



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

ENG 07053 – TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**ESTUDO DA EFICIÊNCIA DE DIFERENTES AGENTES
COAGULANTES NA SEDIMENTAÇÃO DE MICROALGAS
CULTIVADAS EM FOTOBIOREATORES**

Autor: Allan Valcareggi Morcelli

**Orientadores: Prof. Dr. Rafael de Pelegrini Soares
Prof^a. Dr^a. Rosane Rech**

Junho de 2011

Agradecimentos

Um agradecimento especial é merecido àqueles que muito contribuíram à minha formação acadêmica dentro da pesquisa no Departamento de Engenharia Química. Entre eles, agradeço a Jefferson Diel, Camila Baldasso e Débora Faccin pela amizade e ensinamentos que tornaram tão positivas as experiências de bolsa de iniciação científica. De forma semelhante, agradeço às professoras Isabel Tessaro, Lígia Damasceno e Aline Cassini pelo incentivo e companheirismo que marcaram aquela primeira experiência na pesquisa e que permanecem até hoje.

Agradeço muito àqueles diretamente envolvidos na realização deste trabalho. À professora Rosane Rech por sempre ter me auxiliado com tamanho interesse e prontidão e por ter viabilizado a realização de todos os experimentos. Ao professor Rafael Pelegrini Soares por ter se mostrado sempre tão interessado em auxiliar e ter me recebido sempre de forma tão aberta. A Cristiane Redaelli, André Jarenkow, Tobias Dierings e Géssica Roman pela ajuda e especialmente pela amizade que tornou todos os dias no laboratório muito mais prazerosos. Gostaria ainda de agradecer a todas as gurias do ICTA que contribuíram em vários momentos para a realização dos experimentos.

Aos professores do DEQUI, que são os responsáveis por todo o conhecimento adquirido, fica o meu “muito obrigado” pela seriedade e dedicação. Aos colegas de curso, obrigado pela convivência e pela amizade durante esses cinco anos. Aos meus pais, obrigado por tudo, vocês tornaram possível chegar até aqui.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| LISTA DE FIGURAS | 5 |
| LISTA DE TABELAS | 6 |
| LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS..... | 7 |
| RESUMO | 8 |
| 1. Introdução | 10 |
| 1.1. Microalgas como recurso para produção de biocombustíveis e demais aplicações | 11 |
| 2. Fundamentos teóricos e revisão bibliográfica..... | 15 |
| 2.1. Centrifugação..... | 15 |
| 2.2. Sedimentação por gravidade..... | 16 |
| 2.3. Floculação..... | 16 |
| 2.3.1. Autofloculação..... | 17 |
| 2.3.2. Coagulação química | 17 |
| 2.3.3. Coagulantes inorgânicos..... | 17 |
| 2.3.4. Flocculantes orgânicos. | 18 |
| 2.3.5. Floculação combinada. | 19 |
| 2.4. Peneiramento | 19 |
| 2.5. Filtração de biomassa | 20 |
| 2.6. O processo eletrolítico | 21 |
| 2.7. Colheita por flotação | 21 |
| 2.7.1. Flotação com ar dissolvido (FAD) | 22 |
| 2.7.2. Flotação com ar disperso | 22 |
| 2.8. Comparação entre alguns dos métodos | 22 |
| 3. Materiais e Métodos..... | 24 |
| 3.1. Microrganismo e condições de cultivo..... | 24 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.2. | Ensaio de sedimentação | 26 |
| 3.3. | Análise da influência da utilização do Sulfato de Alumínio como agente coagulante no teor de pigmentos e lipídios | 29 |
| 3.3.1. | Análise de Pigmentos | 29 |
| 3.3.2. | Análise de Lipídios | 31 |
| 4. | Resultados e Discussão | 33 |
| 4.1. | Escolha do agente coagulante com a melhor eficiência de coagulação | 33 |
| 4.2. | Análise de pigmentos e lipídios totais | 37 |
| 5. | Conclusões e sugestões para trabalhos futuros | 41 |
| 6. | Referências Bibliográficas | 42 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Eficiência de Coagulação ao longo do tempo para o Sulfato de Alumínio nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 g/L. | 33 |
| Figura 2: Eficiência de Coagulação ao longo do tempo para o Cloreto Férrico nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 g/L. | 34 |
| Figura 3: Eficiência de Coagulação ao longo do tempo para o Sulfato de Zinco nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 g/L. | 34 |
| Figura 4: Eficiência de Coagulação ao longo do tempo para o último ensaio realizado, utilizando Sulfato de Alumínio nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5g/L em duplicata..... | 36 |
| Figura 5: Cromatograma obtido para a amostra de pigmentos oriundos do cultivo que não sofreu adição do agente coagulante..... | 37 |
| Figura 6: Cromatograma obtido para a amostra de pigmentos oriundos do cultivo que sofreu adição do agente coagulante..... | 38 |
| Figura 7: Cromatograma obtido para a amostra de duplicata de pigmentos oriundos do cultivo que sofreu adição do agente coagulante. | 38 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Concentrações de biomassa, água destilada e agentes coagulantes utilizadas nos ensaios de sedimentação..... | 28 |
| Tabela 2: Gradiente da fase móvel composta por Água, Metanol e Éter tert-metil-butílico utilizado para análises no HPLC. | 31 |
| Tabela 3: Concentração de pigmentos obtida para a amostra sem adição de coagulante e média da concentração para amostras com adição de coagulante..... | 39 |
| Tabela 4: Teor de lipídios obtido para amostras com e sem a adição de agente coagulante em duplicatas..... | 39 |

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ε (%) – Eficiência de Coagulação (%)

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

FAD - Flotação com ar dissolvido

HPLC – Cromatografia líquida de alta precisão

MTBE - Éter Metil Terbutílico

OD₅₇₀ – Densidade ótica lida a 570 nm

X – Biomassa (g/L)

RESUMO

No atual cenário da produção energética mundial, dois importantes problemas surgem, um deles concernente às questões ambientais, em que se destaca o aquecimento global, e o outro, concernente à crise energética ligada à escassez de combustíveis fósseis e à não-sustentabilidade desta matriz energética.

A redução do acúmulo de CO₂, principal responsável pelo efeito estufa, na atmosfera pode ser obtida através de métodos conceitualmente diferentes. Neste contexto, microalgas se destacam pelo potencial de aplicação na redução do uso de combustíveis fósseis, remoção do CO₂ da atmosfera e a captura e seqüestro ou utilização do CO₂ liberado antes que este entre na atmosfera.

A produção de combustível a partir de microrganismos fotossintetizantes é um processo renovável que utiliza a energia solar. Se lipídios forem extraídos de microalgas eficientemente, estas podem ser utilizadas como fonte de energia no lugar dos combustíveis fósseis.

Em adição, espera-se que a fixação biológica de CO₂ aliada à produção de energia seja uma medida capaz de desacelerar o aumento da concentração de CO₂ na atmosfera e sirva de ferramenta para evitar uma crise energética.

Uma colheita eficiente de biomassa a partir do cultivo em suspensão é essencial para produção de combustível a partir de microalgas. As principais técnicas atualmente aplicadas na coleta de microalgas incluem centrifugação, floculação, peneiramento, sedimentação por gravidade, flotação, e técnicas de eletroforese.

Neste trabalho foi testada a técnica de sedimentação com o auxílio dos agentes coagulantes sulfato de alumínio, sulfato de zinco e cloreto férrico para a espécie de microalga *Dunaliella tertiolecta*. Para tal, foram realizados ensaios de sedimentação em que a concentração destes sais foi variada e acompanhou-se eficiência de coagulação por espectrofotometria ao longo do tempo.

Em uma segunda etapa, o agente coagulante que exibiu o melhor desempenho (sulfato de alumínio) teve sua influência avaliada quanto à possibilidade de perdas na concentração

dos pigmentos Luteína, Zeaxantina e β -Caroteno na biomassa bem como perdas no teor de lipídios. Para a análise de pigmentos, foi utilizada cromatografia líquida de alta precisão, enquanto para a análise do teor de lipídios foi utilizada técnica de extração por *soxhlet*.

Os resultados da etapa de seleção do melhor agente coagulante apontaram o sulfato de alumínio como o melhor sal, que apresentou valores consideravelmente altos de eficiência de coagulação, tendo como concentração ideal 0,25 g/L para suspensão de biomassa com densidade ótica a 570 nm igual a 0,8, correspondente a uma concentração de 0,24 g/L. Tanto a análise da concentração de pigmentos como a de teor de lipídios levaram a resultados que apontaram a diminuição das concentrações para a metade dos valores encontrados para a biomassa que não sofreu adição de agente coagulante, sendo somente centrifugada. No entanto, discute-se a possibilidade de tais resultados não evidenciarem, de fato, uma redução nas reais concentrações dos componentes analisados, podendo estes resultados ter sido reduzidos pela presença do próprio sulfato de alumínio na biomassa obtida ao final.

1. Introdução

No atual cenário da produção energética mundial, dois importantes problemas surgem, um deles concernente às questões ambientais, em que se destaca o aquecimento global, e o outro, concernente à crise energética ligada à escassez de combustíveis fósseis e à não-sustentabilidade desta matriz energética.

Segundo Brennan et al (2009), em 2008, o consumo primário de energia anual mundial era estimado em 11.295 milhões de toneladas equivalentes de petróleo. Combustíveis fósseis eram responsáveis por 88% deste consumo, constando petróleo (35%), carvão (29%) e gás natural (24%) como principais fontes de energia deste grupo, e energia nuclear e hidrelétrica, por sua vez, correspondendo a 5% e 6% do consumo primário total de energia, respectivamente. Dado o atual progresso tecnológico, a existência de reservas em potencial e o aumento da exploração de novas reservas menos convencionais (como ocorre para o gás natural), é altamente provável que combustíveis fósseis permaneçam disponíveis por um longo período.

O grupo de acidentes em usinas nucleares japonesas decorrente da ação de terremotos na região em 2011 repercutiu negativamente na confiança da população bem como na de investidores quanto ao uso de energia nuclear. Esta se mostrava até então como uma tendência de alternativa energética, crescendo especialmente em países de primeiro mundo, mas deverá exibir decréscimo notável no futuro próximo. Novamente, tem-se o fortalecimento do uso de combustíveis fósseis.

Infelizmente, cresce a ameaça em potencial à estabilidade climática mundial trazida pela utilização de tais combustíveis ligada à liberação de uma quantidade muito alta de gases poluentes e ao agravamento do efeito estufa. As projeções existentes associadas às mudanças climáticas futuras apontam conseqüências preocupantes à natureza bem como ao homem, fato que gera incerteza em relação à sustentabilidade do atual uso de combustíveis fósseis, não somente quanto à escassez destes recursos, mas também quanto aos efeitos negativos trazidos pelas emissões de CO₂.

Combustíveis fósseis são os maiores responsáveis pela emissão de gases do efeito estufa à biosfera. O Protocolo de Kyoto de 1997 reivindicou uma redução de 5,2% em

comparação a valores datados de 1990 nas emissões destes gases em todo mundo. A fim de cumprir com esta meta acordada, o desenvolvimento de uma variedade de tecnologias que buscam a redução de emissões e a retirada do CO₂ da atmosfera tem sido alvo de pesquisa.

A redução do acúmulo de CO₂, principal responsável pelo efeito estufa, na atmosfera pode ser obtida através de três métodos conceitualmente diferentes: redução do uso de combustíveis fósseis, remoção do CO₂ da atmosfera e a captura e seqüestro ou utilização do CO₂ liberado antes que este entre na atmosfera.

A produção de combustível a partir de microrganismos fotossintetizantes é um processo renovável que utiliza a energia solar. Neste contexto, energia proveniente de biomassa contribuiria para a estabilização do suprimento energético e se apresenta como um recurso altamente promissor. Segundo o trabalho de Amin, S. (2009), entre as biomassas, as microalgas normalmente apresentam uma eficiência fotossintética superior às demais. Se lipídios forem extraídos destas eficientemente, microalgas podem ser utilizadas como fonte de energia no lugar dos combustíveis fósseis.

Em adição, espera-se que a fixação biológica de CO₂ aliada à produção de energia seja uma medida capaz de desacelerar o aumento da concentração de CO₂ na atmosfera e sirva de ferramenta para evitar uma crise energética. É conhecido que microalgas podem assimilar o gás CO₂ como fonte de carbono para seu crescimento. O processo mostra-se promissor quando comparado a abordagens físicas e químicas já experimentadas com este objetivo.

Microalgas contêm lipídios e ácidos graxos nos componentes de suas membranas, metabólitos e produtos de armazenamento e fontes de energia. Por isso, além da capacidade de fixação de CO₂, a utilização de microalgas ganha valor, uma vez que lipídios produzidos pelos microrganismos podem ser convertidos a ésteres na fabricação de biodiesel ou ainda pode-se queimar este “bio-óleo” para produzir energia.

1.1. Microalgas como recurso para produção de biocombustíveis e demais aplicações

As informações referentes à utilização de microalgas contidas neste subitem foram retiradas do artigo de Brennan et al (2009).

Nos últimos anos, o uso de biocombustíveis líquidos no setor dos transportes mostrou rápido crescimento global, impulsionado principalmente por políticas focadas na obtenção de segurança energética e mitigação de gases causadores do efeito estufa. Biocombustíveis de primeira geração que já atingiram níveis econômicos de produção foram extraídos principalmente de culturas alimentares e do petróleo, incluindo óleo de canola, beterraba, açúcar de cana e do milho, bem como óleos vegetais e gorduras animais, utilizando tecnologia convencional.

Prevê-se que o crescimento da produção e consumo de biocombustíveis líquidos continuarão, mas o seu impacto no sentido de cumprir a demanda de energia global no setor dos transportes continuará a ser limitado devido à concorrência no uso de terras aráveis com o setor de produção de alimentos e fibras, estruturas de mercado regionais engessadas, falta de práticas agrícolas bem gerenciadas nas economias emergentes, alta necessidade de água e fertilizantes, e a necessidade de conservação da biodiversidade. Conforme descrito, o uso de biocombustíveis de primeira geração tem gerado uma série de controvérsias, principalmente devido ao seu impacto nos mercados globais de alimentos.

Condições para que um recurso seja técnica e economicamente viável para a produção de biocombustíveis são: ele deve apresentar custo competitivo ou inferior àquele dos combustíveis derivados do petróleo, deve exigir baixo ou nenhum uso de terra adicional, deve permitir a melhoria da qualidade do ar (por exemplo, sequestro de CO₂), e deve exigir mínimo uso de água. Desta forma, o cultivo de microalgas para a produção de biocombustíveis pode atender a essas condições e, portanto, fazer uma contribuição significativa para atender a demanda de energia primária, simultaneamente, proporcionando benefícios ambientais.

Entre as numerosas vantagens da utilização de biocombustíveis derivados de microalgas podem ser citadas as seguintes:

- A produção de microalgas é possível durante todo o ano;
- A produção de óleo a partir de culturas de microalgas excede o rendimento das melhores oleaginosas. Tem-se como exemplo a produção de biodiesel em cultivos abertos de 12.000 L/ha de microalgas em comparação com 1.190 L/ha de colza;
- Seu cultivo se dá em meio aquoso, mas precisam de menos água do que as culturas terrestres, portanto reduzindo a carga sobre as fontes de água doce;

- Microalgas podem ser cultivadas em águas salobras em terras não-aráveis e, portanto, podem não influenciar na mudança do uso ao qual são destinadas estas terras, minimizando os impactos ambientais associados, não comprometendo a produção de alimentos e outros produtos derivados das culturas;
- Microalgas têm potencialmente um rápido crescimento e muitas espécies possuem teor de óleo na faixa de 20-50% do peso seco da biomassa. As taxas de crescimento na fase exponencial são altas, podendo dobrar sua biomassa em períodos tão curtos como 3,5 h;
- No que diz respeito à manutenção e melhoria da qualidade do ar, a produção de biomassa de microalgas pode ser aplicada na biofixação de CO₂ efluente de processos industriais (1 kg de massa seca de microalgas pode utilizar até cerca de 1,83 kg de CO₂);
- Nutrientes para o cultivo de microalgas (principalmente nitrogênio e fósforo) podem ser obtidos a partir de águas residuais. Portanto, além da utilização como meio de cultivo, encontra-se um potencial duplo no tratamento de efluentes orgânicos da indústria agro-alimentícia;
- O cultivo de algas não exige herbicidas ou aplicação de agrotóxicos;
- O cultivo de microalgas também pode produzir valiosos co-produtos, tais como proteínas e biomassa residual após extração de óleo, que pode ser utilizado como alimento ou fertilizante, ou fermentados para produzir etanol ou metano;
- A composição bioquímica da biomassa das algas pode ser modulada pela variação das condições de crescimento. Portanto, o rendimento de óleo pode ser significativamente aumentado;
- Microalgas são capazes da produção fotobiológica de “biohidrogênio”.

A combinação descrita do potencial de produção de biocombustíveis, fixação de CO₂, a produção de biohidrogênio, e do tratamento biológico de águas residuais enfatiza o potencial de aplicações de microalgas.

Apesar do inerente potencial das microalgas como matéria-prima para produção de biocombustíveis, muitos desafios têm impedido o desenvolvimento de tecnologias que tornem sua produção e utilização comercialmente viáveis. Eles incluem:

- A seleção de espécies deve balancear requisitos referentes à capacidade de produção de biocombustível e a extração de sub-produtos de valor agregado;
- Necessidade de obtenção de maiores eficiências fotossintéticas através do desenvolvimento de sistemas de produção contínua;
- Desenvolvimento de técnicas para cultivo de espécies específicas, redução de evaporação e de perdas na difusão de CO₂;
- Possibilidade de o balanço de energia evidenciar um gasto energético maior relacionado a requisitos de bombeamento de água, transferência de CO₂, colheita e extração que a geração de energia pela queima do combustível produzido;
- Existência de poucas plantas comerciais em operação, e portanto, falta de dados para projeto de plantas em larga escala;
- Incorporação de gases que são impróprios em alta concentração, devido à presença de compostos tóxicos, tais como NO_x e SO_x.

2. Fundamentos teóricos e revisão bibliográfica

Colheita eficiente de biomassa a partir do cultivo em suspensão é essencial para produção de biodiesel a partir de microalgas. As principais técnicas atualmente aplicadas na coleta de microalgas incluem centrifugação, floculação, peneiramento, sedimentação por gravidade, flotação, e técnicas de eletroforese (Uduman et al., 2010). O custo da colheita das algas pode ser elevado, uma vez que a fração em massa na cultura em suspensão é geralmente baixa, enquanto as células normalmente carregam cargas negativas e excesso de matéria orgânica para manter sua estabilidade de forma dispersa (Danquah et al., 2009).

A seleção de técnica de colheita é dependente das propriedades de microalgas, tais como densidade, tamanho, e o valor do produto desejado (Brennan et al., 2009).

Uma breve exposição sobre os variados processos de separação disponíveis atualmente para a colheita de microalgas segue a seguir.

2.1. Centrifugação

A maioria das microalgas podem ser recuperadas a partir do cultivo em suspensão usando centrifugação. Ensaios de centrifugação de laboratório foram realizados em efluentes de lagoas e mostraram que cerca de 80-90% das microalgas podem ser recuperadas dentro de 2 a 5 min. A recuperação por centrifugação é o método preferido para a colheita de metabólitos de alto valor agregado. Trata-se de um processo rápido, que demanda uma quantidade muito alta de energia. A recuperação de biomassa depende das características de sedimentação das células, o tempo de residência da suspensão ou lodo na centrífuga e a altura a ser “vencida” pela sedimentação. As desvantagens do processo incluem altos custos de energia e manutenção potencialmente maior devido à presença de peças movimentando-se livremente. Eficiências de colheita superiores a 95%, e aumento na concentração da solução de até 150 vezes para teor total de sólidos de 15% em suspensão são tecnicamente viáveis.

Grima et al. (2003) concluiu que a centrifugação é o método preferido para a colheita da biomassa de microalgas. Knuckey et al. (2006) afirma que a exposição de células de

microalgas a altas forças gravitacionais e de cisalhamento podem danificar a estrutura celular. Além disso, o processamento de um grande volume de cultura através de centrifugação é demorado e caro (Grima et al., 2003).

2.2. Sedimentação por gravidade

Métodos de sedimentação por gravidade e por centrifugação são baseados na Lei de Stokes, ou seja, a forma na qual os sólidos em suspensão irão se depositar será determinada pela densidade e raio das células e, por consequência, sua velocidade de sedimentação. A sedimentação por gravidade é a técnica mais comum de colheita para biomassa de algas no tratamento de água devido aos grandes volumes tratados e do baixo valor da biomassa gerada (Nurdogan e Oswald, 1996). No entanto, o método é adequado apenas para grandes microalgas como as do gênero *Arthrospira* (anteriormente conhecido como *Spirulina*).

Sedimentação por gravidade é comumente aplicada para a separação de microalgas no tratamento de água e de efluentes. A densidade e o raio das células das algas e a velocidade de sedimentação induzida por tais influenciam na característica de deposição dos sólidos em suspensão segundo Brennan e Owende (2010). A colheita das microalgas por sedimentação pode ser conseguida através de separadores de lamela e tanques de sedimentação (Uduman et al., 2010). A floculação é frequentemente usada para aumentar a eficiência de sedimentação por gravidade. O sucesso da remoção de sólidos por este método depende muito da densidade das partículas de microalgas. (Edzwald et al., 1995) constatou que partículas de microalgas de baixa densidade não assentam bem e não são separadas com sucesso via sedimentação gravitacional.

2.3. Floculação

A floculação é um processo no qual partículas dispersas são agregadas para formar partículas de maior tamanho que se depositam. As variadas formas de se obter floculação são discutidas a seguir.

2.3.1. Autofloculação

Autofloculação ocorre como resultado da precipitação de sais carbonatos com células de algas em pH elevado por consequência do consumo de CO₂ das algas na fotossíntese (Sukenik et al., 1985). Assim, o cultivo prolongado sob luz solar com fornecimento limitado de CO₂ auxilia na autofloculação de células de algas para a colheita. Experimentos de laboratório também revelaram que autofloculação pode ser simulada pela adição de NaOH para alcançar certos valores de pH.

2.3.2. Coagulação química

Adição de produtos químicos na cultura de microalgas para induzir a floculação é uma prática comum como estágio de pré-tratamento em diversos processos de separação sólido-líquido, e é aplicável ao tratamento de grandes quantidades de vários tipos de espécies de microalgas (Lee et al., 1998). Existem duas principais classificações de flocculantes de acordo com as suas composições: (1) flocculantes inorgânicos e (2) flocculantes orgânicos / flocculantes de polieletrólito. A utilização de microrganismos para recuperar microalgas também tem sido investigada, com (Oh et al., 2001) estudando o uso de *Paenibacillus sp.* AM49 para a colheita efetiva de microalgas.

2.3.3. Coagulantes inorgânicos.

Células de microalgas são negativamente carregadas como resultado da adsorção de íons provenientes de matéria orgânica e dissociação ou ionização de grupos funcionais superficiais (Uduman et al., 2010). Ao interromper a estabilidade do sistema, uma colheita de microalgas bem-sucedida pode ser obtida. Adição de um coagulante, como coagulantes à base de ferro ou à base de alumínio, irá neutralizar ou reduzir a carga de superfície (Grima et al., 2003). Como exemplo, alúmen foi utilizado para a colheita de *Scenedesmus* e *Chlorella* via carga neutralização (Grima et al., 2003). Microalgas podem também ser flocculadas por flocculantes

inorgânicos em pH suficientemente baixo (Uduman et al., 2010). No entanto, apesar das suas vantagens, a coagulação com coagulantes inorgânicos sofre as seguintes desvantagens:

1. Uma grande concentração de floculante inorgânico é necessária para causar separação sólido-líquido de microalgas, produzindo assim uma grande quantidade de lodo;
2. O processo é altamente sensível ao nível de pH;
3. Embora alguns coagulantes possam funcionar para algumas espécies de microalgas, eles não funcionam para outras;
4. O produto final é contaminado pelo metal ou sais adicionados.

2.3.4. Floculantes orgânicos.

Floculantes orgânicos também podem ser utilizados como auxiliares na sedimentação de microalgas. Tem-se que a adição de um polímero de alto peso molecular causa o aumento do tamanho dos flocos e melhora a sedimentação de microalgas (Edzwald et al., 1995). Pushparaj et al. (1993) mostrou em seu trabalho que floculação por sulfato de alumínio seguido pelos polieletrólitos corretos é eficaz na colheita das microalgas, enquanto Bilanovic et al. (1988) mostrou que os floculantes mais eficazes para a recuperação das microalgas são floculantes catiônicos. Foi demonstrado que polieletrólitos aniônicos e não-iônicos falham em flocular microalgas, o que é explicado pela repulsão entre as cargas existentes ou pela distância insuficiente para que as partículas se liguem. Ainda existem floculantes orgânicos biodegradáveis, tais como a quitosana, os quais são produzidos a partir de fontes naturais que não contaminam a biomassa de microalgas (Divakaran e Pillai, 2002).

O peso molecular do polímero, a densidade de carga das moléculas, a dosagem, a concentração de biomassa de microalgas, a força iônica e o pH da suspensão, e o grau de mistura no fluido são parâmetros que mostraram ter influência na eficiência de floculação alcançada (Grima et al., 2003). Para alcançar a sedimentação eficaz, o tamanho de floco deve ser maior que 100 μm .

Bilanovic et al. (1988) observou que a flocculação por polímeros catiônicos pode ser inibida pela alta salinidade de um ambiente marinho. Polieletrólitos de alto peso molecular são geralmente melhores agentes para a neutralização das cargas. A alta concentração de biomassa na suspensão também ajuda a flocculação devido aos encontros frequentes entre células. Misturar em baixo nível é, portanto, útil, pois ajuda a agrupar as células, mas excessivas forças de cisalhamento podem causar rompimento dos flocos. Além de todos os fatores mencionados anteriormente, os grupos funcionais na parede celular das microalgas são importantes, porque estimulam a formação de centros de carga negativa na superfície celular (Uduman et al., 2010).

2.3.5. Flocculação combinada.

Um processo de flocculação combinado é um processo que se dá em mais de um estágio, envolvendo mais de um tipo de floculante. Sukenik et al. (1988) estudaram um processo de flocculação combinado com microalgas marinhas. Para induzir a flocculação na água do mar, dois métodos foram encontrados. A primeira é combinar polieletrólitos com floculantes inorgânicos, tais como o cloreto férrico ou alumínio, e a segunda é a oxidação por ozônio seguido pela adição de floculante. Muylaert et al. (2009) evidenciou a viabilidade da utilização de amido catiônico para flocculação de ambas as microalgas de água doce e microalgas de água marinha.

2.4. Peneiramento

Grima et al. (2003) revisaram opções de processos de colheita para recuperar biomassa e os custos econômicos envolvidos. Na técnica de peneiramento, a suspensão é forçada através de uma tela com um tamanho particular de poro. Microstrainers e filtros de tela vibratórios são dois dos principais dispositivos de peneiramento na colheita de microalgas. Microstrainers podem ser descritos como filtros rotativos com telas de malha fina, que são operados com frequentes retrolavagens. Uma alta concentração de microalgas pode resultar no bloqueio da tela, enquanto que uma baixa concentração de microalgas pode resultar na captação ineficiente (Wilde et al., 1991). Microstrainers apresentam várias

vantagens, como a simplicidade na função e na construção, operação fácil, baixo investimento, abrasão insignificante como resultado da ausência de peças movendo-se rapidamente, sendo, no entanto, elevada a demanda energética e tendo altas razões de filtração. Grima et al. (2003) verificaram que os filtros que operam sob pressão ou no vácuo são capazes de recuperar microalgas relativamente bem, embora não se possa aplicá-los para os organismos aproximando dimensões bacterianas.

2.5. Filtração de biomassa

Um processo de filtração convencional é mais apropriado para colheita de microalgas relativamente grandes (dimensões superiores a 70 μm) como para os gêneros *Coelastrum* e *Arthrospira*. Não pode ser usado para a colheita de espécies de algas que se aproximem da dimensão de bactérias (inferiores a 30 μm), como *Scenedesmus*, *Dunaliella* e *Chlorella* (Mohn, 1980).

Filtração convencional opera sob pressão ou sucção, e auxiliares de filtração tais como terra diatomácea ou celulose podem ser usados para melhorar a eficiência. Mohn (1980) demonstrou que os processos de filtração podem atingir um fator de concentração de 245 vezes a concentração original para *Coelastrum proboscideum* para produzir um lodo com 27% de sólidos.

Para a recuperação de algas de menor tamanho de células (<30 μm), a micro e a ultra-filtração por membranas (processos que utilizam como força motriz a aplicação de pressão através de membranas densas ou porosas) são alternativas tecnicamente viáveis à filtração convencional (Petrusevski et al., 1995). É apropriado para as células frágeis que exigem pressão trans-membrana baixa e velocidade de escoamento tangencial baixa. Para o processamento de pequenos volumes de microalgas (inferior a 2 m^3/dia), a filtração por membranas pode ser mais rentável em comparação com a centrifugação. Devido ao custo de substituição da membrana e de bombeamento em grandes escalas de produção (acima de 20 m^3/dia), a centrifugação pode ser um método mais econômico de colheita de biomassa. Segundo Petrusevski et al. (1995), a filtração tangencial recuperou 70-89% na aplicação para algas de água doce. Além disso, tem-se como vantagem o fato de a filtração de fluxo tangencial manter a estrutura, as propriedades e a motilidade das microalgas coletadas.

2.6. O processo eletrolítico

Mecanismos para eletrocoagulação envolvem três etapas consecutivas: (1) geração de coagulantes por oxidação eletrolítica de um eletrodo de sacrifício, (2) desestabilização das partículas em suspensão e quebra de emulsão, e (3) agregação da fase desestabilizada para formar flocos. Azarian et al. (2007) investigou a remoção de microalgas de águas residuais industriais utilizando fluxo de eletrocoagulação contínuo. Diferente de coagulação eletrolítica, floculação eletrolítica não requer o uso de eletrodos de sacrifício. Floculação eletrolítica funciona com base no movimento de microalgas para o ânodo, a fim de neutralizar a carga resultante e, em seguida, formam agregados. Poelman et al. (1997) mostrou que a eficiência de remoção de algas é de 80-95% quando floculação eletrolítica é aplicada.

2.7. Colheita por flotação

Métodos de flotação são baseados no aprisionamento das células de algas utilizando micro-bolhas de ar dispersas no cultivo e, portanto, ao contrário da floculação, não requerem qualquer adição de produtos químicos. Algumas cepas naturalmente flutuam na superfície da água conforme o conteúdo de lipídios das microalgas aumenta. Embora a flotação tenha sido mencionada como um potencial método de colheita, as evidências da sua viabilidade técnica ou econômica são limitadas. A flotação é um processo de separação por gravidade em que as bolhas de ar ou gás aderem às partículas sólidas e, em seguida, levam-nas para a superfície do líquido. Chen et al. (2010) observou que a flotação é mais benéfica e eficaz do que a sedimentação no que diz respeito à separação de microalgas. Flotação pode capturar partículas com diâmetro inferior a 500 μm pela colisão entre uma bolha e uma partícula e a subsequente adesão (Luttrell et al., 2000)

Baseado no tamanho das bolhas utilizadas no processo de flotação, as aplicações podem ser divididas em flotação por ar dissolvido (FAD), flotação dispersa e flotação eletrolítica.

2.7.1. Flotação com ar dissolvido (FAD)

A FAD implica na redução da pressão de um fluxo de água que é pré-saturada com ar a pressões superiores para produzir bolhas de 10 a 100 μm (Uduman et al., 2010). Fatores determinantes na colheita de microalgas via flotação com ar dissolvido incluem a pressão do tanque, a taxa de reciclo, o tempo de retenção e a taxa de flotação das partículas. Floculação química tem sido usada juntamente com FAD para separar microalgas (Uduman et al., 2010). Floculação de microalgas usando oxigênio dissolvido que é produzido fotossinteticamente também foi estudada após floculação utilizando sais de alumínio ou polímeros C-31 (Koopman e Lincoln, 1983), e cerca de 80-90% de remoção de microalgas foi obtida quando uma concentração aproximada de flotação de 16 mg / L de de microalgas foi usado. Edzwald (1993) constatou que a FAD removeu microalgas de forma mais eficaz do que a sedimentação, embora floculação tenha sido utilizada como pré-tratamento neste último processo.

2.7.2. Flotação com ar disperso

Flotação com ar disperso implica na formação de bolhas de 700-1.500 μm através de um agitador mecânico de alta velocidade com um sistema de injeção de ar (Rodrigues e Rubio, 2007). Chen et al. (1998) compararam a eficiência de flotação de microalgas por ar disperso com três coletores e observou que existe uma disparidade na eficiência de remoção de microalgas da espécie *Scenedesmus quadricauda* entre agentes catiônico, aniônicos e não-iônicos. Eles atribuem essas diferenças às mudanças na hidrofobicidade com a adsorção no coletor.

2.8. Comparação entre alguns dos métodos

Gouleke e Oswald (1965) compararam a remoção de algas utilizando filtração, centrifugação, flotação, precipitação, troca iônica, passagem através de uma zona carregada, e vibração ultra-sônica. Eles concluíram que apenas centrifugação e precipitação química são

opções economicamente viáveis, com centrifugação, sendo marginalmente melhor. Um método de colheita ideal de algas para a produção de biocombustíveis deve ser independente da espécie e usar mínimos produtos químicos e energia. Sedimentação por gravidade só é adequado para a colheita de microalgas de grande porte, como a *Arthrospira*. A fim de reforçar a separação de microalgas e ter-se uma alta taxa de sedimentação, agentes flocculantes podem ser adicionados ao sistema. Tendo-se espaço disponível e se a contaminação do produto de interesse pelos coagulantes não é uma preocupação, a sedimentação por gravidade sozinha pode levar a concentrados de 1,5% em massa de sólidos a um custo mínimo.

O custo da aplicação de filtração de fluxo tangencial depende da substituição da membrana e de bombeamento, e a utilização em grande escala deste método de colheita é limitada por isso. Rossignol et al. (1999) estuaram o uso de membranas poliméricas para separação contínua de duas espécies de microalgas marinhas, *Haslea ostrearia* e *Skeletonema costatum*. No entanto, até hoje o entendimento das interações entre as células de algas com as superfícies das membranas feitas de diferentes materiais permanece obscuro. Mudanças na hidrofobicidade da membrana aplicada podem ser promissoras para reduzir o *fouling* durante a colheita de algas. O método eletrolítico tem o potencial de separar algas sem a adição de produtos químicos. No entanto, a alta potência que é necessária ao processo resulta em um aumento de temperatura que possam danificar o sistema, e a encrustação do cátodo continua a ser a principal desvantagem deste método. Flotação assistida, tal como quando é feito uso de um oxidante para desestabilizar a suspensão de células das algas apresenta-se como uma alternativa potencial para a colheita eficiente de grandes quantidades de células de algas (Betzer et al., 1980). A compreensão das características da suspensão de células de algas e suas alterações ao ser submetida a coagulação ou oxidação determina o projeto e operação do processo de colheita.

3. Materiais e Métodos

O presente trabalho fez uso de três diferentes agentes coagulantes apontados na bibliografia como tendo exibido bons resultados como auxiliares na sedimentação de microalgas de diferentes espécies. Foram selecionados, portanto, sulfato de alumínio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$), sulfato de zinco (ZnSO_4) e cloreto férrico (FeCl_3) e a espécie de microalga cultivada foi *Dunaliella tertiolecta*, por se tratar de uma espécie relativamente resistente e de fácil cultivo em comparação a outras comumente estudadas para produção de lipídios e pigmentos.

A fim de manter paridade nas características das microalgas cultivadas e na concentração destas em suspensão nos cultivos, estes foram padronizados, seguindo para os variados parâmetros envolvidos no processo valores que vêm rendendo bons resultados na pesquisa referente à otimização da produção de lipídios e pigmentos de *D. tertiolecta* no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Assim, são descritas a seguir as condições de cultivo utilizadas nas variadas bateladas de cultura de microalgas realizadas para fornecer a biomassa utilizada nos ensaios presentes neste trabalho.

3.1. Microrganismo e condições de cultivo

Para este experimento foi utilizada a microalga *Dunaliella tertiolecta*, gentilmente cedida pelo professor Sérgio O. Lourenço da Universidade Federal Fluminense e mantida no banco de algas do Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Os cultivos foram realizados em meio Guillard -“f1/2” (Guillard, 1975) composto por água do mar artificial (34 g/L de sal marinho - Red Sea), suplementado com (por litro): 75 mg de nitrato de sódio, 5 mg de fosfato de sódio, 30 mg de silicato de sódio, 1 mL de solução de metais-traço, 1 mL de solução de vitaminas e 1 mL de solução-tampão de pH. A solução de

metais-traço contém (por litro): 9,8 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 22 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 180 mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 6,3 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4,36 g de Na_2EDTA e 3,15 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. A solução de vitaminas contém (por litro): 100 mg de tiamina, 0,5 mg de cianocobalamina e 0,5 mg de biotina. A solução tampão de pH serve para manter o pH entre 7,5 e 8,5 e foi feita com 50 g de tris e aproximadamente 30 mL de ácido clorídrico para ajustar o pH em valor de 7,1 a 7,3 e água destilada, sendo o volume total da solução de 200 mL.

As microalgas foram cultivadas em frascos do tipo “Duran” de 1 L. A aeração foi realizada com vazão de 0,5 L/min de ar comprimido filtrado com membrana de 0,22 μm Midisart®2000 da Sartorius Stedim Biotech utilizando-se mangueira inserida pelo topo dos reatores até o fundo dos mesmos. As vazões de ar foram controladas utilizando rotômetros (Dwyer). Os frascos contendo meio de cultivo foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. Os cultivos foram iluminados continuamente por um painel de lâmpadas eletrônicas (12 \times 13 Watts, luz branca, Tachibra).

O acompanhamento do crescimento da microalga foi realizado através de medidas de densidade ótica a 570 nm (OD_{570}) (e correlacionado com peso-seco conforme a equação (1), determinada experimentalmente no trabalho ainda não publicado por Nicéia Chies e Rosane Rech no ICTA - UFRGS).

$$X(\text{g} \cdot \text{L}^{-1}) = 0,303 \cdot \text{OD}_{570\text{nm}} \quad (1)$$

Para inocular cada cultivo em reator, uma alíquota de 10 mL de algas da cultura-mãe do banco de cultivo foi inoculada em 100 mL de meio de cultivo estéril em frasco cônico de 500 mL, que foram colocados em incubadora com agitação orbital com temperatura controlada de 30°C e iluminação permanente através de uma lâmpada eletrônica de 30 Watts, correspondente a uma intensidade luminosa de aproximadamente 2500 Lux. Após seis dias, mais 100 mL de meio de cultivo estéril foram adicionados. Depois de outros quatro dias, os pré-inóculos puderam ser considerados prontos para serem utilizados.

3.2. Ensaio de sedimentação

O foco principal deste trabalho se encontra no estudo da sedimentação de microalgas a partir do cultivo em fotobiorreatores em escala de laboratório. Assim, a fim de manter paridade entre os cultivos realizados, estes foram conduzidos até um valor de densidade ótica de 0,8. Caso este valor fosse ultrapassado devido ao aumento de biomassa, era realizada a diluição com meio de cultivo o valor padronizado.

O planejamento de experimentos seguiu uma metodologia adaptada do trabalho de Papazi et al. (2008), no qual foram utilizadas concentrações variando de 0 a 5 g.L⁻¹ de 12 sais em ensaios de sedimentação em tubos de ensaio. Os três sais utilizados neste trabalho (Sulfato de Alumínio (Al₂(SO₄)₃), Sulfato de Zinco (ZnSO₄) e Cloreto Férrico (FeCl₃)) haviam apresentado resultados favoráveis no artigo citado para a sedimentação de microalgas da espécie *Chlorella minutissima*.

De forma semelhante, neste trabalho foram utilizados para todos os ensaios de sedimentação tubos de ensaio de 10 cm de comprimento e igual diâmetro a fim de que as condições da geometria do frasco não interferissem na interpretação dos resultados. Soluções de concentração de 50 g/L foram preparadas para cada um dos agentes coagulantes utilizados nos ensaios em separado através da pesagem do sal puro em balança analítica com diluição com água destilada.

Um volume, sempre idêntico, de 9 mL de cultivo em suspensão (OD₅₇₀ = 0,8) foi adicionado aos tubos de ensaio com micropipeta de capacidade volumétrica compatível. Após a transferência do volume de cultivo para todos os tubos de ensaio necessários, iniciava-se a adição de água destilada e, por fim, da solução de agente coagulante a 50 g/L em volumes suficientes para levar a concentração deste sal no tubo de ensaio à concentração de estudo desejada em um volume final de 10 mL. Esta transferência também era realizada com micropipeta de capacidade volumétrica compatível a este volume menor. Finalmente, todos os tubos eram fechados com tampas e agitados vigorosamente manualmente. A adição do agente coagulante por fim teve por objetivo manter o início do processo de coagulação ocorrendo aproximadamente no mesmo instante para todos os tubos. Para todos os ensaios, amostras de controle contendo 9 mL de cultivo em suspensão e 1 mL de água destilada foram montadas

para acompanhamento da sedimentação natural das microalgas sem a adição de agentes coagulantes para efeito de comparação.

O acompanhamento do processo de sedimentação com o auxílio da adição dos agentes coagulantes foi realizado por medidas de OD_{570} , sendo as medidas realizadas ao longo do tempo de experimento com sacrifício dos tubos de ensaio preparados. Assim, para cada tempo de análise, correspondia um tubo preparado com a concentração de agente coagulante sendo analisada. A coleta dos volumes a serem transferidos para cubetas e analisadas no espectrofotômetro foi realizada com pipetas Pasteur, sendo o ponto de coleta padronizado na metade da altura dos tubos de ensaio.

A eficiência de coagulação foi então calculada através da equação (2):

$$\varepsilon(\%) = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100 \quad (2)$$

onde A é a OD_{570} da amostra no momento da leitura e B é a OD_{570} inicial de todas as amostras que sofreram adição de um mesmo agente coagulante naquele ensaio.

A utilização da densidade ótica inicial das amostras para o cálculo da eficiência de coagulação diverge da fórmula utilizada por Papazi et al. em seu trabalho, onde a densidade ótica da amostra de controle (sem adição de agente coagulante) era tomada para o cálculo. A decisão para esta alteração no método está baseada na inspeção de que a adição de um dos sais utilizados, o Cloreto Férrico gera imediata alteração na absorbância da amostra, levando-a a um valor mais alto juntamente com o surgimento de forte coloração alaranjada e turbidez mesmo a concentrações muito baixas do sal. Desta forma, a comparação com o controle, onde não se verifica esta alteração devido à ausência do sal Cloreto Férrico não é justificável e não leva a resultados que se possa interpretar corretamente quanto à eficiência da aplicação do sal.

Para realizar as medidas de densidade ótica em questão, foram gerados “brancos” para cada concentração utilizada dos sais aplicados em cada experimento. Para tal, adicionou-se volume idêntico àquele usado da solução 50 g/L do sal para dada concentração a um volume restante de meio de cultivo que servisse para o volume final de 10 mL. Assim, foi evitada distorção dos resultados semelhante àquela descrita anteriormente causada pela presença dos sais em solução, a qual teria ocorrido caso fosse utilizada água destilada ou meio de cultivo puro como “branco”.

Assim, um primeiro ensaio foi realizado a fim de estimar as concentrações de agentes coagulantes com as quais se deveria trabalhar nos ensaios de sedimentação. Neste, concentrações variando de 0 a 5g/L dos três agentes coagulantes utilizados foram utilizadas, planejando-se acompanhar o processo de sedimentação por 6 horas. No entanto, findada uma hora, as soluções cujas concentrações de sal eram de 1g/L apresentavam resultados bastante satisfatórios (com valores tão altos quanto 70% de eficiência de coagulação para os sais de alumínio e de ferro) enquanto, para as demais concentrações, os resultados eram muito pobres. Desta forma, optou-se por não dar seguimento ao acompanhamento do processo, adaptando o planejamento de experimentos para a utilização de concentrações próximas de 1g/L dos três sais.

Para a etapa de escolha da concentração ideal dos três agentes coagulantes estudados, foram preparadas soluções conforme descrito na Tabela 1 com medições de absorvância realizadas no começo do processo de sedimentação e após 20, 40, 60, 90 e 120 minutos (com preparo de um tubo de ensaio para cada tempo, conforme descrito anteriormente).

Tabela 1: Concentrações de biomassa, água destilada e agentes coagulantes utilizadas nos ensaios de sedimentação.

| | Concentração de agente coagulante(g/L) | Volume de solução de microalgas (mL) | Volume de meio de cultivo (mL) | Volume de Água Destilada (mL) | Volume da solução de sal a 50g/L (mL) |
|-----------------------|--|--------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|
| CONTROLE | 0 | 9 | 0 | 1 | 0 |
| SOLUÇÃO 0,5g/L | 0,5 | 9 | 0 | 0,9 | 0,1 |
| SOLUÇÃO 1,0g/L | 1 | 9 | 0 | 0,8 | 0,2 |
| SOLUÇÃO 1,5g/L | 1,5 | 9 | 0 | 0,7 | 0,3 |
| BRANCO 0,5g/L | 0,5 | 0 | 9 | 0,9 | 0,1 |
| BRANCO 1,0g/L | 1 | 0 | 9 | 0,8 | 0,2 |
| BRANCO 1,5g/L | 1,5 | 0 | 9 | 0,7 | 0,3 |

Os ensaios de sedimentação foram realizados em duplicata para cada um dos agentes coagulantes utilizados, sendo feitos aos pares. Desta forma, em um ensaio eram adicionadas as concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5g/L de dois diferentes agentes coagulantes, sendo as mesmas concentrações testadas para pares alternados nos demais, a fim de se garantir maior confiabilidade nos resultados obtidos.

Assim, ao final desta etapa, conforme será discutido entre os resultados obtidos, verificou-se uma eficiência de coagulação superior para o Sulfato de Alumínio, sendo este agente coagulante escolhido para a continuidade do trabalho. A fim de assegurar o uso de uma concentração deste sal próxima da ideal para a sedimentação, um ensaio final em duplicata foi

realizado, no qual as concentrações de Sulfato de Alumínio utilizadas foram de 0,25, 0,5 e 0,75g/L.

3.3. Análise da influência da utilização do Sulfato de Alumínio como agente coagulante no teor de pigmentos e lipídios

A fim de avaliar a influência da aplicação do agente coagulante que apresentou melhores resultados de eficiência de coagulação na etapa anterior, foram analisados o teor de lipídios e a concentração de pigmentos para uma mesma cultura, sendo a colheita desta obtida via sedimentação ou via centrifugação.

O ensaio de precipitação foi realizado com 2 L de suspensão de alga ($OD_{570} = 0,8$) e 0,25 g/L de sulfato de alumínio. Após 60 minutos, a fim de obter-se retirada completa da umidade, parte do sobrenadante foi retirado e a biomassa úmida foi centrifugada. Paralelamente centrifugou-se uma suspensão que não sofreu adição de agente coagulante. Depois da retirada da umidade, a biomassa foi congelada e liofilizada, gerando um produto seco próprio para análise de lipídios e de pigmentos.

3.3.1. Análise de Pigmentos

A fim de realizar a análise de pigmentos presentes nas amostras via cromatografia líquida de alta precisão (HPLC), foram retiradas duas amostras de 0,01 g de microalgas liofilizadas que não haviam sofrido adição de agente coagulante e duas amostras de 0,01 g que haviam. As amostras foram pesadas em balança analítica e transferidas para tubos de ensaio onde foram reidratadas e congeladas. Isso foi feito para que, através do congelamento e descongelamento, a parede celular dos microrganismos fosse rompida, liberando todo o material constituinte das células para a fase aquosa.

Ao material descongelado foram então adicionados 1 mL de Álcool Metílico, 1 mL de Éter Etilico e 2 mL de Éter de Petróleo. A mistura foi homogeneizada em vortex e colocada

em um banho de ultra-som por 10 minutos, para auxiliar na extração de todos os pigmentos do produto liofilizado, transferindo-os para os solventes.

Os tubos de ensaio foram então centrifugados por 15 minutos em centrífuga a 2.000 g e 4 °C. O sobrenadante foi recolhido com o auxílio de uma pipeta Pasteur para frasco âmbar. A adição de solventes, homogeneização, ultra-som e centrifugação foi repetida até que não se verificasse mais a presença de pigmentos no material sólido, marcada pela coloração final branca deste material.

A saponificação do extrato foi realizada adicionando-se um volume igual (proporção 1:1) de uma solução de NaOH 20% em Álcool Metílico. Os frascos âmbar foram então recobertos com papel alumínio e guardados por 12 horas em local escuro para que se completasse a reação de saponificação.

Após este período necessário para que se completasse a saponificação, a mistura saponificada foi colocada em funis de separação de 500 mL. Após foram adicionados: água destilada até preencher um terço do volume do funil, 50 mL de Éter de Petróleo, 50 mL de Éter Etílico e novamente água destilada até preencher o volume inteiro do funil. Aguardou-se a separação das fases orgânica e aquosa, sendo então esta última removida e descartada. O volume do funil de separação foi completado com água destilada novamente e a fase aquosa retirada tantas vezes quanto necessário para que o pH da fase aquosa apontado pela medição com papel medidor fosse aproximadamente igual a 5,0.

A fase orgânica foi recolhida em Erlenmeyer e uma pequena quantidade de Sulfato de Sódio Anidro foi adicionada com a finalidade de remover resíduos da fase aquosa. A fase orgânica foi então transferida sem o Sulfato de Sódio Anidro para balões volumétricos e todo o solvente foi removido por evaporação a vácuo em rota-vapor a 40 °C.

Finalmente, os pigmentos presentes na vidraria eram transferidos para frascos âmbar através da diluição no menor volume necessário de Éter Etílico que então era seco pela aplicação de gás nitrogênio a uma vazão baixa no interior do frasco âmbar e armazenado no mesmo a 4°C negativos.

Imediatamente antes da injeção no HPLC, os pigmentos foram dissolvidos em 0,8 mL de Éter Etílico e colocados em um banho de ultra-som por cinco minutos.

Para análise dos pigmentos foi utilizada uma coluna de fase reversa C30 YCM. Como fase móvel, foi utilizado um gradiente constituído de água/metanol/éter tert-metil-butílico (MTBE) conforme descrito na Tabela 2 (Goiffon et al., 1999)

Estudos previamente realizados no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS realizaram a identificação dos tempos de retenção para os pigmentos Luteína (18 minutos), Zeaxantina (21 minutos) e β -Caroteno (42 minutos) notadamente presentes em microalgas da espécie *D. tertiolecta* e marcadas por picos bem definidos nos cromatogramas obtidos. Foram geradas curvas de calibração a partir de padrões comerciais destes pigmentos, obtendo-se os coeficientes angulares utilizados para obtenção das concentrações a partir das áreas destes picos.

Tabela 2: Gradiente da fase móvel composta por Água, Metanol e Éter tert-metil-butílico utilizado para análises no HPLC.

| Tempo (min) | Água (%) | Metanol (%) | MTBE (%) |
|-------------|----------|-------------|----------|
| 0 | 5 | 90 | 5 |
| 12 | 0 | 95 | 5 |
| 25 | 0 | 89 | 11 |
| 40 | 0 | 75 | 25 |
| 60 | 0 | 50 | 50 |

3.3.2. Análise de Lipídios

O teor de lipídios total na biomassa foi analisado pelo método de Soxhlet. Nesta metodologia, a amostra sólida é colocada em um cartucho composto por membrana que permite a permeação de vapor. Um solvente orgânico é disposto abaixo do cartucho e aquecido de forma a ser vaporizado e carregar consigo, na passagem pela amostra sólida, os lipídios ali presentes. O equipamento é dotado de uma serpentina de resfriamento através da qual água à temperatura ambiente é admitida sendo continuamente descartada com a finalidade de condensar o vapor rico em lipídios, retornando este condensado ao frasco de solventes.

Os canecos portadores de solvente do equipamento foram mantidos em estufa para secagem e transferidos para dessecador antes do início da análise, por 20 minutos, para eliminar qualquer resquício de umidade.

O conteúdo de microalgas anteriormente liofilizadas foi homogeneizado em equipamento *vortex* e amostras sólidas de 0,1 g, pesadas em balança analítica, foram dispostas nos cartuchos e 100 mL de Éter de Petróleo foram transferidos para cada caneco de solvente com o auxílio de proveta graduada. A temperatura utilizada foi de 135 °C. Findada uma hora de extração seguindo programa do equipamento, foram adicionados mais 100 mL de Éter de Petróleo nos canecos e nova extração foi realizada por mais uma hora sob as mesmas condições. Finalmente, os canecos foram pesados em balança analítica, sendo a massa adicional verificada relacionada somente ao conteúdo de lipídios. Este valor foi então ponderado pela massa da amostra utilizada para render o teor de lipídios da biomassa.

4. Resultados e Discussão

4.1. Escolha do agente coagulante com a melhor eficiência de coagulação

Gráficos contendo os valores médios encontrados entre duplicatas para a eficiência de coagulação ao longo do tempo nos ensaios realizados para os sais Sulfato de Alumínio, Cloreto Férrico e Sulfato de Zinco em concentração de 0,5, 1,0 e 1,5 g/L são mostrados nas Figuras 1 a 3 juntamente com os valores encontrados para a amostra de “controle” que não sofreu adição de sal, constituindo portanto a sedimentação natural da biomassa. O desvio padrão de cada ponto em relação à duplicata é exibido em todos os gráficos.

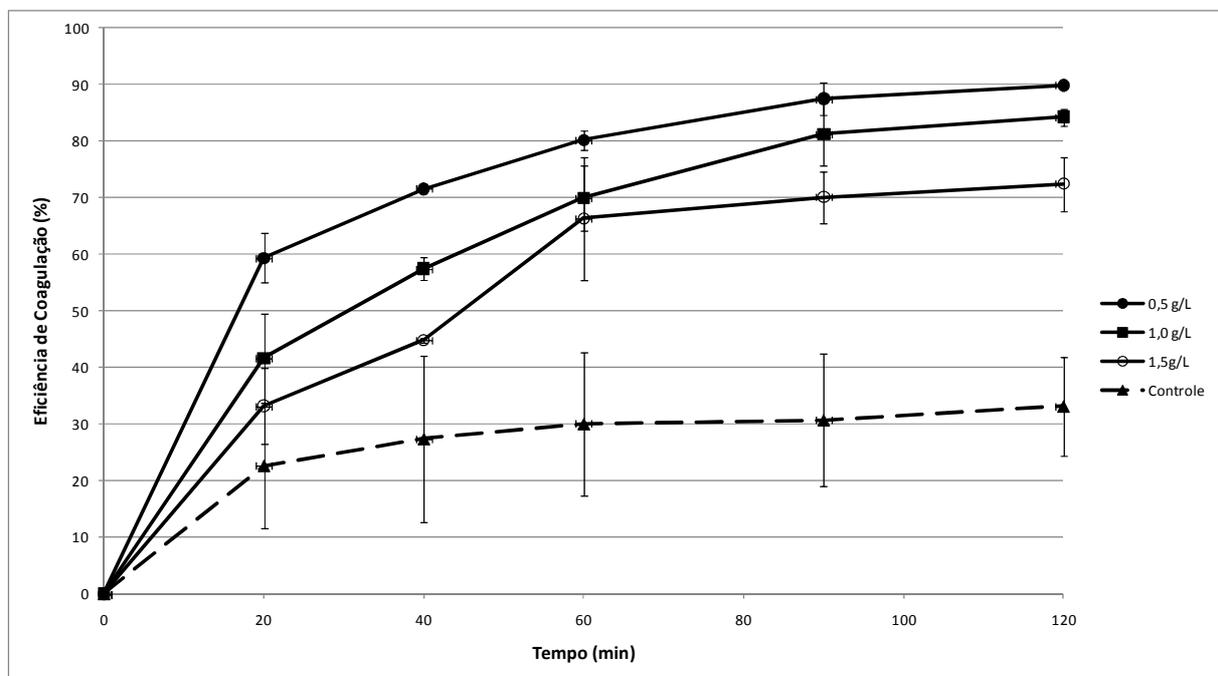


Figura 1: Eficiência de Coagulação ao longo do tempo para o Sulfato de Alumínio nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 g/L.

Conforme é possível observar, o Sulfato de Alumínio foi o sal que apresentou melhores valores de eficiência de coagulação, sendo estes tão altos quanto 90% para a concentração de 0,5 g/L ao final de duas horas de experimento. A adição deste sal às microalgas em suspensão não gerou mudança considerável na absorbância lida e não ocorreu mudança visível de cor da biomassa.

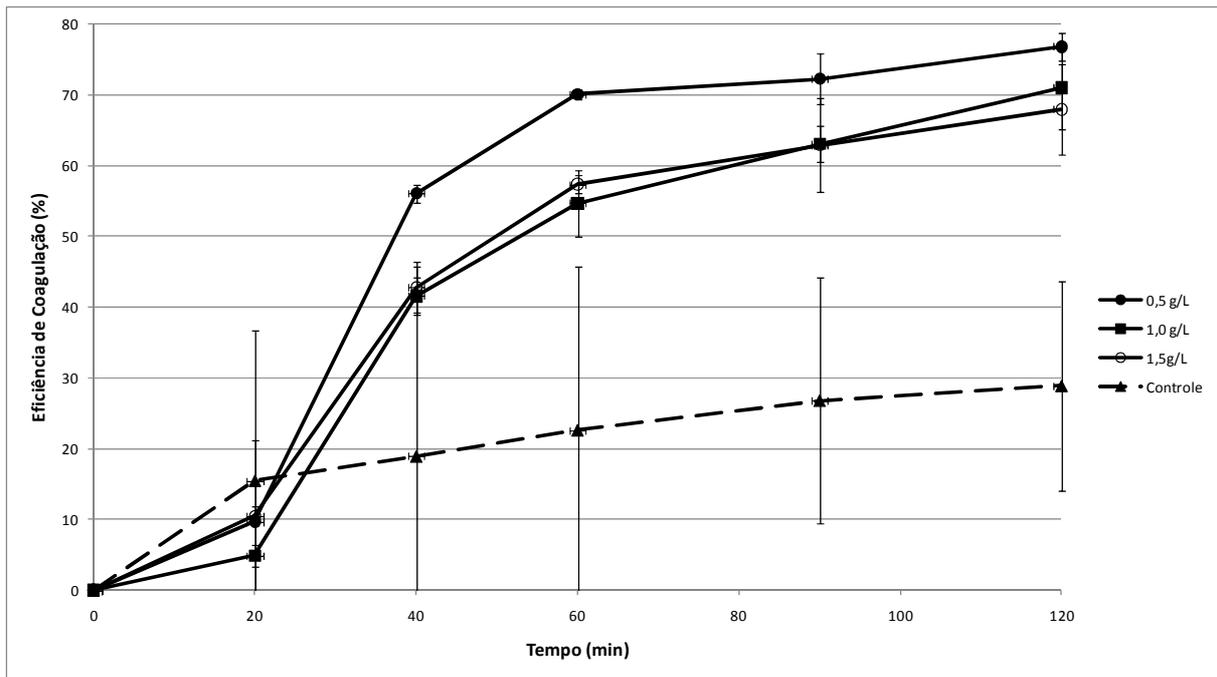


Figura 2: Eficiência de Coagulação ao longo do tempo para o Cloreto Férrico nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 g/L.

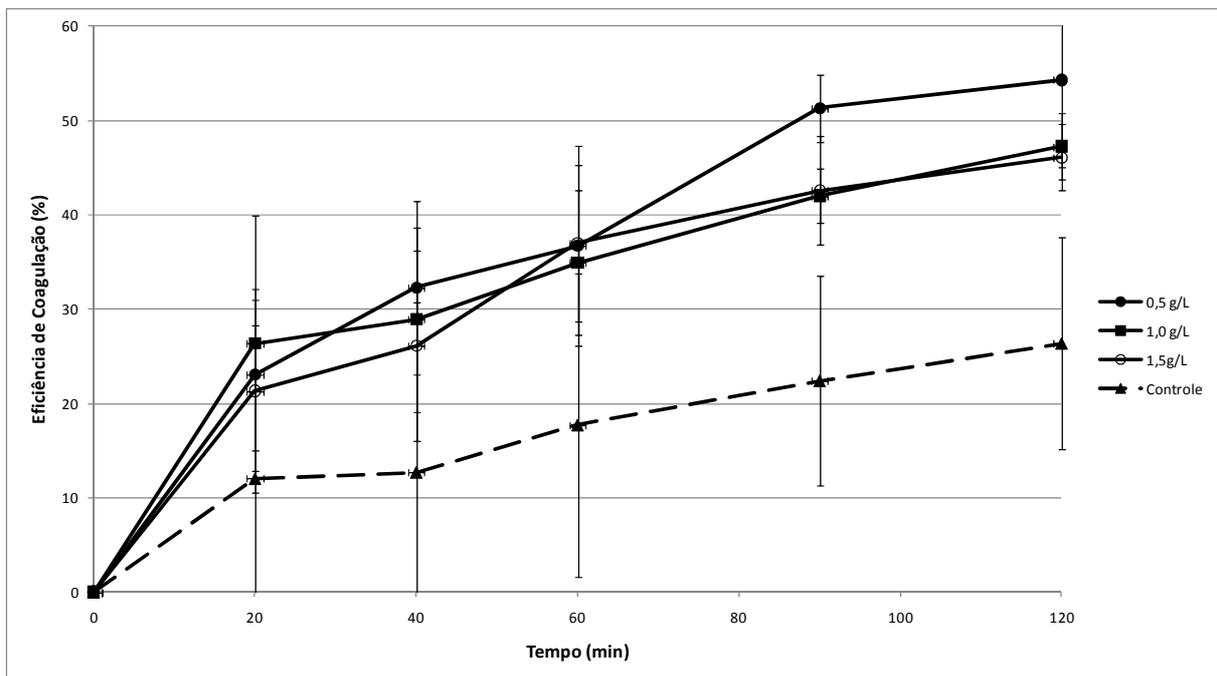


Figura 3: Eficiência de Coagulação ao longo do tempo para o Sulfato de Zinco nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 g/L.

O Cloreto Férrico mostrou-se um agente coagulante eficiente para a sedimentação de microalgas da espécie *D. tertiolecta*, com valores de eficiência de coagulação da ordem de

78% para a concentração de 0,5 g/L. No entanto, além do fato de este valor ser inferior àquele obtido para o Sulfato de Alumínio, verificou-se a imediata mudança de coloração da biomassa após adição do sal para um tom forte de laranja, o qual pode ser associado à presença do ferro.

O Sulfato de Zinco, por sua vez, apresentou valores inferiores aos dois outros sais utilizados, sendo o máximo de eficiência de coagulação 54% verificada para a concentração de 0,5 g/L. O Sulfato de Zinco, de forma semelhante ao Sulfato de Alumínio, não promoveu alterações de cor ou absorbância sensíveis na suspensão. Por outro lado, como pode ser observado, as curvas de eficiência de coagulação contra tempo não apresentam comportamento crescente e semelhante àquele exibido pelas demais.

Para a sedimentação natural da biomassa, foi obtido um máximo de 30% de eficiência de coagulação na média, o que mostra que todos os sais utilizados influenciaram positivamente na sedimentação através da neutralização das cargas presentes.

Desta forma, para a continuidade do trabalho, o Sulfato de Alumínio foi eleito o melhor agente coagulante entre os três utilizados para a sedimentação de *D. tertiolecta*. Um novo ensaio de sedimentação foi realizado a fim de verificar com maior precisão a concentração ideal deste sal para a sedimentação da biomassa, no qual foram utilizadas as concentrações de 0,25, 0,5 e 0,75 g/L. Os resultados são mostrados na Figura 4.

Conforme pode ser verificado, a maior eficiência de coagulação neste ensaio foi para a concentração de 0,25 g/L de sulfato de alumínio, com a qual se obteve um valor da ordem de 97% ao final do experimento.

Naturalmente, a concentração de 0,25g/L não corresponde à real concentração ótima, uma vez que a diminuição da concentração deste sal ao longo do trabalho demonstrou aumentar a eficiência de coagulação. É evidente que este comportamento não poderá se manter e o ótimo de concentração provavelmente estará abaixo de 0,25g/L. No entanto, o seguindo o escopo deste trabalho, esta concentração foi utilizada para verificar a influência da presença do Sulfato de Alumínio utilizado para colheita por coagulação.

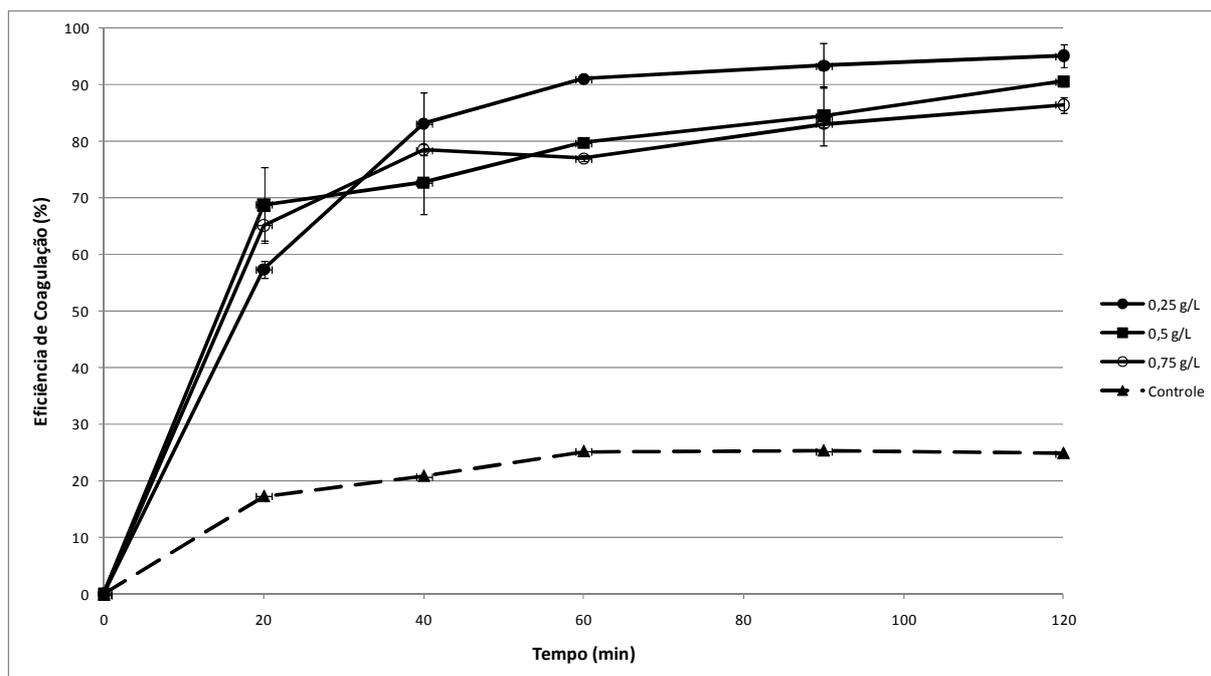


Figura 4: Eficiência de Coagulação ao longo do tempo para o último ensaio realizado, utilizando Sulfato de Alumínio nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5g/L em duplicata.

O fato de a eficiência de coagulação não aumentar juntamente com o aumento de concentração de agente coagulante é facilmente explicado, uma vez que o sal adicionado atua na compensação das cargas residuais das partículas em suspensão no líquido. Conforme elucidado pelo trabalho de Danquah et al. (2008), que utilizou quitosana como agente coagulante, interações serão formadas entre as cargas do próprio sal e das partículas até que a carga resultante se torne neutra. A partir deste ponto, a presença de uma quantidade excedente de sal causada pela utilização de uma concentração superior deste irá gerar uma força de repulsão resultante devido à formação de uma camada do próprio coagulante que reveste as partículas, diminuindo portanto a eficiência de coagulação.

4.2. Análise de pigmentos e lipídios totais

Apesar de terem sido geradas amostras em duplicata para análise da influência do agente coagulante na concentração de pigmentos nas microalgas, foi verificada falha no preparo de uma das amostras que não receberam adição de sal. Verificou-se coloração muito fraca do líquido no momento da injeção e a análise por HPLC não revelou concentrações consideráveis dos pigmentos de interesse. Seguem, portanto, nas Figuras 5 a 7 os resultados da análise de pigmentos por HPLC para as demais amostras.

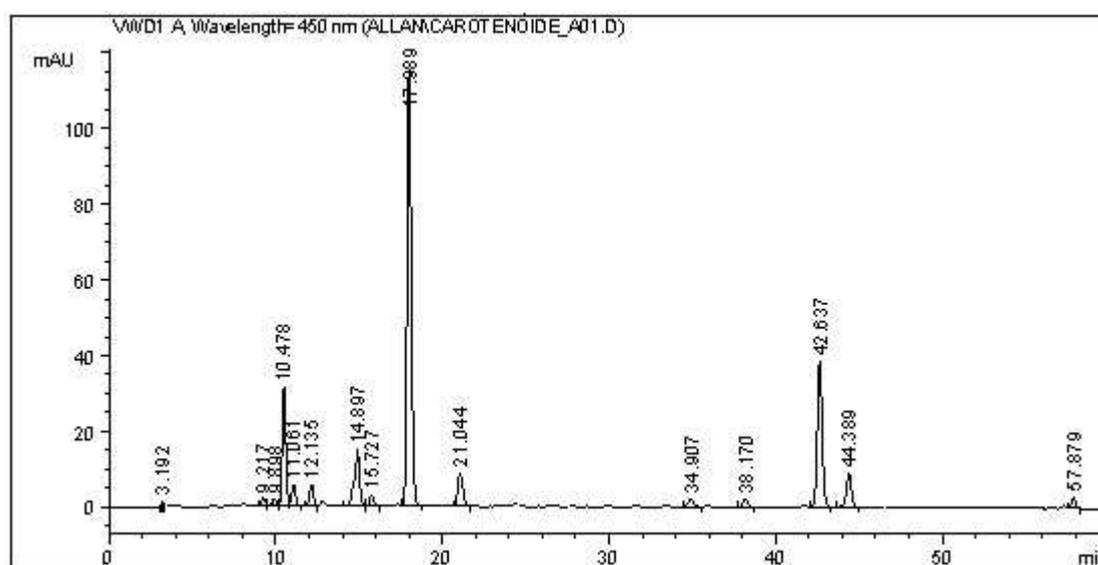


Figura 5: Cromatograma obtido para a amostra de pigmentos oriundos do cultivo que não sofreu adição do agente coagulante.

Os resultados referentes à concentração de pigmentos foram ponderados pelo volume de solvente de 0,8 mL utilizado na diluição para injeção no equipamento e pela massa de microalgas liofilizadas utilizada para chegar a valores em base mássica de concentração de pigmentos na biomassa. Os resultados obtidos para a análise da concentração de pigmentos são apresentados na Tabela 3.

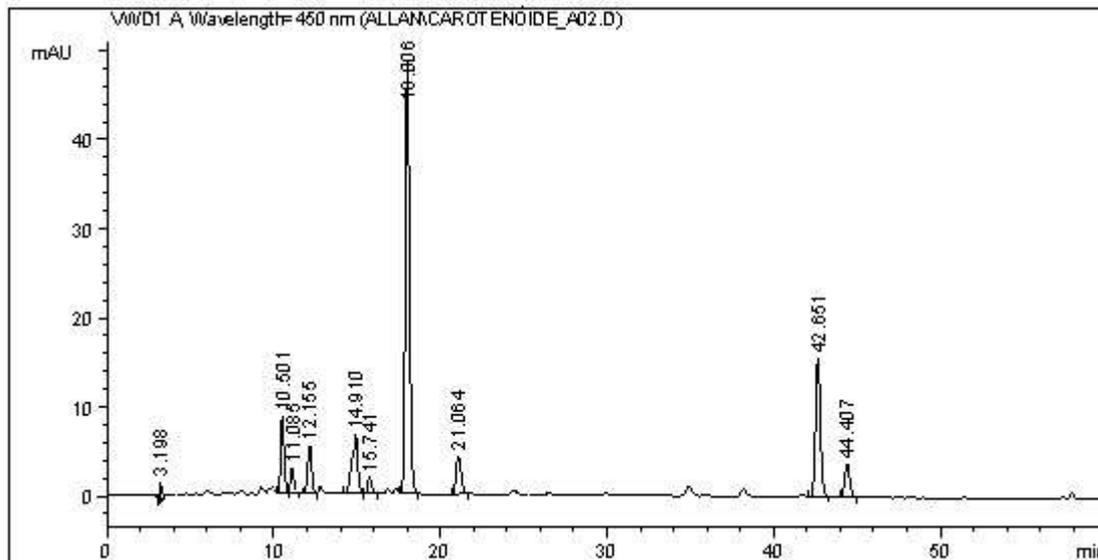


Figura 6: Cromatograma obtido para a amostra de pigmentos oriundos do cultivo que sofreu adição do agente coagulante.

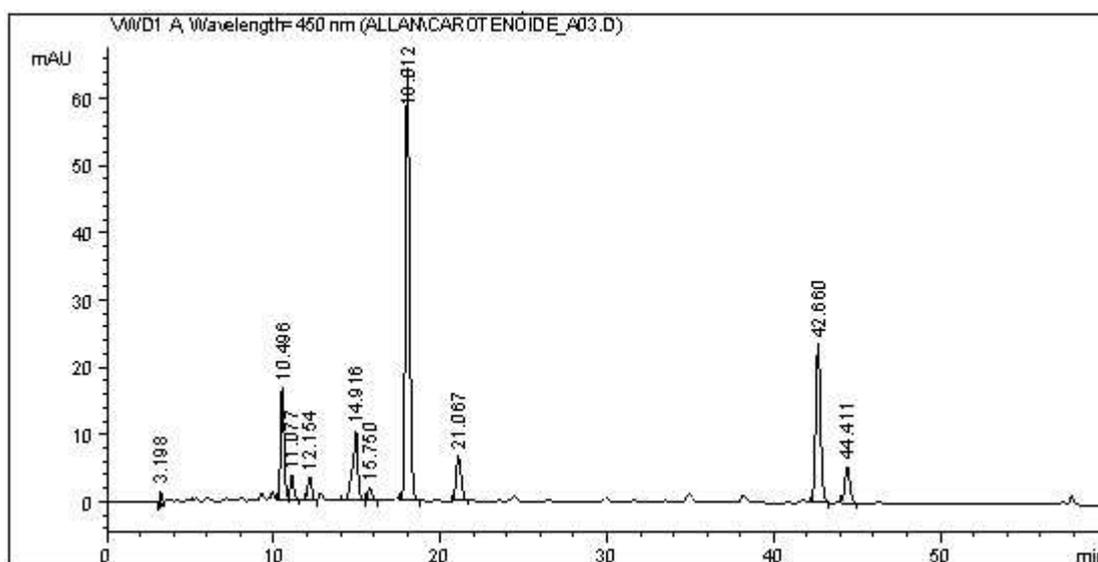


Figura 7: Cromatograma obtido para a duplicata de amostra de pigmentos oriundos do cultivo que sofreu adição do agente coagulante.

Os resultados obtidos para a análise da concentração de lipídios são apresentados na Tabela 4.

Tabela 3: Concentração de pigmentos obtida para a amostra sem adição de coagulante e média da concentração para amostras com adição de coagulante.

| Pigmento | Tempo de Retenção (min) | Concentração de Pigmento (mg/g de amostra) | | Diferença percentual (%) |
|------------|-------------------------|--|------------------------|--------------------------|
| | | Centrifugada | Coagulada/Centrifugada | |
| LUTEÍNA | 18 | 2,64 | 1,28 | 48,48% |
| ZEAXANTINA | 21 | 0,28 | 0,17 | 61,57% |
| B-CAROTENO | 42 | 2,35 | 1,19 | 50,81% |

Tabela 4: Teor de lipídios obtido para amostras com e sem a adição de agente coagulante em duplicatas.

| | Amostra | Teor de Lipídios (%) |
|------------------------|---------|----------------------|
| Centrifugada | A | 15,66% |
| | B | 14,63% |
| Coagulada/Centrifugada | A | 6,90% |
| | B | 13,53% |

A análise da influência da utilização do Sulfato de Alumínio na concentração de pigmentos na biomassa rendeu resultados que evidenciaram redução destes valores nas amostras que sofreram adição de sal. As concentrações dos pigmentos Luteína, Zeaxantina e β -caroteno reduziram-se para aproximadamente a metade dos teores verificados naquelas que foram somente centrifugadas. Seria possível, em um primeiro momento, relacionar a utilização do agente coagulante com uma real perda do conteúdo de pigmentos, o que levaria a se descartar a possibilidade de sua utilização na colheita de microalgas quando se tem por fim a obtenção de pigmentos. No entanto, uma análise mais profunda pode sustentar a possibilidade de aplicabilidade deste sal. Aplicando-se a equação (1), a qual relaciona a densidade ótima medida a 570 nm com a biomassa presente no cultivo em suspensão, verifica-se que, para o valor de OD₅₇₀ de 0,8, tem-se a concentração de 0,2424 g/L. A concentração de sal utilizada foi de 0,25 g/L por sua vez. Desta forma, caso o Sulfato de Alumínio sedimente juntamente com a biomassa agrupada em coágulos em vez de permanecer no líquido sobrenadante, ele representará aproximadamente 50% da massa final obtida. A concentração de pigmentos pode, portanto, ter se mantido igual àquela da massa que não sofreu adição de agente coagulante, estando os resultados obtidos “diluídos” pela presença do sal na massa utilizada nas amostras analisadas.

Para a análise de lipídios, obteve-se um bom valor de duplicata para a concentração nas amostras que não sofreram a adição de agente coagulante, tendo-se um valor médio de 15% de teor de lipídios. No entanto, para a análise realizada para as amostras que sofreram adição de Sulfato de Alumínio, obtiveram-se valores muito distintos, podendo evidenciar ou a diminuição do teor de lipídios a aproximadamente metade do valor obtido para amostras somente centrifugadas, ou então a não alteração destes. Novamente, esta discrepância poderia ser atribuída à presença do sal na massa liofilizada. Uma vez que a análise envolve a extração de lipídios pela passagem do vapor de Éter de Petróleo por amostras sólidas, a presença de aglomerados contendo um teor maior do sal pode ter levado a uma presença menor da biomassa propriamente dita nas amostras, havendo desta forma uma quantidade menor de lipídios a ser extraída. A análise foi, portanto, inconclusiva quanto à influencia do agente coagulante, sendo necessária a realização de um número maior de réplicas do experimento.

5. Conclusões e sugestões para trabalhos futuros

A etapa referente à escolha de um agente coagulante entre os sais Sulfato de Alumínio, Sulfato de Zinco e Cloreto Férrico mostrou ser pobre a possibilidade de se utilizar estes dois últimos sais. O Sulfato de Zinco não mostrou resultados de eficiência de coagulação suficientes para que seja indicado para a sedimentação de microalgas da espécie *D. tertiolecta*. Por sua vez, o Cloreto Férrico apresentou resultados de eficiência de coagulação compatíveis com o Sulfato de Alumínio, que apresentou os melhores resultados nesta etapa. No entanto, o sal de ferro alterou imediatamente a coloração e turbidez da suspensão, o que naturalmente não é desejável quando se deseja a extração de pigmentos da biomassa. Desta forma, o Sulfato de Alumínio se mostrou um agente coagulante muito bom para a espécie utilizada, promovendo coagulação com valores tão eficientes quanto 97% para a concentração ideal de 0,25 g/L obtida em ensaio em duplicata. Este sal não causou alterações visíveis de cor ou alterações mensuráveis de turbidez mediante sua aplicação. Sugere-se para trabalhos futuros realizar ensaios com pH controlado a fim de verificar a melhor condição para coagulação.

A verificação da influência da aplicação de Sulfato de Alumínio na colheita de microalgas da espécie *D. tertiolecta* neste trabalho foi inconclusiva. Pode-se sugerir para trabalhos futuros uma medição meticulosa da massa obtida após liofilização, podendo o acréscimo de massa obtido para amostras que sofreram adição do agente coagulante ser atribuída justamente à presença deste. Técnicas analíticas poderiam ser empregadas para avaliar a concentração de alumínio nas amostras após liofilização a fim de verificar se existe de fato uma presença considerável do sal utilizado, levando a valores menores das concentrações de pigmentos e lipídios medidas.

6. Referências Bibliográficas

1. Amin, S. (2009). "Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae." Energy Conversion and Management **50**(7): 1834-1840.
2. Azarian, G., Mesdaghinia, A., & Vaezi, F. (2007). Algae removal by electro-coagulation process, application for treatment of the effluent from an industrial wastewater treatment plant. *Iranian J Publ*, *36*(4), 57-64.
3. Betzer, N., Y. Argaman, et al. (1980). "Effluent treatment and algae recovery by ozone-induced flotation." Water Research **14**(8): 1003-1009.
4. Bilanovic, D., G. Shelef, et al. (1988). "Flocculation of microalgae with cationic polymers -- Effects of medium salinity." Biomass **17**(1): 65-76.
5. Brennan, L. and P. Owende (2009). "Biofuels from microalgae--A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products." Renewable and Sustainable Energy Reviews **14**(2): 557-577.
6. Chen, C.-Y., K.-L. Yeh, et al. (2010). "Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review." Bioresource Technology **102**(1): 71-81.
7. Danquah, M. K., B. Gladman, et al. (2009). "Microalgal growth characteristics and subsequent influence on dewatering efficiency." Chemical Engineering Journal **151**(1-3): 73-78.
8. Divakaran, R. and V. N. Sivasankara Pillai (2002). "Flocculation of river silt using chitosan." Water Research **36**(9): 2414-2418.
9. Edzwald, J. K., D. Q. Bunker Jr, et al. (1995). "Pretreatment considerations for dissolved air flotation: Water type, coagulants and flocculation." Water Science and Technology **31**(3-4): 63-71.
10. Goiffon, J.-P., P. P. Mouly, et al. (1999). "Anthocyanic pigment determination in red fruit juices, concentrated juices and syrups using liquid chromatography." Analytica Chimica Acta **382**(1-2): 39-50.
11. Knuckey, R. M., M. R. Brown, et al. (2006). "Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds." Aquacultural Engineering **35**(3): 300-313.

12. Koopman, B. and E. P. Lincoln (1983). "Autoflotation harvesting of algae from high-rate pond effluents." Agricultural Wastes **5**(4): 231-246.
13. Lee, J. S., K. D. Sung, et al. (1998). "Isolation of a new highly CO₂ tolerant fresh water Microalga *Chlorella* sp. KR-1." Renewable Energy **16**(1-4): 1019-1022.
14. Lourenço, S.O. Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações. São Carlos: RiMa, 2006. 606 p.
15. Luttrell, G. H., R. H. Yoon, et al. (2000). "A parametric study of froth stability and its effect on column flotation of fine particles." International Journal of Mineral Processing **59**(1): 25-43.
16. Mohn, F. H. (1980). "Experiences and strategies in the recovery of biomass in mass culture of microalgae."
17. Shelef G, Soeder CJ, editors. Algal biomass. Amsterdam: Elsevier;: 547-71
18. Molina Grima, E., E. H. Belarbi, et al. (2003). "Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics." Biotechnology Advances **20**(7-8): 491-515.
19. Muylaert, K., I. Foubert, et al. (2009). "Flocculation of microalgae using cationic starch." Journal of Applied Phycology **22**(4): 525-530.
20. Nurdogan, Y. and W. J. Oswald (1996). "Tube settling of high-rate pond algae." Water Science and Technology **33**(7): 229-241.
21. Oh, H.-M., D.-G. Kim, et al. (2001). "Harvest of *Scenedesmus* sp. with bioflocculant and reuse of culture medium for subsequent high-density cultures." Bioresource Technology **102**(3): 3163-3168.
22. Papazi, A., P. Makridis, et al. (2008). "Harvesting &Chlorella minutissima& using cell coagulants." Journal of Applied Phycology **22**(3): 349-355.
23. Petrushevski, B., G. Bolier, et al. (1995). "Tangential flow filtration: A method to concentrate freshwater algae." Water Research **29**(5): 1419-1424.
24. Poelman, E., N. De Pauw, et al. (1997). "Potential of electrolytic flocculation for recovery of micro-algae." Resources, Conservation and Recycling **19**(1): 1-10.
25. Pushparaj, B., E. Pelosi, et al. (1993). "Microbial biomass recovery using a synthetic cationic polymer." Bioresource Technology **43**(1): 59-62.

26. Rodrigues, R. T. and J. Rubio (2007). "DAF-dissolved air flotation: Potential applications in the mining and mineral processing industry." International Journal of Mineral Processing **82**(1): 1-13.
27. Rossignol, N., L. Vandanjon, et al. (1999). "Membrane technology for the continuous separation microalgae/culture medium: compared performances of cross-flow microfiltration and ultrafiltration." Aquacultural Engineering **20**(3): 191-208.
28. Sukenik, A., W. Schröder, et al. (1985). "Coprecipitation of microalgal biomass with calcium and phosphate ions." Water Research **19**(1): 127-129.
29. Uduman, N., Y. Qi, et al. (2010). "Marine microalgae flocculation and focused beam reflectance measurement." Chemical Engineering Journal **162**(3): 935-940.
30. Wilde, E., J. Benemann, et al. (1991). "Cultivation of algae and nutrient removal in a waste heat utilization process." Journal of Applied Phycology **3**(2): 159-167.