlorella* sp. e Fig 4.10(B) *D. tertiolecta*. Verifica-se que maiores valores de fluxo permeado são obtidos para a *Chlorella* sp. quando comparados com o fluxo de *D. tertiolecta*. Isso se deve, em parte, ao fato de se utilizar uma PTM maior para a espécie de *Chlorella* sp..

Os três experimentos com a suspensão de *Chlorella* sp. apresentaram comportamento semelhante de fluxo. Para os experimentos com a *D. tertiolecta* ocorreu uma leve diferença entre os experimentos realizados. Para este estudo estabeleceu-se um FCV em torno de 2,6, devido a limitações experimentais.

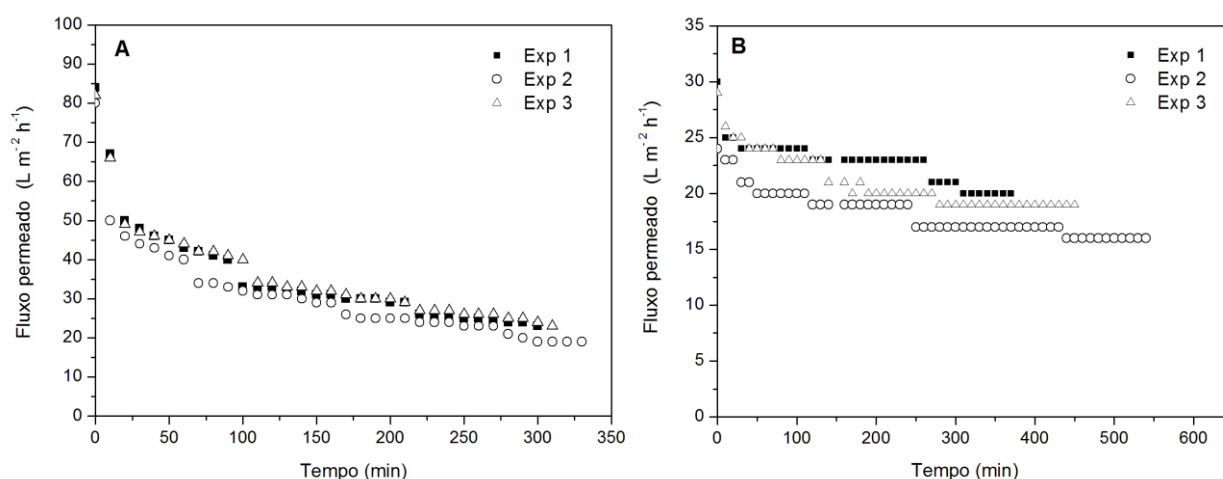


Figura 4.10 – Resultados do fluxo permeado em função do tempo de experimento. Condições de operação: modo batelada, velocidade tangencial de $0,6 \text{ m s}^{-1}$, temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, concentração de biomassa igual a $0,9 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$ e valor de pH igual a 7,0 (A) *Chlorella* sp., pressão de 0,5 bar e (B) *D. tertiolecta*, pressão de 0,15 bar.

A maior diferença entre os fluxos inicial e final para as duas suspensões de microalgas foi observada no início dos experimentos, onde ocorre a formação da camada limite de concentração e iniciam as interações membrana-suspensão. Esta diferença foi mais acentuada para os experimentos com *Chlorella* sp., a queda do fluxo é brusca para a suspensão desta microalga (74 %), quando comparada com a ocorrida com a suspensão de *D. tertiolecta* (40 %). Uma explicação para este resultado é que geralmente em membranas que apresentam fluxos e retenção elevados a resistência devido à camada limite de concentração formada também é elevada resultando em uma queda acentuada do fluxo inicial. Além disso, observa-se que o fluxo

permeado para a suspensão de *D. tertiolecta* foi mais estável do que o obtido para a suspensão de *Chlorella sp.*.

Neste trabalho, para a suspensão de *Chlorella sp.*, o último fluxo permeado medido para o primeiro, o segundo e o terceiro experimento foram iguais a $24 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, $19 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ e $25 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Entretanto, ao compararmos com a *D. tertiolecta*, observa-se a ocorrência de estado estacionário, com fluxos iguais a $20 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, $16 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ e $19 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ em cada experimento realizado. A comparação direta com outros trabalhos e entre as duas suspensões de microalgas utilizadas neste trabalho não é uma tarefa fácil devido às diferenças entre as características das membranas e das espécies envolvidas, bem como em relação às condições de operação utilizadas e às peculiaridades de cada unidade experimental. A discussão apresentada em relação a outros trabalhos tem o objetivo de relacionar as condições de operação utilizadas pelos autores evidenciando os resultados e as dificuldades encontradas pelos autores.

No trabalho de Frappart *et al.*, (2011), foi observada uma queda do fluxo permeado de 42 % para o processo de ultrafiltração da diatomácea *S. costatum*. Foi utilizada uma membrana de poliacrilonitrila (PAN) com MMC igual a 40 kDa, pressão de 1,0 bar e FCV igual a 3,0. O fluxo inicial foi de $60 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ e ao final do experimento atingiu o valor de $35 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$.

Rossignol *et al.*, (1999), também obtiveram uma elevada queda do fluxo permeado, de $200 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ para cerca de $50 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ durante 10 h de operação (75 %) na filtração de suspensões de duas espécies de microalgas, a *S. costatum* e a *H. ostrearia*. Os autores utilizaram membrana de PVDF de 0,1 μm e adotaram condições de baixa pressão transmembrana (0,5 bar) e baixa velocidade tangencial ($0,5 \text{ m s}^{-1}$) para minimizar os danos na estrutura celular. Os autores ainda salientam a possibilidade de utilizar tais condições operacionais em um sistema contínuo de fotobiorreator com membrana.

No trabalho apresentado por Giorno, Mazzei e Giorno (2013), foi realizada a filtração da microalga *Nannochloropsis* em concentração inicial de $20 \pm 2 \text{ mg mL}^{-1}$ de biomassa b.s. visando a obtenção de triglicerídeos na corrente de permeado. Os autores definiram um fator de concentração volumétrico igual a 5,0 e o experimento foi realizado em PTM de 0,2 bar e velocidade tangencial de $0,6 \text{ m s}^{-1}$, o processo iniciou com fluxo permeado de $25 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ e após 3,5 h de operação, ficou estabilizado em $17 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$.

Hwang *et al.*, (2013), realizaram a filtração de uma suspensão com a microalga *Chlorella sp.* utilizando duas membranas de microfiltração, uma de PVDF com 0,45 μm de tamanho de poro nominal e outra também de PVDF com 0,22 μm de tamanho de poro nominal; as condições de pressão e velocidade tangencial foram de 200 kPa e $1,0 \text{ m s}^{-1}$, respectivamente. Os resultados

de fluxo permeado demonstraram uma queda acentuada de 80 % para a membrana de 0,45 μm e de 85 % para a de 0,22 μm .

Vale ressaltar que a maioria dos trabalhos mencionados utilizaram baixas concentrações iniciais de biomassa, condição que torna o procedimento mais eficaz permitindo a obtenção de um fluxo maior no estado estacionário (BUETEHORN *et al.*, 2010). Este fato é relatado no trabalho de Rossi *et al.*, (2004), em que foi realizada a ultrafiltração de uma suspensão de *Arthrospira platensis* utilizando uma membrana de poliacrilonitrila (PAN) com MMC de 40 kDa. Os autores utilizaram diferentes concentrações iniciais de biomassa, sendo que para a concentração de 0,45 g L^{-1} o fluxo foi estabelecido em 33 $\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1}$ em aproximadamente 13 h de operação. Porém, em concentração inicial semelhante a este trabalho ($0,9 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$) o fluxo estacionário foi estabelecido em 15 $\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1}$ após aproximadamente 10 h de operação.

No estudo realizado por Huang *et al.*, (2012) também foram testadas diferentes concentrações iniciais de biomassa e os autores concluíram que uma alta concentração inicial resulta em uma baixa eficiência para recuperação de biomassa; a membrana utilizada foi de PVDF com 0,2 μm de tamanho de poro nominal, – na configuração fibras ocas. O fluxo permeado médio obtido foi de 8,0 $\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1}$, e os autores relatam que não foi realizada retrolavagem durante os experimentos.

Conforme Rossingol *et al.*, (1999), em operações de longa duração, com baixa *PTM* e baixa velocidade tangencial (condições suaves para espécies sensíveis às forças cisalhantes), os fluxos do processo de ultrafiltração situam-se entre 15 $\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1}$ e 60 $\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1}$, sendo comumente utilizados em instalações industriais com aplicações biotecnológicas, como por exemplo, no ramo alimentício e farmacêutico. Neste trabalho, para as duas suspensões de microalgas testadas, foram alcançados fluxos na região de estado estacionário ou próximo ao estado estacionário na mesma faixa relatada pelos autores.

Rossi *et al.*, (2004), relatam que a qualidade da biomassa é preservada se a tensão de cisalhamento for examinada em conjunto com o tempo de experimento. Os autores concluem que fluxos permeados entre 15 $\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1}$ e 33 $\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1}$ são aceitáveis. Porém em experimentos de longa duração, ocorre maior liberação de material intracelular e, conseqüentemente, a queda do fluxo é mais acentuada. Este fenômeno é principalmente observado se o microrganismo em questão é sensível à taxa de cisalhamento aplicada.

Em relação à condutividade elétrica, este parâmetro apresentou o mesmo valor nas correntes de concentrado e permeado para as duas suspensões de microalgas utilizadas, confirmando a livre passagem dos compostos iônicos pela membrana de MF. Devido à adição extra de 17 g L^{-1} de NaCl no meio de cultivo da *D. tertiolecta* esta suspensão apresentou uma

quantidade maior de íons presentes (47 mS cm^{-1}) em relação à suspensão de *Chlorella* sp. (33 mS cm^{-1}).

O acompanhamento do valor de pH durante os experimentos permite observar o comportamento das microalgas, revelando algum tipo de reação ou até mesmo a degradação da suspensão, além de ser um parâmetro importante como medida de precaução em relação à faixa de pH permitida pelas membranas. O pH nas correntes de concentrado e permeado foi igual a 7,0 para as duas suspensões estudadas e este valor manteve-se constante durante o tempo de operação do sistema.

Nos experimentos de concentração foram analisadas tanto as correntes de concentrado quanto as de permeado. O permeado de ambas as microalgas foi recolhido para avaliar o seu reuso como meio de cultivo das microalgas. Desta forma, foram quantificados os carboidratos totais (método de Dubois) e as proteínas totais (método de Lowry). Os resultados estão apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Resultados da análise de carboidratos totais, proteínas totais e condutividade elétrica do permeado de *Chlorella* sp. e de *D. tertiolecta*.

Permeado	Carboidratos totais (mg L^{-1})	Proteínas totais (mg L^{-1})	Condutividade elétrica (mS cm^{-1})
Permeado de <i>Chlorella</i> sp.	14 ± 1	55 ± 4	33
Permeado de <i>D. tertiolecta</i>	33 ± 4	71 ± 4	47

Os valores obtidos de carboidratos e proteínas apresentados na Tabela 4.2 no permeado da suspensão de *D. tertiolecta* são mais elevados do que no permeado de *Chlorella* sp., confirmando os resultados de maior lise celular para *D. tertiolecta* e a liberação de EPS solúvel para a corrente de permeado. Este efeito é devido aos seguintes fatores: aplicação das forças cisalhantes do processo de separação combinado com o tempo de experimento e a ausência de parede celular em células de *D. tertiolecta*.

4.5 PURIFICAÇÃO DA BIOMASSA – EXPERIMENTOS EM MODO BATELADA COMBINADO COM MODO DIAFILTRAÇÃO

Nesta etapa do trabalho os experimentos foram realizados visando à purificação da biomassa através de redução do teor salino e de outros microsolutos presentes na solução. Para tanto, foi adotada a seguinte estratégia: primeiramente a suspensão de microalgas foi pré-concentrada retirando um volume inicial de solução de 500 mL dos 1 500 mL iniciais (volume do tanque de alimentação + volume morto), seguido de duas diafiltrações (DF) modo batelada com a

adição de 250 mL de água destilada na alimentação e retirada de mesmo volume pela corrente de permeado, seguida da etapa de concentração final. Para a suspensão de *Chlorella* sp. foram retirados, em média, $1\,348 \pm 24$ mL de permeado e para a *D. tertiolecta*, $1\,342 \pm 13$ mL.

As condições de operação nesta etapa foram idênticas às utilizadas nos experimentos de concentração: concentração de biomassa de $0,9 \pm 0,1$ g L⁻¹, o pH igual a 7,0, a temperatura de 27 ± 1 °C e a velocidade de escoamento igual a $0,6$ m s⁻¹, a pressão transmembrana de 0,5 bar para a suspensão de *Chlorella* sp. e de 0,15 bar para a suspensão de *D. tertiolecta*.. Na Figura 4.11 estão apresentados os resultados de fluxo permeado nas etapas de concentração inicial, diafiltração e concentração final; as curvas para os três experimentos com a suspensão de *Chlorella* sp. são semelhantes com valores próximos de fluxo permeado.

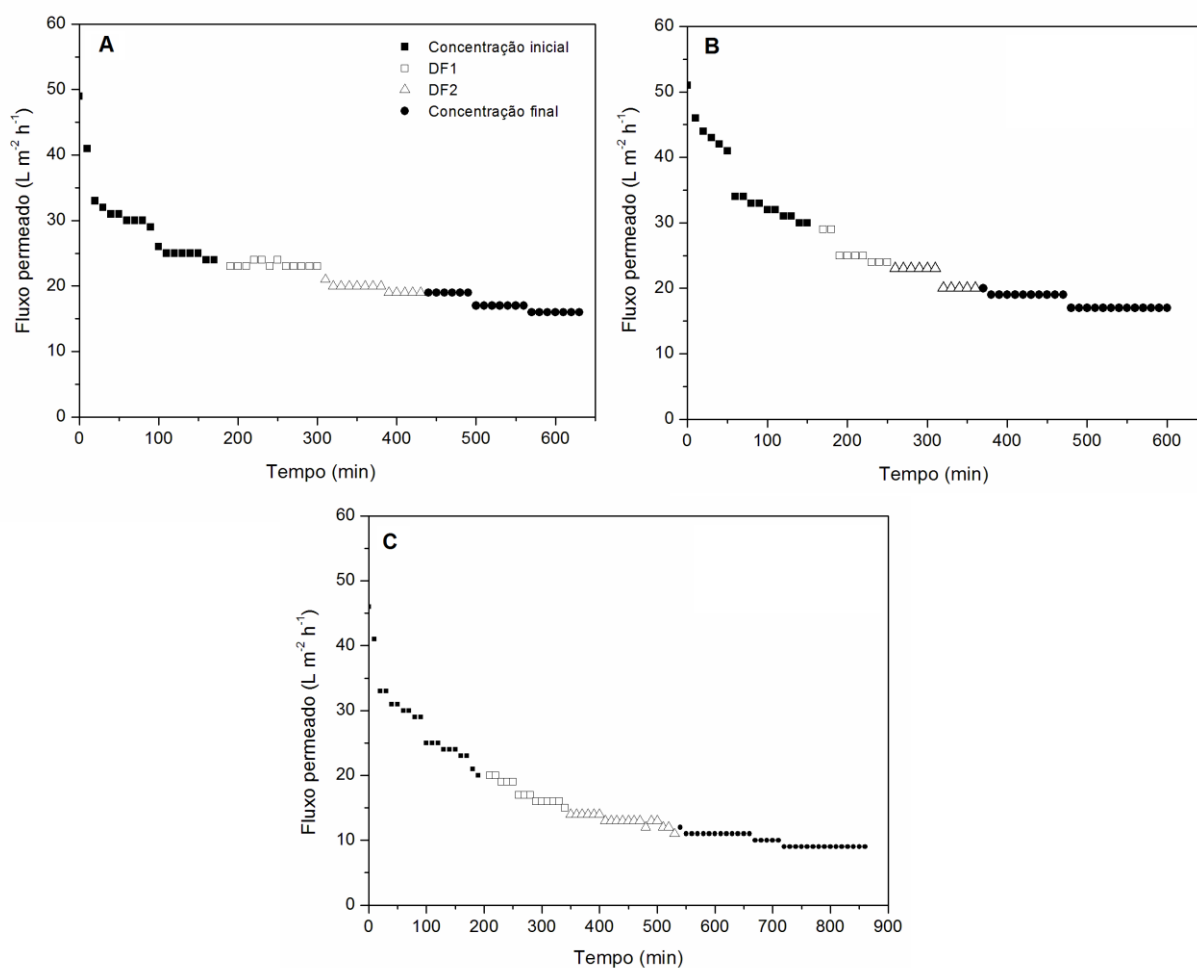


Figura 4.11 - Fluxo de permeado em função do tempo para os experimentos de concentração e purificação da biomassa de *Chlorella* sp. Condições de operação: concentração inicial de biomassa de $0,9 \pm 0,1$ g L⁻¹, o pH igual a 7,0, a temperatura de 27 ± 1 °C e a velocidade de escoamento igual a $0,6$ m s⁻¹, a *PTM* de 0,5 bar (A) primeiro experimento, (B) segundo experimento e (C) terceiro experimento.

Na Tabela 4.3 estão apresentados os valores de fluxo permeado inicial e final para cada etapa do experimento, e a redução de fluxo médio dos três experimentos para cada etapa. Observa-se que na etapa de concentração inicial ocorreu a maior redução de fluxo demonstrando que existe uma forte interação entre a membrana e a suspensão. Além disso, para se atingir o mesmo *FCV*, o tempo de operação para o terceiro experimento (860 min) foi maior do que o tempo para os experimentos 1 e 2, e conseqüentemente o fluxo final foi mais baixo, ressalta-se que o fluxo inicial para os três experimentos foi semelhante.

Tabela 4.3 – Valores de fluxo permeado inicial e final para cada etapa de concentração e purificação da suspensão de *Chlorella* sp. e o percentual médio de redução do fluxo para os três experimentos.

Etapa	Estágio	Fluxo	Fluxo	Fluxo	Redução média do fluxo (%)
		(L m ⁻² h ⁻¹) Primeiro Experimento	(L m ⁻² h ⁻¹) Segundo Experimento	(L m ⁻² h ⁻¹) Terceiro Experimento	
Concentração inicial	Início	49	51	46	51
	Fim	24	30	20	
Primeira DF	Início	23	20	20	21
	Fim	24	20	15	
Segunda DF	Início	21	23	14	11
	Fim	19	20	11	
Concentração final	Início	19	20	12	15
	Fim	16	17	9	

A redução global do fluxo para os experimentos 1 e 2 foi de 67 %, enquanto que para o experimento 3 a redução foi de 80 %. Conforme mencionado no início do capítulo, foram utilizadas membranas novas para a realização de cada experimento, que pode explicar em parte este resultado. As membranas de MF utilizadas são assimétricas e podem apresentar características estruturais distintas quando são utilizadas pequenas áreas de permeação como no caso deste trabalho (0,0058 m²).

Além disso, o fato de se trabalhar com soluções biológicas, que apresentam comportamentos distintos frente à sua forma de cultivo, tais como alterações no número de células viáveis e não viáveis e mudança no tipo e quantidade de metabólito liberado, também pode estar contribuindo para as diferenças obtidas nos valores de fluxo permeado entre os três experimentos.

O comportamento do fluxo permeado da suspensão de *D. tertiolecta* com o tempo em cada etapa do experimento está apresentado na Figura 4.12. Observa-se que houve maior queda de fluxo na etapa de concentração inicial para os três experimentos, e ocorre uma pequena diferença no fluxo durante as duas DF realizadas e na concentração final. No primeiro experimento (Fig.4.12(A)), o fluxo manteve-se constante a partir dos 100 min de operação e ocorreu uma redução na etapa de concentração final; para o segundo (Fig.4.12(B)) e o terceiro

(Fig.4.12(C)) ocorreu uma diminuição mais acentuada do fluxo na etapa de concentração inicial e uma pequena diminuição durante as etapas de DF e de concentração final.

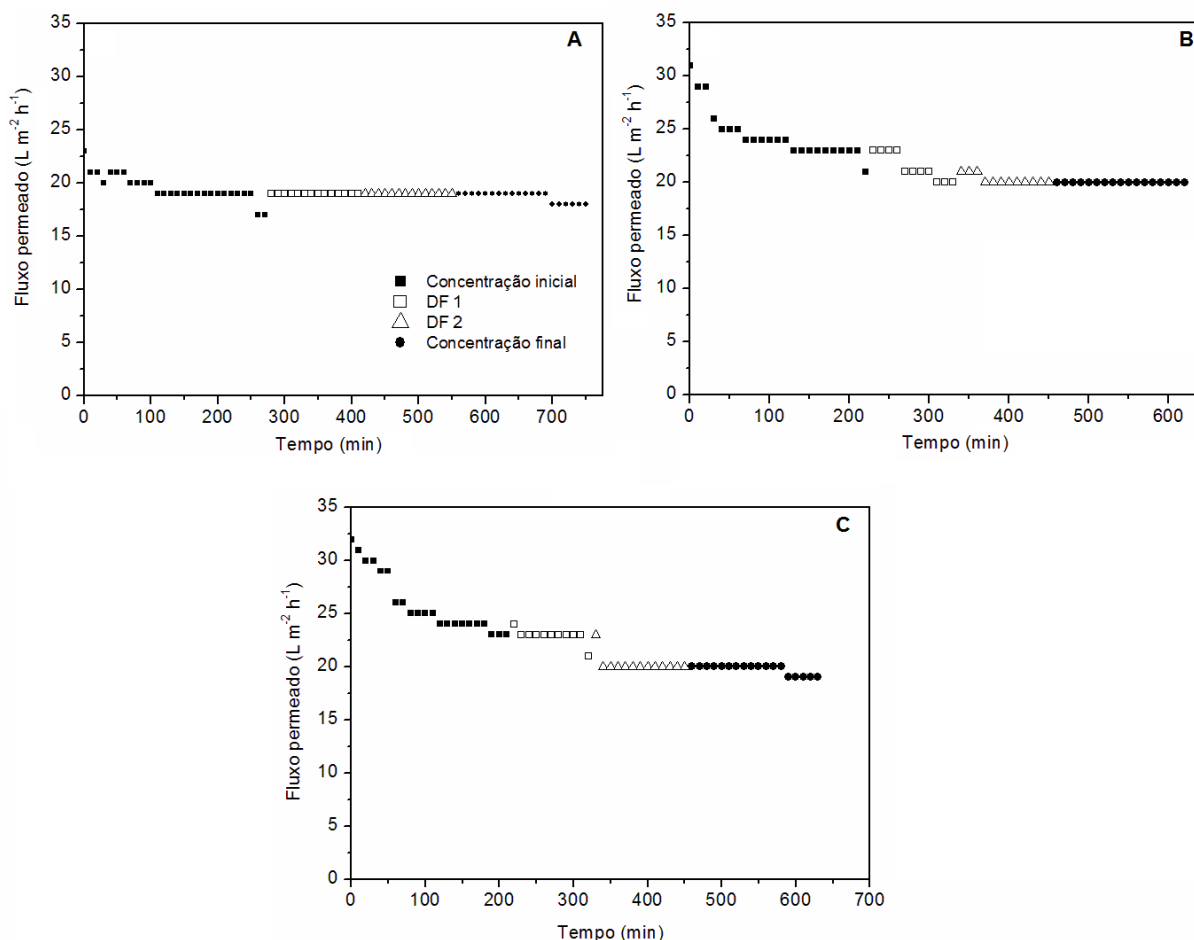


Figura 4.12 – Fluxo de permeado em função do tempo para os experimentos de concentração e purificação da biomassa de *D. tertiolecta*. Condições de operação: concentração inicial de biomassa de $0,9 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$, o pH igual a 7,0, a temperatura de $27 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ e a velocidade de escoamento igual a $0,6 \text{ m s}^{-1}$, a PTM de 0,15 bar (A) primeiro experimento, (B) segundo experimento e (C) terceiro experimento.

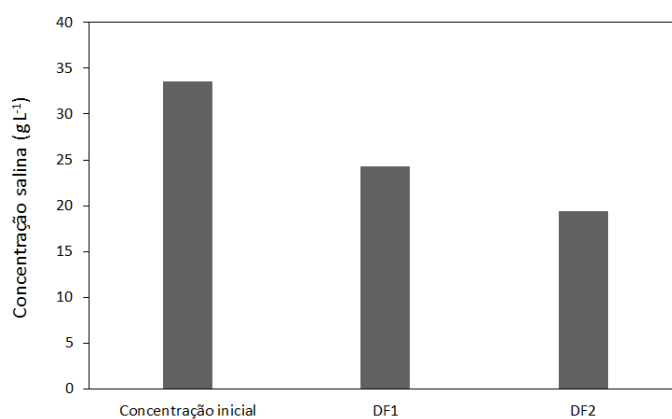
A Tabela 4.4, apresenta os valores de fluxo inicial e final de cada etapa para os três experimentos com a suspensão *D. tertiolecta* e a respectiva queda média do fluxo; observa-se que a queda de fluxo nas etapas de diafiltração e concentração final é pequena. As diferenças entre os experimentos se devem também às características das membranas e da suspensão de microalgas.

A comparação do comportamento do fluxo permeado para as duas suspensões de microalgas mostra que a redução média do fluxo para a *D. tertiolecta* é menor do que a observada para a *Chlorella* sp.. Este resultado demonstra que a suspensão de *D. tertiolecta* apresenta uma menor tendência ao *fouling*. Contudo, deve-se considerar que como a PTM utilizada para a suspensão de *Chlorella* sp. foi maior (0,5 bar) e a retenção é elevada, ocorre um maior acúmulo de soluto próximo à superfície da membrana que, por sua vez, aumenta a tendência ao *fouling*.

Tabela 4.4 – Valores de fluxo permeado inicial e final para cada etapa de concentração e purificação da suspensão de *D. tertiolecta* e o percentual médio de redução do fluxo para os três experimentos.

Etapa	Estágio	Fluxo	Fluxo	Fluxo	Redução média do fluxo (%)
		(L m ⁻² h ⁻¹) Primeiro Experimento	(L m ⁻² h ⁻¹) Segundo Experimento	(L m ⁻² h ⁻¹) Terceiro Experimento	
Concentração inicial	Início	23	31	32	29
	Fim	17	21	23	
DF1	Início	19	23	24	9
	Fim	19	20	21	
DF2	Início	19	21	23	6
	Fim	19	20	20	
Concentração Final	Início	19	20	20	3
	Fim	18	20	19	

A etapa de diafiltração foi responsável pela diminuição do teor salino das duas suspensões de microalgas. Para a microalga *Chlorella* sp., as duas diafiltrações reduziram o teor salino em 42 %; na Figura 4.13 estão apresentados os resultados de concentração salina inicial e após as duas diafiltrações. A concentração salina inicial foi igual a 34 g L⁻¹ e, ao final da segunda diafiltração, o valor foi reduzido para 19 g L⁻¹.

**Figura 4.13** - Concentração salina inicial e após as duas etapas de diafiltração para a suspensão de *Chlorella* sp..

Os resultados da mudança no teor salino da solução de *D. tertiolecta* podem ser visualizados na Figura 4.14. A concentração inicial desta suspensão é maior, sendo igual a 39 g L⁻¹

¹ e ao término da segunda DF a concentração foi de 24 g L⁻¹, alcançando-se uma redução de 38 %.

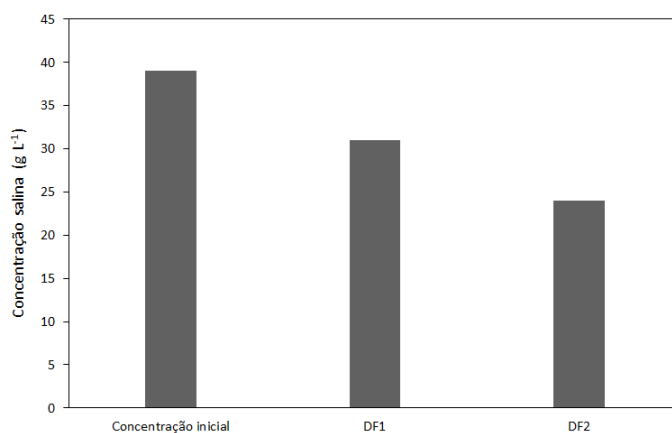


Figura 4.14 - Concentração salina inicial e após as duas etapas de diafiltração para a suspensão de *D. tertiolecta*.

O pH durante os três experimentos manteve-se constante, com valor igual a 7,0 tanto para amostras de concentrado e permeado para as duas suspensões de microalgas.

A literatura ainda é escassa quanto aos métodos de purificação de biomassa de microalgas. No trabalho apresentado por Vandanjon *et al.*, (1999), foi utilizada a diafiltração para redução do teor de sal de um metabólito proveniente de uma microalga, entretanto não foi realizada a purificação da suspensão algácea antes da extração do metabólito.

No caso de suspensões de microalgas, o permeado obtido em cada etapa de DF, difere no teor salino da solução inicial, pois ocorre a diluição. Dessa forma, a corrente de permeado apresenta potencial de reuso como meio de cultivo para outras espécies, pois fornece uma quantidade de íons que pode ser ajustada de acordo com as necessidades de determinadas espécies de microalgas. Este é um conceito de processo otimizado em que as correntes geradas apresentam a possibilidade de usos distintos de processamento. Neste contexto, a diafiltração apresenta-se como um interessante modo de operação dentro de um conceito otimizado de biorrefinarias.

4.6 ANÁLISE DO *FOULING*

Esta seção é dedicada à análise do fenômeno de *fouling*, que em conjunto com a polarização por concentração apresenta-se como a principal desvantagem dos processos de separação por membranas, porque ambos são responsáveis pela contínua queda do fluxo

permeado, devido ao aumento da resistência ao fluxo, e, como consequência, a diminuição da eficiência global do processo. A análise do *fouling* auxilia no entendimento das interações entre a membrana e as suspensões de microalgas.

Para a determinação da resistência ao fluxo devido ao *fouling* e do percentual de *fouling* em diferentes condições de pressão e de velocidade tangencial foram utilizados os resultados de fluxo de água destilada obtidos nos experimentos realizados no modo reciclo total; para investigar a ocorrência de um determinado mecanismo dominante de *fouling* durante a filtração das suspensões de microalgas foi aplicado o modelo de Hermia modificado por Field utilizando os resultados de fluxo permeado obtidos nos experimentos de concentração, modo batelada.

4.6.1 Percentual de *fouling*

Para analisar o percentual de *fouling* em função da pressão e da velocidade de escoamento foi medido o fluxo de água destilada e determinada a permeância hidráulica antes e após a passagem das suspensões de microalgas no sistema em modo reciclo total.

A Figura 4.15 apresenta o fluxo permeado de água destilada obtido em função da pressão aplicada antes e após o experimento com a suspensão de *Chlorella* sp. para as duas velocidades tangenciais ($0,6 \text{ m s}^{-1}$ e $0,8 \text{ m s}^{-1}$).

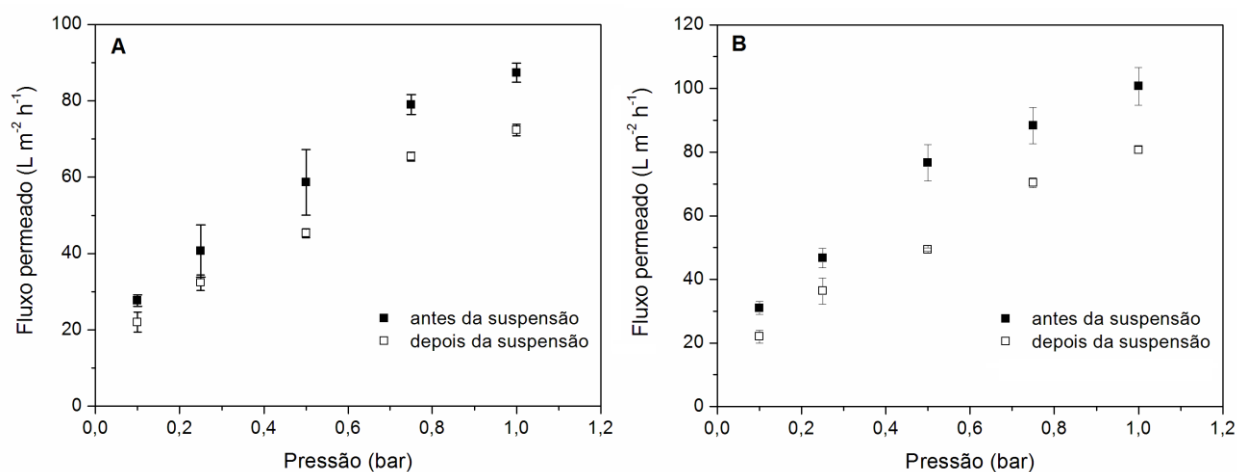


Figura 4.15 - Fluxo de água destilada em função da pressão antes e após os experimentos com a suspensão de *Chlorella* sp. (A) velocidade de $0,6 \text{ m s}^{-1}$; (B) velocidade de $0,8 \text{ m s}^{-1}$.

A análise dos resultados mostra que o fluxo permeado não apresentou queda acentuada após a passagem da suspensão de *Chlorella* sp., para as duas velocidades de operação, indicando a baixa tendência ao *fouling* da suspensão de *Chlorella* sp. nas condições testadas. As maiores quedas do fluxo permeado, tanto na velocidade de $0,6 \text{ m s}^{-1}$ quanto na velocidade de $0,8 \text{ m s}^{-1}$,

ocorreram a partir de 0,5 bar evidenciando que a partir deste valor de pressão existe maior interação entre a suspensão e a membrana, isto é, aumenta a tendência ao *fouling*.

O comportamento do fluxo de água destilada *versus* *PTM* antes e após a passagem da suspensão de *D. tertiolecta* para as duas velocidades de escoamento é apresentado na Figura 4.16. Para esta suspensão não é constatado a ocorrência de um *fouling* severo, porém, a queda do fluxo é constante ao longo de toda a faixa de pressão testada, demonstrando que, para esta suspensão, as interações membrana suspensão independem da pressão utilizada.

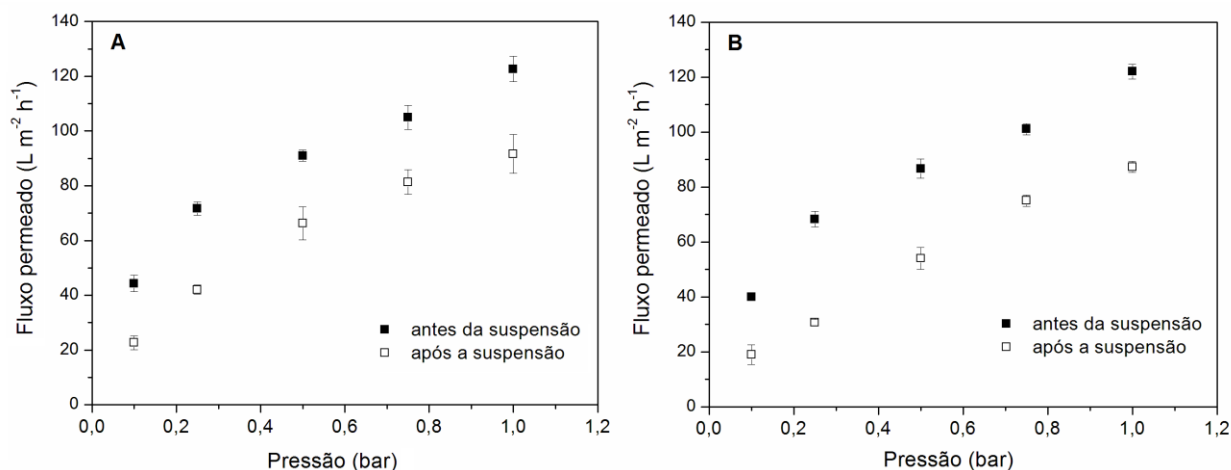


Figura 4.16 - Fluxo de água destilada *versus* pressão antes e após os experimentos com a suspensão de *D. tertiolecta*. (A) velocidade de $0,6 m s^{-1}$ e (B) velocidade de $0,8 m s^{-1}$.

Os gráficos das Figuras 4.15 e 4.16 possibilitaram o cálculo dos valores de permeância hidráulica antes e após a passagem das suspensões de microalgas de acordo com a lei de Darcy. Esses valores foram utilizados na Equação 2.6 para determinar a tendência ao *fouling*. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.5.

Comparando a tendência ao *fouling* em cada velocidade testada para cada microalga, é possível observar que não ocorreu diferença significativa, apresentando teste de *t* ($p = 0,91$ para *Chlorella* sp. e $p = 0,80$ para *D. tertiolecta*) em nível de significância igual a 0,05. Os dados da Tabela 4.5 também mostram que houve uma maior tendência ao *fouling* da suspensão de *Chlorella* sp. em comparação com a suspensão de *D. tertiolecta* ($p = 0,02$), e que a velocidade de escoamento não exerceu influência sobre este fator.

Tabela 4.5 – Valores de permeância hidráulica antes e após os experimentos com as suspensões de microalgas e o percentual de *fouling*.

Microalga	Velocidade tangencial (m s ⁻¹)	Permeância antes (L m ⁻² h ⁻¹ bar ⁻¹)	Permeância após (L m ⁻² h ⁻¹ bar ⁻¹)	% <i>Fouling</i>
<i>Chlorella</i> sp.	0,6	68 ± 1	58 ± 5	15 ± 6
	0,8	78 ± 5	65 ± 2	16 ± 4
<i>D. tertiolecta</i>	0,6	81 ± 8	76 ± 7	6 ± 2
	0,8	84 ± 1	79 ± 1	6 ± 1

Os valores de percentual de *fouling* confirmam que não ocorreu grande interação das duas suspensões de microalgas com a membrana de PVDF de 0,22 µm utilizada neste estudo. O trabalho de Giorno, Mazzei e Giorno (2013) também realizou a comparação da permeância da membrana de PVDF de 150 kDa antes e após os experimentos com a suspensão de *Nannochloropsis* na concentração de 20 ± 2 mg mL⁻¹ de biomassa seca; os autores observaram queda de permeância de 87 ± 2 L m⁻² h⁻¹ bar⁻¹ para 73 ± 2 L m⁻² h⁻¹ bar⁻¹ que representa um percentual de *fouling* igual a 16 %, semelhante ao percentual encontrado para a suspensão de *Chlorella* sp..

4.6.2 Resistência ao fluxo devido ao *fouling*

A análise sobre as interações entre a membrana e a suspensão de alimentação apresentada nesta seção foi realizada a partir dos resultados de fluxo obtidos nos experimentos em modo de reciclo total para as duas suspensões de microalgas. As interações podem ser estimadas pela resistência ao *fouling* que representa o somatório dos fenômenos que causam redução do fluxo, como adsorção, bloqueio dos poros e a formação de torta.

A Equação 4.2 permitiu determinar o grau de interação das suspensões de microalgas com a membrana de PVDF, assim como o efeito das velocidades tangenciais aplicadas.

$$R_F = \frac{1}{\mu_{\text{água}} DWP_a} - R_M \quad (4.2)$$

A Tabela 4.6 apresenta os valores obtidos de resistência devido ao *fouling* para ambas as microalgas.

Tabela 4.6 – Resistência ao *fouling* sobre diferentes velocidades de operação para as suspensões de microalgas.

Suspensão de Microalga	Velocidade tangencial (m s ⁻¹)	R _F x 10 ⁻¹¹ (m ⁻¹)
<i>Chlorella</i> sp.	0,6	11,0
	0,8	9,7
<i>D. tertiolecta</i>	0,6	3,5
	0,8	3,4

A resistência intrínseca da membrana, calculada com a Equação 4.3, demonstrou valor médio de $(5,2 \pm 0,5) \times 10^{12} \text{ m}^{-1}$. A resistência da membrana é elevada, sendo maior que a resistência devido aos fenômenos de *fouling* para as duas suspensões. Esse resultado deve-se às características morfológicas da membrana, tais como tamanho dos poros, porosidade, tortuosidade e também à característica hidrofóbica da membrana de PVDF.

$$R_M = \frac{1}{\mu_{\text{água}} L_p} \quad (4.3)$$

As diferenças da resistência devido ao *fouling* para as duas velocidades testadas não foi expressiva. Porém, observa-se uma diferença entre duas e três vezes menor para a suspensão de *D. tertiolecta*, possivelmente devido à diferença nas características das microalgas estudadas; sendo a *D. tertiolecta* uma microalga móvel, enquanto que a *Chlorella* sp. não apresenta mobilidade. Além disso, a *Chlorella* sp. apresenta formação de torta compressível (BABEL E TAKIZAWA, 2010) o que aumenta a resistência ao fluxo. Os dados de R_F estão coerentes com os obtidos para o percentual de *fouling*.

Existem estudos dedicados exclusivamente ao comportamento da resistência devido ao *fouling* em diferentes condições operacionais do sistema de membranas. Conforme Hung *et al.* (2006), as resistências hidrodinâmicas aumentam quando os componentes presentes na solução liberam polissacarídeos, causando maior *fouling*, que pode ser agravado se o material da membrana tem características hidrofóbicas.

Ahmad *et al.*, (2012), testaram o efeito do aumento da velocidade tangencial da suspensão de *Chlorella* sp. de 0,13 m s⁻¹ até 4,0 m s⁻¹ em diferentes fenômenos de *fouling*, como bloqueio dos poros e formação de torta. Foi utilizada membrana circular de MF de acetato de celulose de 1,2 μm em configuração de escoamento tangencial. Os autores concluíram que o aumento da velocidade causou queda de todas as resistências, exceto a resistência devido ao bloqueio dos poros. Além disso, concluiu-se que o aumento da *PTM* causou agregação das células

sobre a superfície da membrana durante a filtração. Portanto, o bloqueio de poros observado no início da filtração, foi substituído por uma significativa formação de torta.

O trabalho realizado por Babel e Takizawa (2010), permite realizar uma comparação interessante dos resultados obtidos neste trabalho para a suspensão de *Chlorella* sp. com a configuração de escoamento transversal de uma suspensão de *Chlorella* sp. na concentração de 240 mg L⁻¹. Neste estudo foi alterada a *PTM* (0,064 bar a 0,86 bar) em membranas circulares de PVDF e de Éster de Celulose, ambas de 0,45 µm e área de permeação de 0,005 m². Os resultados mostraram que a resistência devido à formação de torta aumentou com o aumento da pressão transmembrana até o valor de aproximadamente 6,0×10¹² m kg⁻¹ em *PTM* de 0,6 bar, não ocorrendo aumento da resistência em 0,86 bar. Os autores concluíram que a formação de torta é o tipo de *fouling* dominante e que a *Chlorella* sp. gera naturalmente uma torta compressível.

4.6.3 Caracterização dos mecanismos de *fouling* através do modelo de Hermia modificado por Field

O modelo de Hermia modificado por Field *et al.*, (1995), foi utilizado para caracterizar os mecanismos de *fouling* em modo de escoamento tangencial. O modelo original de Hermia, que data do ano de 1982, aplica o princípio do escoamento transversal, onde o declínio contínuo do fluxo permeado atinge valor nulo no último ponto da filtração. Este comportamento não ocorre em processos que operam em configuração de escoamento tangencial (SONG, 1998).

Os resultados de fluxo obtidos nos experimentos de concentração das suspensões de *Chlorella* sp. e *D. tertiolecta* (modo batelada) foram utilizados para a predição do declínio do fluxo permeado considerando os seguintes mecanismos de *fouling*: formação de torta ($n = 0$), bloqueio intermediário dos poros ($n = 1,0$), bloqueio padrão ou bloqueio interno dos poros ($n = 1,5$) e bloqueio completo dos poros ($n = 2,0$). Estes parâmetros foram estimados de acordo com a Equação 2.13 para o processo de filtração realizado em pressão transmembrana constante. Os resultados da análise estão apresentados na Tabela 4.7, para a suspensão de *Chlorella* sp., e na Tabela 4.8 para a suspensão de *D. tertiolecta*.

Conforme os dados apresentados na Tabela 4.7, para a suspensão de *Chlorella* sp., pode-se constatar que o maior valor do coeficiente de determinação (R^2) para os três experimentos realizados foi referente ao mecanismo de *fouling* de formação de torta ($n = 0$). A triplicata apresenta valores diferentes de R^2 , devido aos diferentes tempos de operação e à diferença entre os valores de fluxo permeado. No entanto, para todos os experimentos o coeficiente de determinação foi maior para o mecanismo de formação de torta.

Tabela 4.7 - Valores estimados e parâmetros estatísticos do modelo de Hermia-Field para os experimentos de concentração da suspensão de *Chlorella* sp..

Primeiro experimento							
Mecanismo de fouling	R^2	$k \times 10^{-5}$	J_{EF} (L m ⁻² h ⁻¹)	J^* (L m ⁻² h ⁻¹)	$RMSE$	Erro absoluto do fluxo inicial	Soma quadrática
Formação de torta	0,9674	0,0092		18	0,37	2,0	126
Bloqueio intermediário	0,9490	0,6479		25	0,48	1,0	206
Bloqueio interno	0,9389	4,56	24	25	0,58	2,0	298
Bloqueio completo	0,9108	39,97		28	0,66	1,0	393
Segundo experimento							
Mecanismo de fouling	R^2	$k \times 10^{-5}$	J_{EF} (L m ⁻² h ⁻¹)	J^* (L m ⁻² h ⁻¹)	$RMSE$	Erro absoluto do fluxo inicial	Soma quadrática
Formação de torta	0,9333	0,013		17	0,44	1,0	222
Bloqueio intermediário	0,8930	0,78		22	0,58	2,0	387
Bloqueio interno	0,8626	5,79	19	23	0,67	2,0	521
Bloqueio completo	0,8224	44,02		24	0,77	2,0	694
Terceiro experimento							
Mecanismo de fouling	R^2	$k \times 10^{-5}$	J_{EF} (L m ⁻² h ⁻¹)	J^* (L m ⁻² h ⁻¹)	$RMSE$	Erro absoluto do fluxo inicial	Soma quadrática
Formação de torta	0,9562	0,0099		21	0,42	0	157
Bloqueio intermediário	0,9415	0,57		25	0,53	2,0	249
Bloqueio interno	0,9192	4,99	25	28	0,60	2,0	320
Bloqueio completo	0,8961	38,86		28	0,69	2,0	428

J^* é o fluxo estimado do estado estacionário e J_{EF} é o último fluxo experimental medido.

Além disso, o $RMSE$ que resume em um único valor o erro absoluto correspondente à diferença entre o fluxo experimental e o fluxo estimado para cada valor de n do modelo, também demonstra que houve um maior ajuste do modelo aos dados experimentais para o mecanismo de *fouling* correspondente à formação de torta ($n = 0$).

Outro parâmetro utilizado para comparar o ajuste dos dados calculados aos dados experimentais é a soma quadrática, que representa uma análise análoga a da raiz do erro médio quadrático; para os ajustes da suspensão de *Chlorella* sp. foram constatados os menores valores da soma quadrática para o mecanismo de formação de torta. O mecanismo de *fouling* que

apresentou menor ajuste aos dados experimentais para a suspensão de *Chlorella* sp., foi o de bloqueio completo dos poros ($n = 2,0$).

Com relação ao fluxo estimado para o estado estacionário, pode-se observar que somente o modelo que representa a formação de torta ($n = 0$) conseguiu estimar de forma coerente o ponto de fluxo permeado no estado estacionário, uma vez que para os outros mecanismos de *fouling* foram estimados fluxos no estado estacionário em um valor maior que o encontrado no último ponto de fluxo permeado medido experimentalmente. Portanto, pode-se concluir que o mecanismo de formação de torta foi dominante durante a filtração de *Chlorella* sp., uma vez que todos os testes estatísticos e o fluxo estimado para o estado estacionário conduzem a este resultado.

Na Figura 4.17 estão ilustrados os dados de fluxo experimental de cada experimento de *Chlorella* sp. e os valores de fluxo permeado estimados referente a cada mecanismo de *fouling* analisado. Pode-se constatar que, entre os mecanismos de *fouling* avaliados, o mecanismo de formação de torta é o que se ajusta melhor aos dados experimentais de *Chlorella* sp. para todos os experimentos realizados.

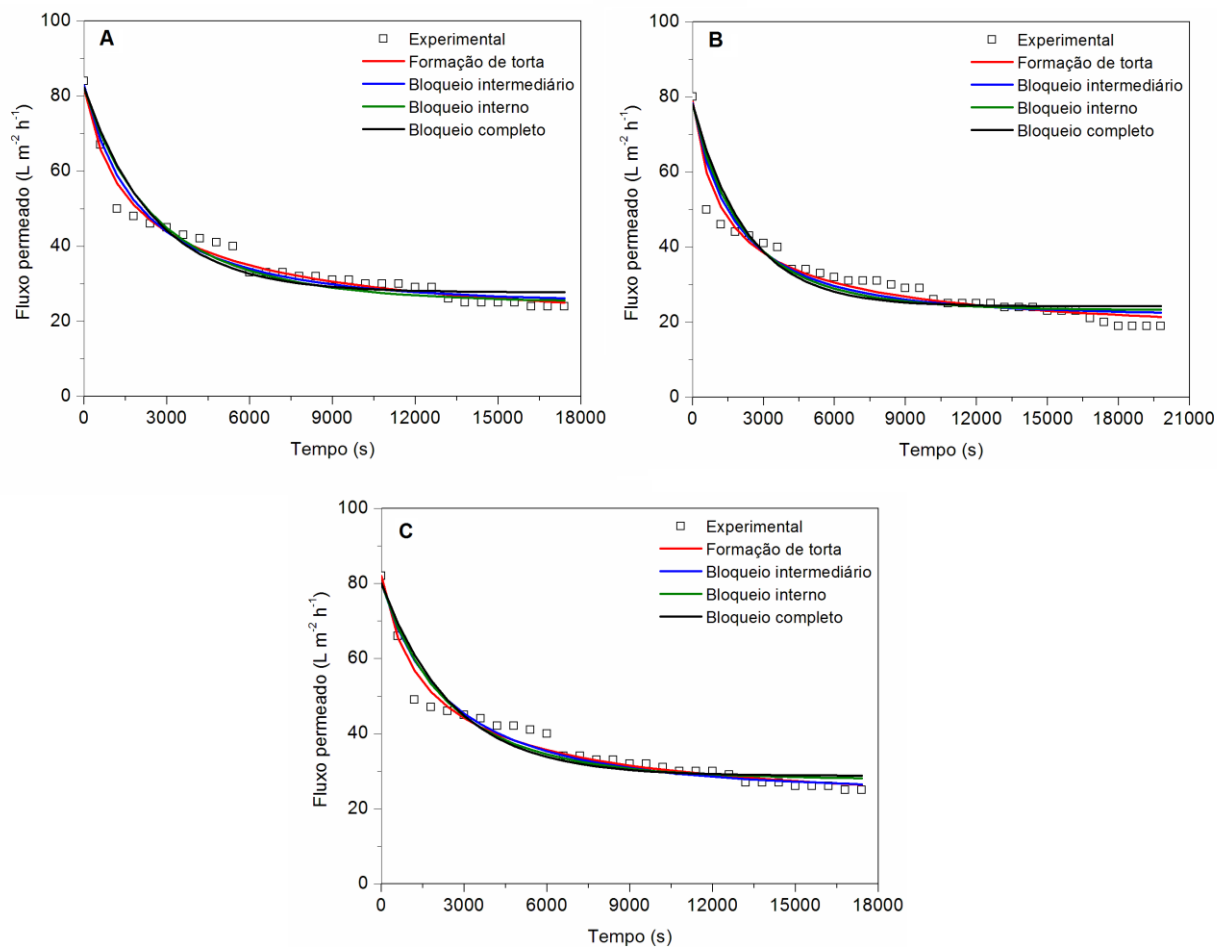


Figura 4.17 - Fluxo experimental e fluxo estimado em função do tempo para a suspensão de *Chlorella* sp. para cada mecanismo de fouling avaliado (A) primeiro experimento (B) segundo experimento (C) terceiro experimento.

A Tabela 4.8 apresenta a análise dos mecanismos de *fouling* e a estimativa do fluxo permeado no estado estacionário para os experimentos de concentração realizados com a suspensão de *D. tertiolecta*. É possível observar que não existe uma diferença expressiva nos valores dos coeficientes de determinação para os diferentes mecanismos de *fouling* para cada experimento. Além disso, os valores de R^2 são maiores que 0,95 indicando uma boa correlação com os dados experimentais.

Tabela 4.8 - Valores estimados e parâmetros estatísticos do modelo de Hermia-Field para os experimentos de concentração da suspensão de *D. tertiolecta*.

Primeiro experimento							
Mecanismo de <i>fouling</i>	R^2	$k \times 10^{-5}$	J_{EF} (L m ⁻² h ⁻¹)	J^* (L m ⁻² h ⁻¹)	$RMSE$	Erro absoluto do fluxo inicial	Soma quadrática
Formação de torta	0,9545	0,012		19	0,163		36
Bloqueio intermediário	0,9537	0,2943		18	0,164		37
Bloqueio interno	0,9539	1,4562	20	18	0,165	3,0	37
Bloqueio completo	0,9524	7,95		19	0,167		38
Segundo experimento							
Mecanismo de <i>fouling</i>	R^2	$k \times 10^{-5}$	J_{EF} (L m ⁻² h ⁻¹)	J^* (L m ⁻² h ⁻¹)	$RMSE$	Erro absoluto do fluxo inicial	Soma quadrática
Formação de torta	0,9736	0,015		14	0,0702	1,0	14
Bloqueio intermediário	0,9728	0,3476		15	0,0706	1,0	15
Bloqueio interno	0,9728	1,515	16	15	0,0725	2,0	15
Bloqueio completo	0,9725	6,92		15	0,0735	2,0	16
Terceiro experimento							
Mecanismo de <i>fouling</i>	R^2	$k \times 10^{-5}$	J_{EF} (L m ⁻² h ⁻¹)	J^* (L m ⁻² h ⁻¹)	$RMSE$	Erro absoluto do fluxo inicial	Soma quadrática
Formação de torta	0,9809	0,014		17	0,1004		20
Bloqueio intermediário	0,9827	0,3906		17	0,0966		19
Bloqueio interno	0,9838	1,9843	19	18	0,0897	3,0	16
Bloqueio completo	0,9847	10,7		18	0,0904		17

J^* é o fluxo estimado do estado estacionário e J_{EF} é o último fluxo experimental medido.

Os valores de R^2 apresentados na Tabela 4.8 são muito semelhantes, não sendo possível concluir qual o mecanismo de *fouling* que predomina para a filtração da suspensão de *D. tertiolecta*, mas sim que os mecanismos ocorreram em conjunto durante o processo de filtração. O $RMSE$ e a soma quadrática também não possibilitaram concluir se o modelo apresentou melhor ajuste a um mecanismo de *fouling* específico.

A estimação do fluxo permeado estacionário para a suspensão de *D. tertiolecta* foi menor do que aquele obtido experimentalmente no último ponto de medição para todos os mecanismos de *fouling* avaliados. Este resultado ratifica que os mecanismos de *fouling* durante os experimentos

com a suspensão de *D. tertiolecta* provavelmente ocorreram em conjunto, não sendo possível distinguir qual é o predominante.

Na Figura 4.18 estão apresentados os dados de fluxo experimental de cada experimento com a suspensão de *D. tertiolecta* e as curvas de fluxo permeado para cada mecanismo de *fouling* preditas pelo modelo de Hermia-Field.

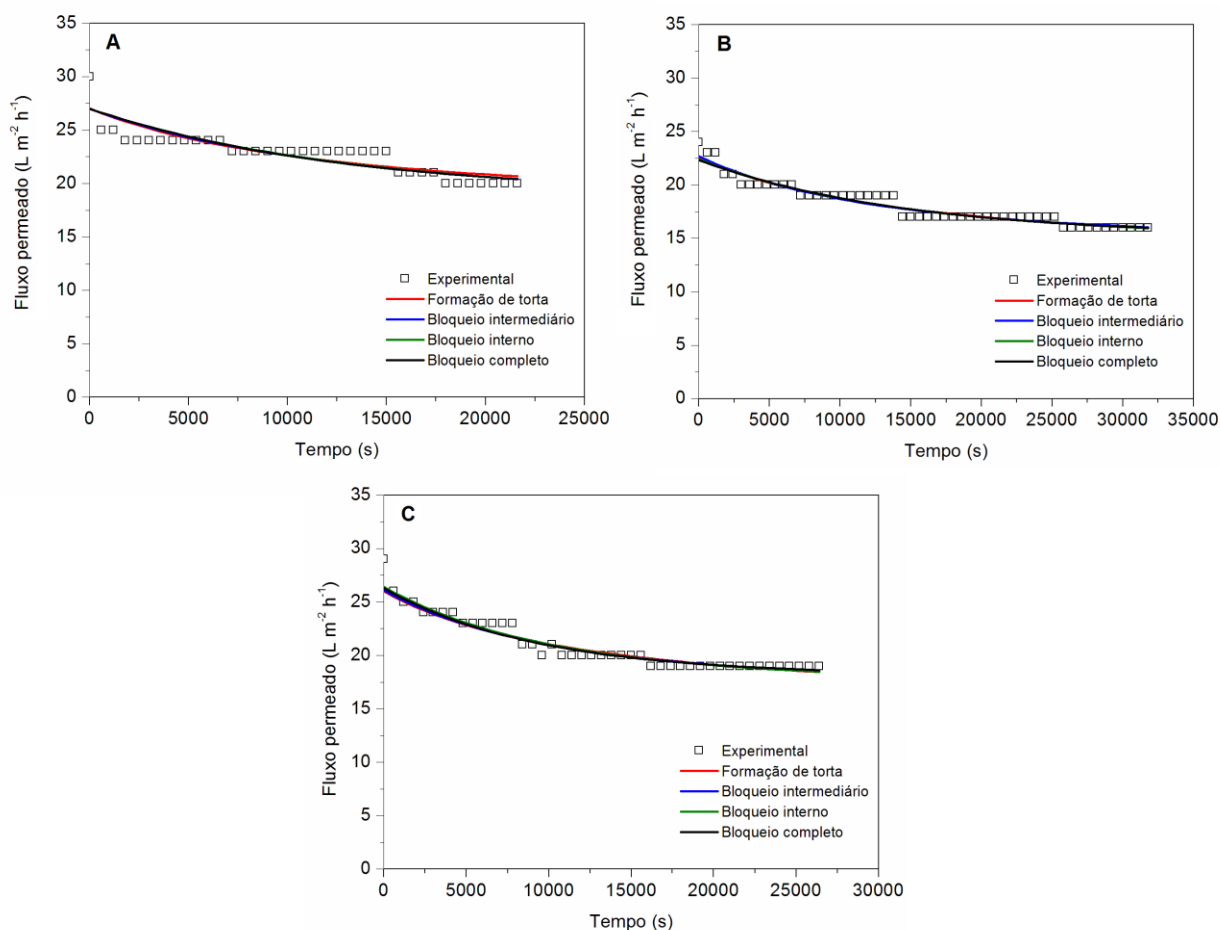


Figura 4.18 - Fluxo experimental e fluxo estimado em função do tempo para a suspensão de *D. tertiolecta* para cada mecanismo de *fouling* avaliado (A) primeiro experimento (B) segundo experimento (C) terceiro experimento.

Pela análise dos gráficos observa-se que ocorreu ajuste semelhante para todos os mecanismos de *fouling* previstos no modelo de Hermia-Field com os dados experimentais para os três experimentos realizados com a suspensão de *D. tertiolecta*, confirmando a não ocorrência de um mecanismo de *fouling* dominante. Entretanto, a baixa tendência ao *fouling* da suspensão de *D. tertiolecta* (6 %) possivelmente dificultou estimar os mecanismos de *fouling* pelo modelo de Hermia-Field.

4.7 AVALIAÇÃO DO PERMEADO COMO MEIO DE CULTIVO

O permeado obtido nos experimentos de concentração foi utilizado para avaliar a possibilidade de reuso como meio de cultivo. O aproveitamento da corrente de permeado permitirá uma redução no consumo de água e nutrientes, aumentando dessa forma, a viabilidade econômica do processo. Deve-se ressaltar que um dos grandes gargalos da produção de microalgas é a etapa de recuperação de biomassa, desta forma, o reuso do permeado como meio de cultivo representa uma estratégia para a melhoria do processo.

A fim de ser utilizado como meio de cultivo, o permeado foi enriquecido com nitrato e soluções de micronutrientes, ou apenas com nitrato, e os resultados foram comparados com os obtidos utilizando-se o meio de cultivo novo (Guillard ‘f1/2’ modificado).

Na Figura 4.19(A) estão apresentados os resultados de concentração em função do tempo de experimento para o cultivo de *Chlorella* sp.. Embora a concentração de biomassa alcançada nos dois meios constituídos pelo permeado tenha sido inferior em relação ao meio padrão ($1,34 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$), ainda assim foi observado crescimento de biomassa utilizando os dois tipos de meio de cultura com o permeado gerado pela microfiltração.

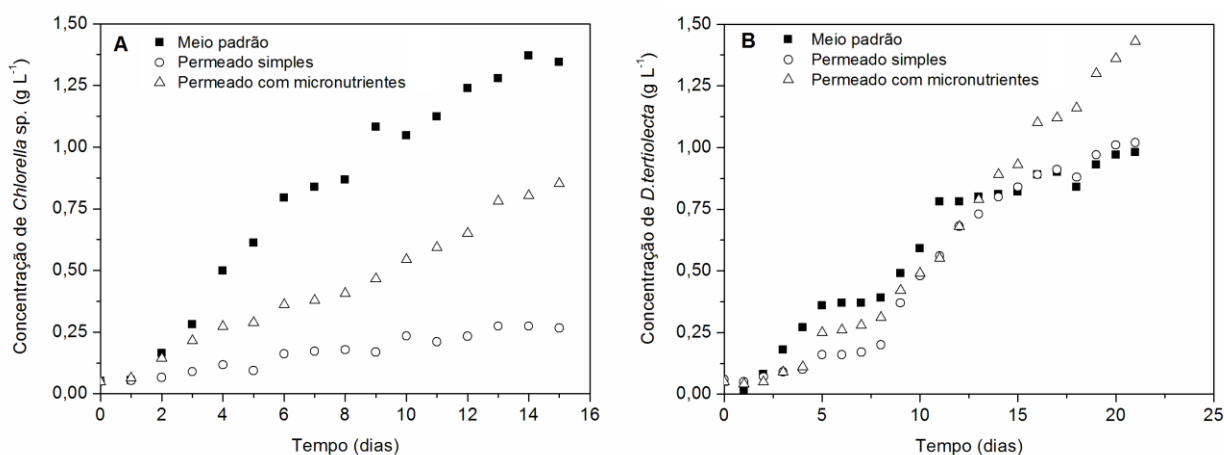


Figura 4.19 – Curva cinética para os cultivos de *Chlorella* sp. (A) e *D. tertiolecta* (B) em diferentes meios: padrão, permeado simples e permeado com micronutrientes.

O meio permeado enriquecido com micronutrientes apresentou uma capacidade de crescimento superior ao meio sem adição de micronutrientes, com uma concentração média final de biomassa igual a $0,85 \text{ g L}^{-1}$, portanto, pode-se inferir que não houve inibição do crescimento de *Chlorella* sp. devido ao acúmulo excessivo de íons dissolvidos no meio. Para o cultivo em meio permeado simples a concentração de biomassa de *Chlorella* sp. atingiu o estado estacionário em torno de 8 dias, ao término do cultivo foi alcançada uma concentração média de $0,27 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$. Esse resultado demonstrou que o permeado simples, sem adição de micronutrientes não é

adequado para o cultivo desta microalga.

Outro aspecto que deve ser considerado é a presença de metabólitos orgânicos no permeado que são liberados pelas microalgas durante o processo de concentração na forma de EPS solubilizado; estas substâncias podem causar algum efeito sobre a eficiência do cultivo. Para o permeado obtido no processamento da suspensão de *Chlorella* sp. o teor de carboidratos foi de $14 \pm 1 \text{ mg L}^{-1}$ e o teor de proteínas totais foi de $55 \pm 4 \text{ mg L}^{-1}$.

Na Figura 4.19(B) está apresentado o resultado do cultivo da microalga *D. tertiolecta* quando foi utilizado o permeado como meio de cultivo, durante 21 dias. O valor inicial médio de concentração da microalga foi de $0,05 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$ em meio padrão, média de $0,06 \text{ g L}^{-1}$ em meio permeado simples e de $0,05 \text{ g L}^{-1}$ no permeado enriquecido com micronutrientes. Neste caso, o permeado simples exibiu alta capacidade de crescimento finalizando o cultivo com concentração igual a $1,02 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$. A concentração de biomassa em meio padrão da microalga foi de $0,98 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$. Em meio permeado com a adição dos micronutrientes ocorreu um crescimento superior ao meio padrão, finalizando em $1,43 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$.

A concentração de proteínas e carboidratos na corrente de permeado foi maior durante a etapa de concentração de *D. tertiolecta*, devido a maior ocorrência de lise celular e a liberação de EPS solubilizado na corrente de permeado. O valor encontrado foi de $33 \pm 4 \text{ mg L}^{-1}$ para carboidratos totais e de $71 \pm 4 \text{ mg L}^{-1}$ para proteínas totais. Entretanto, estes valores para esta espécie de microalga neste trabalho possivelmente contribuíram positivamente para o cultivo, atuando como uma fonte de nutriente orgânico oferecida pelo permeado, uma vez que para este meio foi alcançada uma concentração maior de biomassa quando comparada ao meio padrão desta microalga.

BILAD *et al.*, (2014), utilizaram um fotobiorreator com membranas em modo contínuo durante 58 dias para cultivo da microalga *Chlorella vulgaris*, sendo o meio reciclado mais de 13 vezes. Nenhuma indicação de limitação do crescimento por acumulação de substrato não limitante ou inibição por metabólitos foi observada e o consumo de água foi reduzido em 77 %.

Wu *et al.*, (2012) realizaram a floculação induzida por aumento de pH com adição de solução 1,0 M de NaOH para a colheita de *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp., *Chlorococcum* sp., *Phaeodactylum tricorutum* e *Nannocloropsis oculata*. Após a separação, os autores recolheram o sobrenadante e ajustaram o pH com ácidos inorgânicos (HNO_3 quando foi utilizado meio de cultura BG-11 e HCl quando utilizado meio modificado ASW), resultando na produção de NaNO_3 para o meio BG-11 e de NaCl para o meio modificado ASW, sendo estes os nutrientes necessários. Os autores comentam que foi possível utilizar o sobrenadante como meio de cultivo reciclado porque somente foi necessária uma alteração do pH do meio.

Ainda de acordo Wu *et al.*, (2012), a concentração de biomassa alcançada com o reciclo do meio de cultivo foi semelhante à concentração de biomassa obtida em meio padrão para todas as microalgas estudadas.

Hadj-romdhane *et al.*, (2013), investigaram o impacto da reciclagem do meio em cultivo contínuo em fotobiorreator *airlift* de *Chlorella vulgaris*, sobre a produtividade da cultura, a qualidade das células e o acúmulo de metabólitos excretados. Os autores utilizaram como meio de cultivo reciclado o sobrenadante obtido através de centrifugação em 17 600 g, durante 15 min na temperatura de 15 °C. Foi observado acúmulo regular de matéria orgânica excretada, identificada principalmente como polissacarídeos. Nenhum impacto significativo sobre o crescimento de *C. vulgaris* foi observado após 63 dias de cultivo com reciclagem do meio de cultivo. A produtividade de biomassa foi semelhante a do meio padrão.

Em trabalho anterior dos mesmos autores (HADJ-ROMDHANE *et al.*, 2012), o valor semelhante de concentração de biomassa (1,5 g L⁻¹) foi observada em sistema contínuo operando durante 56 dias. Foram realizadas 13 colheitas visando a utilização do meio reciclado. Os resultados mostraram que os íons Na⁺, K⁺ e Ca⁺² não foram assimilados pelas microalgas e se acumularam no meio.

O efeito sobre o cultivo utilizando meio reciclado com acúmulo de íons, EPS e nutrientes não assimilados necessita de uma pesquisa mais aprofundada, porque ainda não está claro o efeito destas substâncias sobre o crescimento das microalgas (DISCART *et al.*, 2014).

CAPÍTULO 5

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O presente trabalho analisou três diferentes modos de operação da microfiltração tangencial para a colheita de biomassa de duas microalgas, a *Chlorella* sp. e a *D. tertiolecta*. Primeiramente foi analisada a interação entre a membrana de PVDF e as suspensões de microalgas, auxiliando a definição das melhores condições operacionais para as etapas de concentração e purificação. Além disso, foi realizado o estudo sobre os mecanismos de *fouling* utilizando modelo Hermia-Field e uma avaliação da disponibilidade do permeado gerado pela MF como meio de cultivo de ambas as suspensões de microalgas.

Na caracterização da membrana de PVDF foi determinada a permeância hidráulica inicial, comprovando o aumento do fluxo de permeado de água com o aumento de pressão transmembrana, portanto, as membranas de PVDF estavam compactadas. A permeância hidráulica inicial, apresentou valor médio de $78 \pm 7 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ bar}^{-1}$.

Nos experimentos de permeação das soluções em diferentes *PTM* e velocidades tangenciais, a microalga *Chlorella* sp. apresentou aumento do fluxo permeado tanto com o aumento de pressão quanto com o aumento da velocidade de escoamento da solução de alimentação. O fluxo em velocidade de $0,6 \text{ m s}^{-1}$ foi igual a $15 \pm 1 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ em *PTM* de 0,25 bar até $34 \pm 2 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ em *PTM* de 1,0 bar. Na velocidade de $0,8 \text{ m s}^{-1}$ obteve-se um fluxo nesta faixa de pressão, de $19 \pm 2 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ a $43 \pm 3 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$. A microalga *D. tertiolecta* apresentou valores de fluxo crítico e fluxo limite, tanto na velocidade de $0,8 \text{ m s}^{-1}$ quanto na velocidade de $0,6 \text{ m s}^{-1}$. O valor de fluxo crítico foi de $19 \pm 2 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ entre 0,15 bar e 0,2 bar e fluxo limite de $31 \pm 1 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ em 0,75 bar na velocidade de $0,6 \text{ m s}^{-1}$. Em velocidade tangencial de

0,8 m s⁻¹, o fluxo crítico foi igual a $20 \pm 2 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ entre 0,15 bar e 0,2 bar e fluxo limite igual a $27 \pm 2 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ em 0,75 bar.

Em relação às resistências que causam redução ao fluxo permeado, foi constatada a maior influência da resistência intrínseca da membrana, com valor médio de $(5,2 \pm 0,5) \times 10^{12} \text{ m}^{-1}$. A resistência devido aos fenômenos de *fouling* foi maior em *Chlorella* sp. do que em *D. tertiolecta* nas duas velocidades aplicadas. O estudo da tendência ao *fouling* comparando a permeância hidráulica antes e após a passagem das suspensões de microalgas, mostrou a maior tendência ao *fouling* da suspensão de *Chlorella* sp. em comparação com a suspensão de *D. tertiolecta*.

Para os experimentos de concentração e purificação das biomassas, foi selecionada para a suspensão de *Chlorella* sp. a PTM de 0,5 bar. Para a suspensão de *D. tertiolecta* a PTM de 0,15 bar foi selecionada porque este ponto ficou abaixo da pressão crítica de trabalho e também devido à permanência da integridade celular de *D. tertiolecta* nesta pressão. A velocidade tangencial de 0,6 m s⁻¹ foi utilizada para ambas as microalgas devido ao menor custo energético e a menor taxa de cisalhamento aplicada (4 800 s⁻¹), evitando assim a maior liberação de EPS e lise celular.

Em todos os experimentos de concentração das suspensões de microalgas, o fluxo permeado diminuiu com o tempo de operação devido aos fenômenos de polarização por concentração e *fouling*. No entanto, para a suspensão de *Chlorella* sp. a redução média do fluxo foi maior, totalizando 74 %, quando comparada com a passagem da suspensão de *D. tertiolecta* (40 %). O fator de concentração volumétrico (FCV) médio alcançado, para *Chlorella* sp. foi de 2,6 e para a *D. tertiolecta* foi de 2,5, devido às limitações experimentais do sistema de MF.

O modo diafiltração em duas etapas a volume constante mostrou-se capaz de purificar a biomassa das duas microalgas sem causar alterações bruscas no fluxo permeado e também no valor de pH. O percentual de redução foi de 42 % para a *Chlorella* sp. e 38 % para a *D. tertiolecta*.

O modelo de Hermia, (1982) modificado por Field em 1995 apresentou boa adequação aos dados experimentais para mecanismo de *fouling* de bloqueio de poro devido a formação de torta para a suspensão de *Chlorella* sp.. Para os experimentos com *D. tertiolecta*, sugere-se que todos os fenômenos de *fouling* ocorreram simultaneamente, sem a influência dominante de um fenômeno específico, uma vez que todos os mecanismos de *fouling* se ajustaram aos dados experimentais. Este resultado também pode estar relacionado a baixa tendência ao *fouling* causado pela suspensão de *D. tertiolecta*, dificultando a estimação dos diferentes mecanismos de *fouling* pelo modelo Hermia-Field.

Através da avaliação do permeado da MF como meio de cultivo, pode-se observar o importante papel dos micronutrientes para o desenvolvimento das células. Esta conclusão deve-se em parte a obtenção de melhores resultados de crescimento de biomassa em meio permeado com a adição de micronutrientes tanto para *Chlorella* sp. quanto para *D. tertiolecta* quando comparados com o meio permeado simples destas microalgas. Inclusive, para a *D. tertiolecta*, obteve-se crescimento celular superior em meio permeado enriquecido em relação ao meio padrão desta espécie. No caso do permeado de *Chlorella* sp. foi observado aumento de células tanto em meio enriquecido com micronutrientes, quanto em meio permeado simples, entretanto, muito inferior ao meio padrão desta espécie.

Assim, a partir dos resultados obtidos neste trabalho, verifica-se que a MF representa uma promissora alternativa para a concentração e purificação das biomassas de *Chlorella* sp. e *D. tertiolecta*. As sugestões para trabalhos futuros que visem à otimização da concentração e purificação das biomassas, além de diferentes formas de aplicar o reuso da água proveniente do processo de separação, estão listadas a seguir.

- Operar o sistema com módulos de MF em paralelo ou em série, visando processar maior volume de suspensão.
- A partir dos dados obtidos das DF deste estudo, elaborar ensaios otimizados de DF com relação ao número de etapas e diferentes volumes de solvente adicionados.
- Realizar testes com o permeado de cada etapa da DF como meio de cultivo reciclado, garantindo maior consumo de água e nutrientes. Os volumes de água retirados durante as diafiltrações possuem diferentes concentrações salinas, portanto, apresentam potencial de utilização em outras espécies de microalgas.
- Realizar estudos de recuperação de biomassa de forma combinada com outras operações unitárias.
- Realizar um estudo com o permeado de um biorreator com membranas, como meio de cultivo reciclado para microalgas.
- Integrar o sistema de cultivo com a separação para operar em modo contínuo, aplicando os valores de velocidade tangencial e pressão transmembrana estudados neste trabalho.

- Realizar a ultrafiltração para o fracionamento da solução, possibilitando a obtenção de uma corrente com proteínas e outra com triglicérides.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, A. L. et al. Crossflow microfiltration of microalgae biomass for biofuel production. **Desalination**, v. 302, n. 0, p. 65-70, 9/17/ 2012. ISSN 0011-9164. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011916412003608> >.

ANADÃO, P., 2010, **Ciência e Tecnologia de Membranas**. Artliber Editora Ltda São Paulo, 2010.

ALYABYEV, A. J. et al. The effect of changes in salinity on the energy yielding processes of *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella maritima* cells. **Thermochimica Acta**, v. 458, n. 1–2, p. 65-70, 6/25/ 2007. ISSN 0040-6031. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040603107001098> >.

BABEL, S.; TAKIZAWA, S. Microfiltration membrane fouling and cake behavior during algal filtration. **Desalination**, v. 261, n. 1–2, p. 46-51, 10/15/ 2010. ISSN 0011-9164. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001191641000353X> >.

BARROW, C.; SHAHIDI, F. **Marine nutraceuticals and functional foods**. CRC Press, 2007. ISBN 1420015818.

BARRUT, B. et al. Water delivery capacity of a vacuum airlift – Application to water recycling in aquaculture systems. **Aquacultural Engineering**, v. 48, n. 0, p. 31-39, 5// 2012. ISSN 0144-8609. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144860911001038> >.

BEACH, E. S. et al. Preferential technological and life cycle environmental performance of chitosan flocculation for harvesting of the green algae *Neochloris oleoabundans*. **Bioresource technology**, v. 121, p. 445-449, 2012. ISSN 0960-8524.

BILAD, M. R. et al. Coupled cultivation and pre-harvesting of microalgae in a membrane photobioreactor (MPBR). **Bioresource Technology**, v. 155, n. 0, p. 410-417, 3// 2014. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852413007864> >.

_____. Simultaneous Cultivation and Pre-harvesting of Microalgae in a Lab-scale Membrane Photobioreactor (MPBR). **Procedia Engineering**, v. 44, n. 0, p. 712-713, // 2012. ISSN 1877-7058. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877705812035539> >.

_____. Harvesting microalgal biomass using submerged microfiltration membranes. **Bioresource Technology**, v. 111, n. 0, p. 343-352, 5// 2012. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852412002374> >.

BOSMA, R. et al. Growth inhibition of *Monodus subterraneus* by free fatty acids. **Biotechnology and bioengineering**, v. 101, n. 5, p. 1108-1114, 2008. ISSN 1097-0290.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and**

Sustainable Energy Reviews, v. 14, n. 2, p. 557-577, 2// 2010. ISSN 1364-0321. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032109002408> >.

BUETEHORN, S. et al. Permeate flux decline in cross-flow microfiltration at constant pressure. **Desalination**, v. 250, n. 3, p. 985-990, 1/30/ 2010. ISSN 0011-9164. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011916409011199> >.

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, n. 0, p. 510-516, 4// 2012. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852412001496> >.

CHEN, C.-Y. et al. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 71-81, 1// 2011. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852410011648> >.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, 5// 2007. ISSN 0734-9750. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975007000262> >. Acesso em: 2007/6//.

CHONG, T. H.; WONG, F. S.; FANE, A. G. Implications of critical flux and cake enhanced osmotic pressure (CEOP) on colloidal fouling in reverse osmosis: Experimental observations. **Journal of Membrane Science**, v. 314, n. 1-2, p. 101-111, 4/30/ 2008. ISSN 0376-7388. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376738808000732> >.

DA FRÉ, N.C., KOCHEN, L.H., DIERINGS, T., Marchese, G. 2011. Influência da Temperatura e da Salinidade no Cultivo da Microalga *Dunaliella tertiolecta* em Fotobiorreator Airlift. *Seminário do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (10.: 2011 out. 04-07: Porto Alegre, RS). Resumos e artigos [recurso eletrônico]. Porto Alegre, RS: UFRGS/EE/PPGEQ, 2011.*

DISCART, V. et al. Impact of changes in broth composition on *Chlorella vulgaris* cultivation in a membrane photobioreactor (MPBR) with permeate recycle. **Bioresource Technology**, v. 152, n. 0, p. 321-328, 1// 2014. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852413017355> >.

_____. Role of transparent exopolymeric particles in membrane fouling: *Chlorella vulgaris* broth filtration. **Bioresource Technology**, v. 129, n. 0, p. 18-25, 2// 2013. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852412017087> >.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956/03/01 1956. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ac60111a017> >. Acesso em: 2014/07/01.

EDZWALD, J. K. Algae, bubbles, coagulants, and dissolved air flotation. **Water Science & Technology**, v. 27, n. 10, p. 67-81, 1993.

FABREGAS, J. et al. Response of the Marine Microalga *Dunaliella tertiolecta* to Nutrient Concentration and Salinity Variations in Batch Cultures. **Journal of Plant Physiology**, v. 125, n. 5, p. 475-484, 11// 1986. ISSN 0176-1617. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0176161786800104> >.

FENG, F.-Y. et al. Enhancement of fatty acid production of *Chlorella* sp. (Chlorophyceae) by addition of glucose and sodium thiosulphate to culture medium. **Process Biochemistry**, v. 40,

n. 3–4, p. 1315-1318, 3// 2005. ISSN 1359-5113. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959204002237> >.

FIELD, R. W. et al. Critical flux concept for microfiltration fouling. **Journal of Membrane Science**, v. 100, n. 3, p. 259-272, 4/28/ 1995. ISSN 0376-7388. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037673889400265Z> >.

FIKAR, M.; KOVÁCS, Z.; CZERMAK, P. Dynamic optimization of batch diafiltration processes. **Journal of Membrane Science**, v. 355, n. 1–2, p. 168-174, 6/15/ 2010. ISSN 0376-7388. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376738810002279> >.

FISHER, M. et al. A salt-resistant plasma membrane carbonic anhydrase is induced by salt in *Dunaliella salina*. **J Biol Chem**, v. 271, n. 30, p. 17718-23, Jul 26 1996. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

FOGG, G. E. Extracellular products of algae in freshwater. **Ergebnisse der Limnologie**, 1971. ISSN 0071-1128.

FOLEY, G. Water usage in variable volume diafiltration: comparison with ultrafiltration and constant volume diafiltration. **Desalination**, v. 196, n. 1–3, p. 160-163, 9/5/ 2006. ISSN 0011-9164. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011916406004309> >.

FOUST, A. S.; CLUMP, L. A.; ANDERSEN, C. M. LB “Princípios das Operações Unitárias”. **Livros Técnicos e Científicos Editora AS, Capítulo**, v. 18, p. 401-434, 1982.

FRAPPART, M. et al. Influence of hydrodynamics in tangential and dynamic ultrafiltration systems for microalgae separation. **Desalination**, v. 265, n. 1–3, p. 279-283, 1/15/ 2011. ISSN 0011-9164. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001191641000559X> >.

GAUCHER, C. et al. Determination of cake thickness and porosity during cross-flow ultrafiltration on a plane ceramic membrane surface using an electrochemical method. **Journal of membrane science**, v. 210, n. 2, p. 245-258, 2002. ISSN 0376-7388.

GAVRILESCU, M.; CHISTI, Y. Biotechnology—a sustainable alternative for chemical industry. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 7–8, p. 471-499, 11// 2005. ISSN 0734-9750. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975005000340> >.

GEANKOPLIS, C. **Transport processes and separation process principles (includes unit operations)**. Prentice Hall Press, 2003. ISBN 013101367X.

GIORNO, F.; MAZZEI, R.; GIORNO, L. Purification of triacylglycerols for biodiesel production from *Nannochloropsis* microalgae by membrane technology. **Bioresource Technology**, v. 140, n. 0, p. 172-178, 7// 2013. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852413006962> >.

GOYAL, A. Osmoregulation in *Dunaliella*, Part I: Effects of osmotic stress on photosynthesis, dark respiration and glycerol metabolism in *Dunaliella tertiolecta* and its salt-sensitive mutant (HL 25/8). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, n. 9, p. 696-704, 9// 2007. ISSN 0981-9428. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0981942807001106> >.

HABERT, A. C.; BORGES, C.P.; NOBREGA, R. **Processos de separação por membranas**. Editora E-papers, 2006. ISBN 857650085X.

HADJ-ROMDHANE, F. et al. Development and validation of a minimal growth medium for recycling *Chlorella vulgaris* culture. **Bioresource Technology**, v. 123, n. 0, p. 366-374, 11// 2012. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096085241201139X> >.

_____. The culture of *Chlorella vulgaris* in a recycled supernatant: Effects on biomass production and medium quality. **Bioresource Technology**, v. 132, n. 0, p. 285-292, 3// 2013. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852413000485> >.

HANOTU, J.; BANDULASENA, H. C.; ZIMMERMAN, W. B. Microflotation performance for algal separation. **Biotechnology and bioengineering**, v. 109, n. 7, p. 1663-1673, 2012. ISSN 1097-0290.

HARUN, R. et al. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 3, p. 1037-1047, 4// 2010. ISSN 1364-0321. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032109002664> >.

HEASMAN, M. et al. Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs—a summary. **Aquaculture Research**, v. 31, n. 8-9, p. 637-659, 2000. ISSN 1365-2109.

HERMIA, J. Constant pressure blocking filtration law application to powder-law non-Newtonian fluid. **Trans. Inst. Chem. Eng.**, v. 60, p. 183-187, 1982.

HORIUCHI, J.-I. et al. Effective cell harvesting of the halotolerant microalga *Dunaliella tertiolecta* with pH control. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 95, n. 4, p. 412-415, // 2003. ISSN 1389-1723. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172303800786> >.

HUANG, C. et al. Harvesting of *Chlorella* sp. using hollow fiber ultrafiltration. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 5, p. 1416-1421, 2012/06/01 2012. ISSN 0944-1344. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-012-0812-5> >.

HUNG, M. T.; LIU, J. C. Microfiltration for separation of green algae from water. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 51, n. 2, p. 157-164, 8/15/ 2006. ISSN 0927-7765. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776506002116> >.

HWANG, T. et al. Harvesting of *Chlorella* sp. KR-1 using a cross-flow membrane filtration system equipped with an anti-fouling membrane. **Bioresource Technology**, v. 139, n. 0, p. 379-382, 7// 2013. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096085241300535X> >.

JAFFRIN, M. Y.; CHARRIER, J. P. Optimization of ultrafiltration and diafiltration processes for albumin production. **Journal of Membrane Science**, v. 97, n. 0, p. 71-81, 12/27/ 1994. ISSN 0376-7388. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037673889400148R> >.

JAFFRIN, M. Y. Dynamic shear-enhanced membrane filtration: A review of rotating disks, rotating membranes and vibrating systems. **Journal of Membrane Science**, v. 324, n. 1-2, p. 7-25, 10/31/ 2008. ISSN 0376-7388. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376738808006182> >.

JARENKOW, A. Estudo da produção e extração de lipídeos na microalga *Chlorella* sp., 2014.

JIN, E.; MELIS, A. Microalgal biotechnology: Carotenoid production by the green algae *Dunaliella salina*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 8, n. 6, p. 331-337, 2003/12/01 2003. ISSN 1226-8372. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF02949276> >.

KHAN, S. A. et al. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 9, p. 2361-2372, 2009. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032109000860> >.

KIM, J. et al. Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 6, p. 862-876, 11/1/ 2013. ISSN 0734-9750. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975013000773> >.

KIPPER DA SILVA; MAURÍCIO. **Biorreatores com membranas: uma alternativa para o tratamento de efluentes**. 2009. 196 Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

KNUCKEY, R. M. et al. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. **Aquacultural Engineering**, v. 35, n. 3, p. 300-313, 10// 2006. ISSN 0144-8609. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144860906000343> >.

LIMAYEM, I.; CHARCOSSET, C.; FESSI, H. Purification of nanoparticle suspensions by a concentration/diafiltration process. **Separation and Purification Technology**, v. 38, n. 1, p. 1-9, 7/15/ 2004. ISSN 1383-5866. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586603002612> >.

LIPNIZKI, F.; BOELSMAND, J.; MADSEN, R. F. Concepts of industrial-scale diafiltration systems. **Desalination**, v. 144, n. 1-3, p. 179-184, 9/10/ 2002. ISSN 0011-9164. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011916402003090> >.

LIVANSKY, K. et al. Influence of the nutrient solution recycling on the productivity of *Scenedesmus obliquus*, utilization of nutrients and water in outdoor cultures. **Archiv für Hydrobiologie. Supplementband, Algological studies**, v. 114, p. 105-113, 1996. ISSN 0342-1120.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. RiMa Rio de Janeiro, 2006.

LOSEVA, N. L. et al. The effect of AgNO₃ on the bioenergetic processes and the ultrastructure of *Chlorella* and *Dunaliella* cells exposed to different saline conditions. **Thermochimica Acta**, v. 458, n. 1-2, p. 71-76, 6/25/ 2007. ISSN 0040-6031. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040603107000950> >.

LOWRY, O. H. et al. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951. Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/193/1/265.short> >.

MADSEN, R. F. Design of sanitary and sterile UF- and diafiltration plants. **Separation and Purification Technology**, v. 22-23, n. 0, p. 79-87, 3/1/ 2001. ISSN 1383-5866. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586600001441> >.

MAH, S.-K. et al. Ultrafiltration of palm oil-oleic acid-glycerin solutions: Fouling mechanism identification, fouling mechanism analysis and membrane characterizations. **Separation and Purification Technology**, v. 98, n. 0, p. 419-431, 9/19/ 2012. ISSN 1383-5866. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586612004030> >.

MARIANO, A. B. Comparação de meios de cultivo autotróficos, mixotróficos e heterotróficos para produção de biomassa de microalgas com foco em biocombustíveis e co-produtos. In: 5º Congresso Internacional de Bioenergia, 2010, Curitiba.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217-232, 2009. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032109001646> >.

MCCABE, W. L.; SMITH, J. C.; HARRIOTT, P. **Unit operations of chemical engineering**. McGraw-Hill New York, 1993.

MOHN, F. H. Improved technologies for the harvesting and processing of microalgae and their impact on production costs. **Arch Hydrobiol, Beih Ergeb Limnol**, v. 1, p. 228-53, 1978.

MOLINA GRIMA, E. et al. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 7-8, p. 491-515, 1// 2003. ISSN 0734-9750. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975002000502> >.

MORINEAU-THOMAS, O.; JAOUEN, P.; LEGENTILHOMME, P. The role of exopolysaccharides in fouling phenomenon during ultrafiltration of microalgae (*Chlorella* sp. and *Porphyridium purpureum*): advantage of a swirling decaying flow. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 25, n. 1, p. 35-42, Apr 2002. ISSN 1615-7591 (Print)1615-7591.

MULDER, M. **Basic Principles of Membrane Technology Second Edition**. Kluwer Academic Pub, 1996. ISBN 0792342488.

OH, H.-M. et al. Harvesting of *Chlorella vulgaris* using a bioflocculant from *Paenibacillus* sp. AM49. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 15, p. 1229-1234, 2001/08/01 2001. ISSN 0141-5492. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1023/A:1010577319771> >.

OUKARROUM, A. et al. Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 78, n. 0, p. 80-85, 4/1/ 2012. ISSN 0147-6513. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651311004106> >.

PAPAZI, A.; MAKRIDIS, P.; DIVANACH, P. Harvesting *Chlorella minutissima* using cell coagulants. **Journal of applied phycology**, v. 22, n. 3, p. 349-355, 2010. ISSN 0921-8971.

PARK, J. B. K.; CRAGGS, R. J.; SHILTON, A. N. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 35-42, 1// 2011. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852410011636> >.

PORTAL BRASIL - Portal do governo brasileiro. Disponível em: http://www.brasil.gov.br/old/copy_of_imagens/revista-digital/edicao-3/dunaliella-1/view. Acesso em: 1 Jun. 2013

PRAGYA, N.; PANDEY, K. K.; SAHOO, P. K. A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 24, n. 0, p. 159-171, 8// 2013. ISSN 1364-0321. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032113001937> >.

RAWAT, I. et al. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3411-

3424, 10// 2011. ISSN 0306-2619. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306261910004885> >.

REDAELLI, C. Estudo da produção de lipídeos e carotenoides por *Chlorella minutissima* em fotobiorreator. 2012.

RIOS, S. D. et al. Dynamic microfiltration in microalgae harvesting for biodiesel production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 50, n. 4, p. 2455-2460, 2010. ISSN 0888-5885.

RÍOS, S. D. et al. Antifouling microfiltration strategies to harvest microalgae for biofuel. **Bioresource Technology**, v. 119, n. 0, p. 406-418, 9// 2012. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852412007882> >.

RIPPERGER, S.; ALTMANN, J. Crossflow microfiltration – state of the art. **Separation and Purification Technology**, v. 26, n. 1, p. 19-31, 1/1/ 2002. ISSN 1383-5866. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586601001137> >.

ROSSI, N. et al. Harvesting of *Cyanobacterium Arthrospira Platensis* Using Organic Filtration Membranes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 82, n. 3, p. 244-250, 9// 2004. ISSN 0960-3085. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960308504704393> >.

ROSSIGNOL, N. et al. Production of exocellular pigment by the marine diatom *Haslea ostrearia* Simonsen in a photobioreactor equipped with immersed ultrafiltration membranes. **Bioresource Technology**, v. 73, n. 2, p. 197-200, 6// 2000. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852499001716> >.

_____. Membrane technology for the continuous separation microalgae/culture medium: compared performances of cross-flow microfiltration and ultrafiltration. **Aquacultural Engineering**, v. 20, n. 3, p. 191-208, 8// 1999. ISSN 0144-8609. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144860999000187> >.

SALIM, S.; VERMUE, M. H.; WIJFFELS, R. H. Ratio between autoflocculating and target microalgae affects the energy-efficient harvesting by bio-flocculation. **Bioresource Technology**, v. 118, n. 0, p. 49-55, 8// 2012. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852412007493> >.

_____. Harvesting of microalgae by bio-flocculation. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 5, p. 849-855, 2011/10/01 2011. ISSN 0921-8971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-010-9591-x> >.

SANDER, K.; MURTHY, G. S. Life cycle analysis of algae biodiesel. **The International Journal of Life Cycle Assessment**, v. 15, n. 7, p. 704-714, 2010. ISSN 0948-3349.

SOARES, R. D. P.; SECCHI, A. R. EMSO: A new environment for modelling, simulation and optimisation. In: ANDRZEJ KRASLAWSKI AND ILKKA, T. (Ed.). **Computer Aided Chemical Engineering**: Elsevier, v. Volume 14, 2003. p.947-952. ISBN 1570-7946.

SONG, L. Flux decline in crossflow microfiltration and ultrafiltration: mechanisms and modeling of membrane fouling. **Journal of Membrane Science**, v. 139, n. 2, p. 183-200, 2/18/ 1998. ISSN 0376-7388. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376738897002639> >.

SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2// 2006. ISSN 1389-1723. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172306705497>>.

STAMATAKIS, K.; TIEN, C. A simple model of cross-flow filtration based on particle adhesion. **AIChE Journal**, v. 39, n. 8, p. 1292-1302, 1993. ISSN 1547-5905.

SUNG, K.-D. et al. CO₂ fixation by *Chlorella* sp. KR-1 and its cultural characteristics. **Bioresource Technology**, v. 68, n. 3, p. 269-273, 6// 1999. ISSN 0960-8524. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852498001527>>.

Sustainable Green Technologies Inc. - Algae FAQ. Disponível em: <http://sgth2.com/algae_faq>. Acesso em: 2 Jun. 2013.

TAKAGI, M.; KARSENKO; YOSHIDA, T. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 3, p. 223-226, 3// 2006. ISSN 1389-1723. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172306705709>>.

TANG, H. et al. Potential of microalgae oil from *Dunaliella tertiolecta* as a feedstock for biodiesel. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3324-3330, 10// 2011. ISSN 0306-2619. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306261910003788>>.

TERRY, K. L.; RAYMOND, L. P. System design for the autotrophic production of microalgae. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, n. 10, p. 474-487, 10// 1985. ISSN 0141-0229. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0141022985901486>>.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Artmed, 2012. ISBN 8536326980.

UDUMAN, N. et al. Dewatering of microalgal cultures: a major bottleneck to algae-based fuels. **Journal of Renewable and Sustainable Energy**, v. 2, n. 1, p. 012701, 2010. ISSN 1941-7012.

VANDAMME, D. et al. Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH: Role of magnesium and calcium and practical implications. **Bioresource Technology**, v. 105, n. 0, p. 114-119, 2// 2012. ISSN 0960-8524. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852411017160>>.

_____. Evaluation of electro-coagulation-flocculation for harvesting marine and freshwater microalgae. **Biotechnol Bioeng**, May 6 2011. ISSN 0006-3592.

VANDANJON, L. et al. Concentration and desalting by membrane processes of a natural pigment produced by the marine diatom *Haslea ostrearia* Simonsen. In: R. OSINGA, J. T. J. G. B. A. R. H. W. (Ed.). **Progress in Industrial Microbiology**: Elsevier, v. Volume 35, 1999. p.393-402. ISBN 0079-6352.

VELA, M. C. V. et al. Analysis of membrane pore blocking models applied to the ultrafiltration of PEG. **Separation and Purification Technology**, v. 62, n. 3, p. 489-498, 9/22/ 2008. ISSN 1383-5866. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586608001111>>.

VELIKOVSKA, P. et al. Suction effects on the hydrodynamics in the vicinity of an ultrafiltration plane ceramic membrane. **Journal of membrane science**, v. 240, n. 1, p. 129-139, 2004. ISSN 0376-7388.

WANG, B. et al. CO₂ bio-mitigation using microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 5, p. 707-718, 2008/07/01 2008. ISSN 0175-7598. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-008-1518-y> >.

WANG, L. et al. Mathematic model of the yield for diafiltration processes. **Separation and Purification Technology**, v. 59, n. 2, p. 206-213, 2/15/ 2008. ISSN 1383-5866. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586607002870> >.

WANG, X.-L.; ZHANG, C.; OUYANG, P. The possibility of separating saccharides from a NaCl solution by using nanofiltration in diafiltration mode. **Journal of Membrane Science**, v. 204, n. 1, p. 271-281, 2002. ISSN 0376-7388.

WICAKSANA, F. et al. Microfiltration of algae (*Chlorella sorokiniana*): Critical flux, fouling and transmission. **Journal of Membrane Science**, v. 387-388, n. 0, p. 83-92, 1/1/ 2012. ISSN 0376-7388. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376738811007630> >.

WIDJAJA, A.; CHIEN, C.-C.; JU, Y.-H. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 40, n. 1, p. 13-20, 1// 2009. ISSN 1876-1070. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876107008001429> >.

WU, J.-T. et al. Cytotoxic effects of free fatty acids on phytoplankton algae and cyanobacteria. **Aquatic Toxicology**, v. 80, n. 4, p. 338-345, 12/30/ 2006. ISSN 0166-445X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X06003705> >.

WU, T. Y. et al. Palm oil mill effluent (POME) treatment and bioresources recovery using ultrafiltration membrane: Effect of pressure on membrane fouling. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, n. 3, p. 309-317, 8/1/ 2007. ISSN 1369-703X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X07000484> >.

WU, Z. et al. Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium. **Bioresource Technology**, v. 110, n. 0, p. 496-502, 4// 2012. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852412001253> >.

XU, H.; MIAO, X.; WU, Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 126, n. 4, p. 499-507, 12/1/ 2006. ISSN 0168-1656. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165606003853> >.

YANG, J. et al. Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: Water footprint and nutrients balance. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 159-165, 1// 2011. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852410012058> >.

YOON, R. H.; LUTTRELL, G. H. The effect of bubble size on fine particle flotation. **Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review**, v. 5, n. 1-4, p. 101-122, 1989. ISSN 0882-7508.

YU, Y. et al. Accumulation characteristics of soluble algal products (SAP) by a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. LX1 during batch cultivation for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 110, n. 0, p. 184-189, 4// 2012. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852411016348> >.

ZENG, X. et al. Microalgae bioengineering: From CO₂ fixation to biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 6, p. 3252-3260, 8// 2011. ISSN 1364-

0321. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032111001511> >.

ZHANG, X. et al. Harvesting algal biomass for biofuels using ultrafiltration membranes. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5297-5304, 7// 2010. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852410002786> >.

ZIMMERMAN, W. B. et al. Design of an airlift loop bioreactor and pilot scales studies with fluidic oscillator induced microbubbles for growth of a microalgae *Dunaliella salina*. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3357-3369, 10// 2011. ISSN 0306-2619. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306261911001127> >.