



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA**

**EFICIÊNCIA DE SEPARAÇÃO DA BIOMASSA DE  
MICROALGAS POR FLOCULAÇÃO E O EFEITO DESTA  
METODOLOGIA SOBRE A COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS  
GRAXOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do Grau de Mestre em Aquicultura.

Orientador: Luis Alejandro Vinatea Arana  
Coorientador: Roberto Bianchini Derner

Augusto Sardá Vieira

Florianópolis  
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Vieira, Augusto Sardá

Eficiência de separação da biomassa de microalgas por flocculação e o efeito desta metodologia sobre a composição de ácidos graxos / Augusto Sardá Vieira ; orientador, Luis Alejandro Vinatea Arana ; coorientador, Roberto Bianchini Derner. - Florianópolis, SC, 2014.

48 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Microalgas. 3. Separação. 4. Flocculação. 5. Ácidos Graxos. I. Arana, Luis Alejandro Vinatea. II. Derner, Roberto Bianchini. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

**Eficiência de separação da biomassa de microalgas por floculação e o efeito desta metodologia sobre a composição de ácidos graxos**

Por

AUGUSTO SARDÁ VIEIRA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

**MESTRE EM AQUICULTURA**

e aprovada em sua forma final pelo Programa de  
Pós-Graduação em Aquicultura.

---

Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.  
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:

---

Dr. Luis Alejandro Vinatea Arana – *Orientador*

---

Dr. Fábio de Farias Neves

---

Dra. Katt Regina Lapa

---

Dra. Leila Hayashi



## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Waldemar Vieira (*in memoriam*) e Valda Maria Sardá Vieira, a todos os meus entes queridos, e aos amigos Néia Correia e José Piccoli.

Aos meus orientadores, professores Dr. Luis Vinatea e Dr. Roberto Derner, pela oportunidade de realização do Mestrado e pelos valiosos ensinamentos.

Ao M. Sc. Rafael Lopes e a todos os membros do Laboratório de Cultivo de Algas, pelo auxílio na execução dos experimentos da dissertação, pelas ideias e momentos de descontração.

Aos membros da banca, Dr. Fábio Neves, Dra. Katt Lapa e Dra. Leila Hayashi, pelas suas contribuições à dissertação.

A todos os servidores e professores do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de mestrado.

Ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação pelo apoio financeiro ao projeto Potencial Biotecnológico das Microalgas para a Produção de Biodiesel, que possibilitou a realização deste estudo.

Ao professor Paulo Abreu, da Universidade Federal do Rio Grande, e ao senhor João Brito, da SNF Floerger, pelo envio de amostras de floculante.



*“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”*

*Emmanuel, por Chico Xavier (1910-2002)*





## RESUMO

Microalgas têm sido apontadas como fonte promissora de matéria-prima para biodiesel devido à características como rápido crescimento e elevado teor de lipídios. Entretanto, diversos gargalos tecnológicos dificultam sua produção em escala industrial. A separação da biomassa do meio de cultura é uma das dificuldades que eleva o custo de produção do biodiesel. O objetivo deste estudo foi determinar a eficiência de separação da biomassa de microalgas através de floculação e o efeito desta metodologia no teor de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) da biomassa. Amostras de culturas de *Phaeodactylum tricorutum* (PTR) e *Nannochloropsis oculata* (NOC) foram coletadas nas fases estacionária e exponencial, e submetidas aos tratamentos em três valores de diluição da biomassa para cada fase (0, 1/2, e 1/4). Para separação da biomassa foram utilizadas três concentrações (5, 7,5 e 10 mg.L<sup>-1</sup>) de floculante de poliacrilamida catiônica (PAC) e um tratamento (N) elevando o pH do meio até 10,5 com o emprego de hidróxido de sódio (NaOH). O tempo de sedimentação das culturas após aplicação dos tratamentos foi de 15 min. Análises de ácidos graxos e FAMES da biomassa de PTR foram realizadas na fase estacionária. Nenhuma das doses de PAC resultou na formação de flocos de NOC, e a separação utilizando NaOH foi eficiente em EN-0 (93,84%) e SN-0 (86,07%). Para PTR a utilização de NaOH resultou em valores de eficiência entre 94,82% (SN-1/4) e 99,40% (SN-0), e com PAC entre 98,55% (S5-1/4) e 99,95% (S10-0). Análises de ácidos graxos totais de PTR apresentaram ácidos graxos predominantemente monoinsaturados (49,37%) com a utilização de PAC e saturados (70,40%) com utilização de NaOH. O rendimento em FAMES da biomassa separada com NaOH foi 21,7% menor do que o maior rendimento obtido no tratamento S7,5-0. Devido a ser a menor dose, e possuir a mesma eficiência que as doses maiores, sugerimos, para PTR, a utilização de 5 mg.L<sup>-1</sup> de PAC na fase estacionária e sem diluir a biomassa. Para NOC, o PAC não foi eficiente nas doses testadas e o NaOH deve ser utilizado sem diluição da biomassa. Entretanto, devido a influência do NaOH nas classes de ácidos graxos da biomassa de PTR e no rendimento em FAMES, não aconselhamos seu uso.

**Palavras-chave:** *Nannochloropsis oculata*, *Phaeodactylum tricorutum*, Separação, Biomassa, Floculação, Biodiesel.



## ABSTRACT

Microalgae have been identified as a promising source of raw material for biodiesel, due to characteristics such as rapid growth and high lipid content. However, some barriers affect their production at industrial scale. The difficulty of biomass dewatering is a barrier which increases the biodiesel production cost. The aim of this study was determine the harvesting efficiency of microalgae biomass through flocculation and the effect of this methodology in the content of fatty acid methyl esters (FAMES) from biomass. Culture samples of *Phaeodactylum tricornutum* (PTR) and *Nannochloropsis oculata* (NOC) were collected at the exponential and stationary phases, and submitted to the treatments in three values of biomass dilution for each phase (0, 1/2, and 1/4). For biomass harvesting, three treatments with different concentrations (5, 7.5 and 10 mg L<sup>-1</sup>) of cationic polyacrylamide flocculant (PAC) were used and a treatment (N) was made by raising the pH of the medium to 10.5 with sodium hydroxide (NaOH). The sedimentation time of the cultures after treatments application was 15 min. Analysis of fatty acids and FAMES from PTR biomass were performed at stationary phase. None of the PAC doses resulted in formation of NOC flake, and the harvesting using NaOH was efficient in EN-0 (93.84%) and SN-0 (86.07%). For PTR, NaOH utilization resulted in values of efficiency between 94.82% (SN-1/4) and 99.40% (SN-0), and with PAC between 98.55% (S5-1/4) and 99.95% (S10-0). Analysis of total fatty acids from PTR biomass presents predominantly monounsaturated fatty acids (49.37%) with the use of PAC and saturated (70.40%) with the use of NaOH. The FAMES yield of biomass harvested with NaOH was 21.7% lower than the highest yield obtained in the treatment S7.5-0. Due to be lower and have the same efficiency as the higher doses, we suggest the use of 5 mg L<sup>-1</sup> of PAC at the stationary phase and without biomass dilution, for harvesting PTR. For NOC, the PAC was not efficient at the tested doses and NaOH should be used without biomass dilution. However, due to the influence in the fatty acids class and in FAMES yield, from PTR biomass, we do not recommend the use of NaOH for harvesting.

**Keywords:** *Nannochloropsis oculata*. *Phaeodactylum tricornutum*. Harvesting. Biomass. Flocculation. Biodiesel.



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	21
2.1 OBJETIVO GERAL .....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
<b>3 ARTIGO CIENTÍFICO – Eficiência de separação da biomassa de microalgas por floculação e efeitos deste método sobre a composição de ácidos graxos visando a produção de biodiesel ..</b>	<b>23</b>
1. INTRODUÇÃO .....	23
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	25
2.1. Delineamento experimental .....	25
2.2. Cálculo da eficiência de separação da biomassa .....	27
2.3. Análise de ácidos graxos e FAMES .....	27
2.4. Análise estatística .....	28
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
3.1. Eficiência de separação da biomassa .....	28
3.2. Teores de ácidos graxos e FAMES .....	34
4. CONCLUSÃO .....	39
5. AGRADECIMENTOS .....	39
6. REFERÊNCIAS .....	39
<b>4 REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO</b> .....	<b>45</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Microalgas são micro-organismos unicelulares fotossintéticos, que transformam energia solar, água e dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) em biomassa e oxigênio. As microalgas também sintetizam diferentes pigmentos, vitaminas, compostos bioativos, e podem acumular elevado teor de lipídios e proteínas (DERNER et al., 2006).

A maior parte da biomassa de microalgas cultivada é utilizada na aquicultura comercial como alimento vivo para moluscos, camarões, peixes e organismos zooplanctônicos, que por sua vez também servem de alimento para larvas de peixes e crustáceos (DERNER et al., 2006; CONVERTI et al., 2009).

Outros usos comuns da biomassa de microalgas são na suplementação da alimentação humana e na indústria de cosméticos. Seu uso na alimentação ocorre geralmente através de produtos nutracêuticos, devido ao fato de serem ricas em compostos bioativos e ácidos graxos ômega 3 e 6, principalmente os ácidos docosahexaenoico (C22:6) e eicosapentaenoico (C20:5), sendo comercializados na forma de comprimidos e cápsulas (BANERJEE et al., 2012). Devido a sua ampla gama de compostos bioativos, as microalgas são comumente adicionadas a cosméticos, na forma de cremes e pomadas (SPOLAORE et al., 2006).

Com a crescente demanda energética e a depleção das fontes de combustíveis fósseis, há a necessidade de se encontrar alternativas sustentáveis de geração de energia. As principais alternativas para substituir os combustíveis usados no transporte são os biocombustíveis, como o bioetanol, biodiesel e bio-hidrogênio (TAHER et al., 2011; TAYLOR; RAND; CALDWELL, 2012). Dentre estes biocombustíveis, o biodiesel tem recebido grande atenção nos últimos anos, por ser um combustível de fonte renovável e menos poluente que o diesel de petróleo. O biodiesel é comumente produzido através do processo de transesterificação, no qual o metanol é utilizado para reagir com os triglicerídeos, produzindo glicerol e ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES, na sigla em inglês), que constituem o biodiesel (CHISTI, 2007). O biodiesel é usualmente produzido a partir de óleo de soja, mamona, amendoim, canola, dendê, milho, gordura animal, entre outros (WIJFFELS; BARBOSA, 2010; COSTA; MORAIS, 2011). Entretanto, estas fontes não têm realmente a capacidade de satisfazer a demanda por combustíveis, uma vez que áreas cada vez maiores de cultivo seriam necessárias (DANQUAH et al., 2009). Por este motivo, as microalgas têm recebido considerável atenção na última década, uma vez que seus

lipídios são uma promissora fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel, sendo, segundo alguns autores, a única fonte renovável capaz de substituir completamente o diesel fóssil (CHISTI, 2007; COSTA; MORAIS, 2011; OLTRA, 2011).

Algumas das vantagens das microalgas são a capacidade de duplicar sua biomassa em um período de 24 horas (CHISTI, 2008) e possuir teor lipídico entre 20% e 50% da biomassa seca (SPOLAORE et al., 2006; CHISTI, 2007), sendo que o acúmulo de lipídios ocorre normalmente nas microalgas quando há a depleção de algum nutriente do meio de cultura (BRENNAN; OWENDE, 2010).

A utilização de microalgas como fonte de matéria-prima para produção de biodiesel reduz a competição por áreas agrícolas próprias para a produção de alimento (CHISTI, 2007). Além disso, as microalgas podem tolerar uma gama de condições ambientais extremas, possibilitando que os cultivos sejam desenvolvidos em áreas impróprias para agricultura convencional, áreas com reservas de água salobra ou mesmo utilizar efluentes domésticos, industriais e aquícolas (CONVERTI et al., 2009; COSTA; MORAIS, 2011). Também, as microalgas fixam eficientemente CO<sub>2</sub>, assim, o desenvolvimento dos cultivos poderia colaborar com a biofixação deste gás, reconhecido como um dos principais causadores do Efeito Estufa (COSTA; MORAIS, 2011).

Apesar de ser tecnicamente viável, o biodiesel produzido através de óleos microalgais ainda não é comercializado, mas o cenário futuro é promissor (CHISTI, 2007; HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012). Isto ocorre devido a barreiras que afetam a viabilidade econômica da produção de biodiesel a partir de microalgas (OLGUIN, 2012). De acordo com Chisti (2007), a eliminação da dependência de combustíveis fósseis e a garantia da sustentabilidade ambiental requer uma redução substancial do custo de produção do biodiesel microalgal para torná-lo competitivo com o diesel.

Segundo Scott et al. (2010) as principais barreiras para a produção do biodiesel de microalgas envolvem:

- a seleção de cepas microalgais, que devem possuir rápido crescimento, elevado teor de lipídios e, principalmente, alto teor de FAMES;
- a forma ideal de cultura, desde a seleção do cultivo em *raceways* ou fotobiorreatores, até meios de cultura e nutrientes utilizados;
- a escolha do método mais eficiente de separação da biomassa do meio de cultura;
- a escolha do processo de extração dos compostos da biomassa microalgal.



Dentre as dificuldades listadas, um dos maiores gargalos da produção industrial é a necessidade de separação da biomassa de microalgas do meio de cultura (DANQUAH et al., 2009; BHAVE et al., 2012). Esta dificuldade está relacionada à baixa biomassa alcançada nos cultivos, que são muito diluídos, com concentrações entre 0,1 e 3,0 g.L<sup>-1</sup> de biomassa seca (CASTRILLO et al., 2013), e com o tamanho microscópico das microalgas, geralmente entre 3 e 30 µm (BEUCKELS et al., 2013). Essas características fazem com que grandes volumes de cultura tenham que ser processados para separar uma pequena biomassa de microalgas.

Outras duas características das microalgas que dificultam a separação da biomassa, por prevenirem a sua agregação e sedimentação, são sua carga superficial geralmente negativa (CHEN et al., 2012) e sua densidade semelhante a da água (BHAVE et al., 2012).

Tanto para a produção de biodiesel, quanto para a extração de compostos de elevado valor comercial, a separação da biomassa das culturas é necessária, e diversos processos têm sido empregados, sendo os principais: filtração, sedimentação, flotação, centrifugação e floculação (GRIMA et al., 2003; BRENNAN; OWENDE, 2010; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; BALLESTEROS, 2012). A escolha do processo de separação da biomassa é dependente das características das microalgas e do destino da biomassa separada, e deve ser simples, rápido, eficiente para o maior número de microalgas, de baixo custo e utilizar o mínimo possível de energia e reagentes químicos (DANQUAH et al., 2009; CHEN et al., 2011; ŞIRIN; CLAVERO; SALVADÓ, 2013). Em geral, os processos de separação utilizados não são eficientes para todos os tipos de microalgas, sendo que algumas técnicas funcionam melhor para uma espécie do que para outra (CHEN et al., 2011; GRANADOS et al., 2012). Além disso, o custo desses processos pode ser significativo, atingindo até 50% do custo total de produção do biodiesel (CHISTI, 2007).

Quanto à filtração, a separação da biomassa se dá pela filtragem da cultura através de telas, por pressão, podendo também ser utilizadas membranas. Entretanto, a filtração pode ser insatisfatória, devido à lentidão do processo, sendo eficiente apenas para microalgas com maior volume celular (GRIMA et al., 2003).

A sedimentação por gravidade é geralmente utilizada para produtos de baixo valor. Entretanto, assim como na filtração, a lentidão do processo torna a técnica ineficiente, devendo ser utilizada após o processo de floculação, que incrementa a velocidade de sedimentação

das microalgas (GRIMA et al., 2003; ŞIRIN; CLAVERO; SALVADO, 2013).

O processo de separação por flotação consiste na inserção de ar na cultura, sob a forma de microbolhas, que englobam as células microalgais e as levam para superfície. A flotação pode também ser precedida por floculação, para aumentar a eficiência. Apesar de ser um método com potencial, as evidências sobre sua viabilidade técnica ou econômica são limitadas (BRENNAN; OWENDE, 2010; CHEN et al., 2011).

No processo de centrifugação a separação da biomassa geralmente é rápida e eficiente, e algumas centrífugas podem processar grandes volumes de cultura em pouco tempo, entretanto é viável somente quando se trata da obtenção de produtos de alto valor, uma vez que demanda o emprego de equipamentos de elevado custo financeiro e consumo de energia elétrica (GRIMA et al., 2003; CHRISTENSON; SIMS, 2011).

Na separação por floculação são utilizados agentes floculantes polieletrólitos, que podem ser naturais (polissacarídeos, como a quitosana) e sintéticos (poliacrilamida e sais metálicos, por exemplo). Os floculantes agem neutralizando ou reduzindo a carga superficial das células microalgais (predominantemente negativa), fazendo com que estas se aglutinem em grandes flocos (GRIMA et al., 2003; BRENNAN; OWENDE, 2010; BANERJEE et al., 2012). Necessariamente os floculantes devem ser de baixo custo e eficazes em baixa concentração, além de não prejudicarem o posterior processamento e uso da biomassa (GRIMA et al., 2003; BORGES et al., 2011).

A floculação é um processo de pré-separação da biomassa, sendo necessária a posterior utilização de outro método, como a centrifugação, filtração, sedimentação e flotação (AMARO; GUEDES; MALCATA, 2011; CHRISTENSON; SIMS, 2011; CASTRILLO et al., 2013).

Uma separação eficiente das microalgas do meio de cultura pode ser alcançada apenas com a alteração do pH (GRIMA et al., 2003; LEE et al., 1998), e é comum em processos de floculação com polieletrólitos o pH da cultura ser corrigido até aproximadamente 10,5 para auxiliar no funcionamento do agente floculante (BORGES et al., 2011). O processo de floculação baseado no aumento do pH é comumente conhecido como autofloculação, embora esta denominação esteja equivocada, uma vez que o processo ocorre devido a formação de precipitados de cálcio ou magnésio que, em certas condições, possuem carga superficial positiva, podendo agregar as células e induzir a floculação (VANDAMME; FOUBERT; MUYLAERT, 2013). Além disso, a separação apenas com

a mudança do pH tem a vantagem de interferir menos no meio de cultura do que os agentes floculantes, podendo o meio ser reutilizado apenas com o reajuste do pH (LEE et al., 1998; CHEN et al., 2012).

De acordo com a literatura, até o momento não há nenhum método de separação da biomassa de microalgas simples e de baixo custo que possa ser utilizado em larga escala para a obtenção de matéria-prima para a produção de biodiesel (CHRISTENSON; SIMS, 2011). Assim, é fundamental o desenvolvimento de processos eficientes de separação da biomassa de microalgas para o estabelecimento da viabilidade econômica do seu emprego visando à produção de biocombustíveis (AMARO; GUEDES; MALCATA, 2011; CHEN et al., 2011; SINGH; DAR, 2011).



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver estudo sobre a eficiência de separação da biomassa de microalgas do meio de cultura e sobre o efeito dos métodos de separação utilizados sobre a biomassa, visando à produção de biodiesel.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a eficiência dos métodos de floculação e de alteração do pH visando à separação da biomassa de culturas das microalgas *Nannochloropsis oculata* e *Phaeodactylum tricornutum*;
- Determinar o efeito dos métodos de separação da biomassa, floculação e alteração do pH, no teor de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) da biomassa de *Nannochloropsis oculata* e *Phaeodactylum tricornutum*.

O artigo foi elaborado seguindo normas do periódico internacional *Biomass & Bioenergy*, classificado no Qualis CAPES como A1 em Zootecnia / Recursos Pesqueiros, com Fator de Impacto (2013) de 3,411.

### 3 ARTIGO CIENTÍFICO

#### **Eficiência de separação da biomassa de microalgas por floculação e efeitos deste método sobre a composição de ácidos graxos visando à produção de biodiesel**

A. S. Vieira<sup>a</sup>, R. G. Lopes<sup>b</sup>, R. B. Derner<sup>b</sup>, L. Vinatea<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil

<sup>b</sup> Laboratório de Cultivo de Algas, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil

<sup>c</sup> Laboratório de Camarões Marinhos, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil

#### 1. INTRODUÇÃO

O mundo enfrenta uma crescente demanda de energia, agravada pela depleção das tradicionais fontes fósseis de combustíveis, acarretando na necessidade de se encontrar alternativas energéticas sustentáveis e renováveis, como os biocombustíveis [1-3]. Dentre estes, maior atenção tem sido dada ao biodiesel, por derivar de fontes renováveis e ser menos poluente que o diesel de petróleo. O biodiesel é comumente produzido a partir de óleo de soja, mamona, entre outros [4,5]. Entretanto, seria necessário um aumento significativo no número de áreas agrícolas para que estas fontes satisfizessem uma parte da demanda existente por combustíveis [6,7].

Por possuírem alta reserva lipídica, até 50% do peso da biomassa seca, as microalgas tem sido apontadas por alguns autores como sendo a única fonte de matéria-prima renovável para produção de biodiesel capaz de substituir completamente o diesel fóssil [5,6,8-11]. Além disso, elas têm a capacidade de duplicar sua biomassa em um período de 24 horas [9], seu cultivo pode ser implantado em solos impróprios para agricultura [6,12], e sua tolerância à alta gama de condições ambientais extremas faz com que águas salobras e efluentes domésticos e aquícolas possam ser utilizados como meio de cultura [5,10].

Entretanto, o biodiesel ainda não é produzido e comercializado a partir de microalgas devido ao alto custo de produção [6]. Dentre os gargalos tecnológicos existentes, diversos autores apontam que o principal fator é a dificuldade em separar a biomassa microalgal do meio

de cultura, podendo dispendir entre 20 a 50% do custo total da produção de biodiesel a partir dessa matéria-prima [6,7,13-15].

A dificuldade de separação da biomassa da cultura é agravada pela baixa concentração de biomassa obtida nas culturas tradicionais, entre 0,1 e 3,0 g L<sup>-1</sup>, e o tamanho microscópico das microalgas, entre 3 e 30 µm [16-18]. Além disso, as microalgas possuem carga superficial negativa, que previne a agregação das células, e densidade semelhante a da água, que dificulta a sua sedimentação [14,17,19].

Diversos processos de separação da biomassa de microalgas do meio de cultura têm sido empregados, como filtração, sedimentação, flotação, centrifugação e floculação, sendo que estes devem ser escolhidos de acordo com a microalga e o destino da biomassa [15,16,20-23].

Os processos de filtração e sedimentação podem ser insatisfatórios, uma vez que são lentos, podendo ser aplicados para microalgas de maior volume celular [16,19]. Apesar de o processo de flotação ser visto com bom potencial, as informações sobre sua viabilidade são limitadas [13,22]. A centrifugação é um processo rápido de separação, mas que tem alta demanda energética, sendo sua utilização justificada para a obtenção de produtos com alto valor de mercado [16,24].

No processo de floculação são utilizados agentes floculantes polieletrólitos, que agem neutralizando ou reduzindo a carga superficial das células microalgais, ocasionando sua aglutinação, formando flocos que naturalmente sedimentam, ou em alguns casos específicos, flutam. Na escolha do agente floculante devem ser considerados seu grau de interferência no processamento e uso da biomassa obtida, a eficácia em baixa concentração e o seu custo [12,22,25].

A floculação normalmente é utilizada como um pré-tratamento, para posterior utilização de outro método como os citados anteriormente [2,18,24,26]. Por exemplo, segundo Vandamme et al. [27], concentrar as microalgas por floculação antes da centrifugação poderia reduzir a demanda de energia desta.

A utilização de polímeros catiônicos pode neutralizar ou reduzir a carga superficial negativa das microalgas, promovendo a agregação das células, através da ligação célula-floculante-célula, um processo conhecido como *bridging*, fazendo com que sua utilização para separação da biomassa microalgal seja promissora [16,25].

Uma separação eficiente das microalgas também pode ser alcançada apenas com a alteração do pH neutro para alcalino [16,28], possuindo a vantagem de não interferir no meio de cultura, que pode ser



reutilizado apenas com o ajuste deste parâmetro [17,28]. O processo de floculação baseado no aumento do pH está associado com a formação de precipitados de cálcio ou magnésio. Em certas condições, esse precipitado possui carga superficial positiva, agregando as células microalgais, e promovendo a floculação [29].

Diversos trabalhos relatam que, até o momento, não há nenhum método simples e de baixo custo para ser utilizado em larga escala, e o desenvolvimento dos processos de separação da biomassa de microalgas e o aumento da eficiência são fundamentais para que seja alcançada a viabilidade econômica da produção de biocombustíveis [2,13,15,24,30].

Outro gargalo do processo de produção do biodiesel de microalgas está na extração dos lipídios da biomassa, que não tem recebido atenção satisfatória [31], uma vez que o método de separação pode interferir na quantidade e na qualidade dos lipídios extraídos da biomassa [18,25].

Este estudo teve como objetivo a determinação da eficiência de separação da biomassa de microalgas através de floculação em culturas das microalgas marinhas *Nannochloropsis oculata* e *Phaeodactylum tricorutum* e o efeito destes métodos no teor de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMEs, na sigla em inglês, que são empregados para a obtenção do biodiesel) da biomassa visando à produção de biodiesel.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Delineamento experimental

As microalgas marinhas *Nannochloropsis oculata* e *Phaeodactylum tricorutum* foram cultivadas em recipientes de 5 L contendo meio f/2 de Guillard [32] modificado, em temperatura  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , fotoperíodo 24 h de luz com iluminação empregando lâmpadas fluorescentes tipo Luz do Dia, de 80 W, numa irradiância de  $150 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , salinidade de 35 e aeração constante com injeção de  $\text{CO}_2$  (1%).

O crescimento das culturas, bem como as fases da curva de crescimento, foram definidos através da determinação diária da densidade celular em Câmara de Neubauer e da biomassa seca ( $\text{mg L}^{-1}$ ), para a qual um volume de 10 mL de cultura era filtrado em filtro de fibra de vidro Whatman GF/F de 47 mm, com poro nominal de  $0,7 \mu\text{m}$ , com peso previamente determinado, levado à estufa a  $60^\circ \text{C}$ , até estabilização do peso e pesado novamente para determinar a biomassa.

Para determinar a Eficiência de Separação da Biomassa (ESB) foram realizados quatro tratamentos em triplicata, sendo três tratamentos com diferentes concentrações de floculante de poliácridamida ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $7,5 \text{ mg L}^{-1}$  e  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) e um tratamento sem adição de floculante, em que foi adicionado solução de Hidróxido de Sódio (NaOH), a 1 N, até a cultura atingir pH 10,5. O agente floculante utilizado foi FLOPAM FO 4698 SH, adquirido da SNF FLOERGER, composto de poliácridamida catiônica, com densidade de carga média e alto peso molecular. Os tratamentos com floculante foram nomeados no geral como PAC (poliácridamida catiônica) e individualmente como 5, 7,5 e 10 (relacionados a dosagem em  $\text{mg L}^{-1}$ ), e o tratamento com NaOH de N.

Amostras das culturas de *P. tricornutum* e *N. oculata* foram coletadas nas fases exponencial (3º dia de cultivo) e estacionária (7º dia de cultivo). As fases foram nomeadas como E (exponencial) e S (estacionária). Foram utilizados três valores de biomassa seca na fase exponencial e na estacionária (Tabela 1), sendo a biomassa sem diluição (nomeada 0), metade da biomassa ( $\frac{1}{2}$ ) e um quarto da biomassa ( $\frac{1}{4}$ ). As diluições foram realizadas com água salgada autoclavada.

Tabela 1 – Valores de densidade celular e biomassa das diluições por fase de crescimento das microalgas *Nannochloropsis oculata* e *Phaeodactylum tricornutum*.

Fase e Diluição	<i>N. oculata</i>		<i>P. tricornutum</i>	
	DC ( $\times 10^4$ cels $\text{mL}^{-1}$ )	B ( $\text{mg L}^{-1}$ )	DC ( $\times 10^4$ cels $\text{mL}^{-1}$ )	B ( $\text{mg L}^{-1}$ )
E-0	3.600	230,0	2.425	678,8
E- $\frac{1}{2}$	2.065	153,3	1.435	381,8
E- $\frac{1}{4}$	1.030	101,5	805	192,8
S-0	5.275	313,7	3.915	1.125,8
S- $\frac{1}{2}$	3.200	210,0	2.225	618,8
S- $\frac{1}{4}$	1.670	133,5	1.100	281,3

E - fase exponencial; S - fase estacionária; DC - Densidade celular;

B - Biomassa; 0 - biomassa sem diluição;  $\frac{1}{2}$  - metade da biomassa;

$\frac{1}{4}$  - um quarto da biomassa.

As amostras das culturas (90 mL) foram dispostas em provetas de 100 mL, levadas ao agitador magnético (250 rpm) e mantidas em temperatura ambiente (aproximadamente  $24 \text{ }^\circ\text{C}$ ). O floculante foi adicionado nas dosagens estabelecidas e a mistura foi mantida em agitação por 3 min, tempo estabelecido previamente e suficiente para a formação dos flocos em culturas de diversas espécies microalgais [25].

Para o tratamento com a alteração do pH foi adicionado NaOH 1 N às amostras, mantidas em agitação, até alcançar pH 10,5. Passado os 3 min da adição das soluções de flocculante e da alteração do pH, as amostras foram mantidas em repouso por 15 min [33] para que ocorresse a sedimentação dos flocos. O emprego de PAC foi avaliado apenas no pH natural das culturas, uma vez que um pH acima de 10,5 poderia promover a flocculação.

## 2.2. Cálculo da eficiência de separação da biomassa

Para o cálculo da Eficiência de Separação da Biomassa (ESB) foi retirada uma alíquota de cada cultura, antes da flocculação, para a contagem do número de células algais em Câmara de Neubauer e determinação da Densidade Celular Inicial (DCi). Após a adição da solução de flocculante, da agitação por 3 min e passados 15 min de sedimentação, foi retirada uma alíquota de cada unidade experimental, na altura dos 50 mL da proveta, para contagem do número de células, determinando a Densidade Celular Final (DCf). O cálculo da ESB foi feito empregando a fórmula abaixo (adaptada de Salim et al. [34]):

$$ESB(\%) = \frac{(DCi - DCf)}{DCi} * 100$$

Uma ESB acima de 80% foi considerada como satisfatória [35,36].

## 2.3. Análise de ácidos graxos e FAMES

As análises de ácidos graxos foram realizadas na fase estacionária, pois é nesta fase que a maioria das microalgas acumula maior quantidade de lipídios, através de fatores como a privação de fósforo [37], nitrogênio [38] ou sílica (para diatomáceas) [22].

Amostras (um *pool* de cada tratamento) da biomassa de *P. tricorutum*, referentes aos tratamentos S5-0, S7,5-0 S10-0 e SN-0, foram centrifugadas a aproximadamente 3.000 x g, sendo lavadas uma vez com solução isotônica de Formiato de Amônio (3,5%), e secas em estufa a 60 °C por 24 horas. As análises dos teores de ácidos graxos e FAMES foram realizadas conforme a metodologia descrita por Menezes et al. [39].

## 2.4. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando necessário, foi aplicado o teste de Tukey para separação das médias, com um nível de significância de  $p < 0,05$ . Para a análise estatística dos dados foi empregado o programa STATISCA 10.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Eficiência de separação da biomassa

Em relação à microalga *N. oculata*, nenhuma das dosagens de floculante empregadas resultou na formação de flocos. Somente no tratamento com NaOH foi possível observar a formação de flocos, portanto apenas os dados referentes a este tratamento são apresentados (Tabela 2). Para *N. oculata*, não houve diferença estatisticamente significativa entre as fases de crescimento com uso de NaOH (Tabela 2). Para o fator diluição, houve diferença entre as três diluições testadas, sendo 0 a melhor diluição, com 89,96% de eficiência (Tabela 2). Houve diferença estatisticamente significativa entre a interação dos fatores fase e diluição, com o uso de NaOH, cujos tratamentos eficientes foram E-0 (93,84%) e S-0 (86,07%), ambos sem diluição (Tabela 2). A ESB dentro das fases foi maior quanto menor a diluição utilizada.

Segundo alguns autores [35,36] podemos considerar um tratamento como eficiente caso ele resulte em uma separação de biomassa acima de 80%, e apenas os tratamentos com diluição 0 (E-0, S-0) apresentaram ESB satisfatórias com o uso de NaOH.

Knuckey et al. [40] obtiveram eficiência menor que 30% na floculação de *N. oculata* com NaOH na fase exponencial, provavelmente devido a baixa densidade celular utilizada ( $1.000$  a  $2.000 \times 10^4$  cel mL<sup>-1</sup>), semelhante a observada no tratamento EN-¼ ( $1.030 \times 10^4$  cel mL<sup>-1</sup>) e que também apresentou baixa eficiência (57,25%). Além disso, o tratamento EN-0, também da fase exponencial, atingiu  $3.600 \times 10^4$  cel mL<sup>-1</sup>, e resultou na maior eficiência, o que nos leva a concluir que uma elevada densidade celular e, principalmente, elevada biomassa, é necessária para uma separação satisfatória através da utilização do aumento do pH para *N. oculata*. Isto também é observado na fase estacionária, uma vez que o tratamento SN-¼ obteve  $1.670 \times 10^4$  cel mL<sup>-1</sup>, e a separação com a utilização de NaOH determinou uma eficiência de apenas 57,99%.

Tabela 2 – Eficiência de separação da biomassa de *Nannochloropsis oculata* com NaOH e teste de comparação de médias para os fatores fase e diluição, e sua interação.

Fase	Eficiência (%)
E	73,77 <sup>a</sup>
S	72,67 <sup>a</sup>
Diluição	Eficiência (%)
0	89,96 <sup>a</sup>
½	72,09 <sup>b</sup>
¼	57,62 <sup>c</sup>
Fase x Diluição	Eficiência (%)
E-0 (EN-0)	93,84 <sup>a</sup>
S-0 (SN-0)	86,07 <sup>a</sup>
S-½ (SN-½)	73,96 <sup>b</sup>
E-½ (EN-½)	70,22 <sup>b</sup>
S-¼ (SN-¼)	57,99 <sup>c</sup>
E-¼ (EN-¼)	57,25 <sup>c</sup>

E - fase exponencial; S - fase estacionária; 0 - biomassa sem diluição; ½ - metade da biomassa; ¼ - um quarto da biomassa. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Já Wu et al. [41] conseguiram, com elevação do pH para 9,0, obter 90% de floculação de *N. oculata* após 10 min de sedimentação, com uma biomassa de  $1.600 \text{ mg L}^{-1}$ , um tempo menor de sedimentação e um pH mais baixo quando comparado com os resultados obtidos neste experimento, talvez em virtude da biomassa utilizada por aqueles autores, demonstrando que em alta biomassa um tempo menor de sedimentação pode ser utilizado.

Vários autores [13,16,42] consideram que a concentração celular antes da separação deve ser a maior possível, pois há uma maior frequência no encontro das células, favorecendo a eficiência. Granados et al. [33] definiram valor mínimo de  $500 \text{ mg L}^{-1}$  para a biomassa antes da separação, afirmando que abaixo disso a eficiência de separação diminui. Apesar dessas afirmações, os tratamentos E-0 e S-0, que apresentaram biomassa menor que a indicada,  $230,0$  e  $313,7 \text{ mg L}^{-1}$  respectivamente, resultaram numa separação eficiente com o uso de NaOH.

Chen et al. [17] utilizaram amônia para alterar o pH de culturas de 15 L de *N. oculata* na fase estacionária, e conseguiram quase 90% de eficiência em 1 h e até 99% de recuperação em 12 h. Entretanto este longo tempo reportado pelos autores pode ser impraticável em cultivos

comerciais e, no presente trabalho, os tratamentos foram eficientes em um tempo menor de sedimentação, de 15 minutos.

Para *P. tricorutum* não houve diferença estatisticamente significativa para o fator fase (Tabela 3). Para o fator diluição, houve diferença estatisticamente significativa, sendo 0 a melhor diluição com 99,40% de eficiência (Tabela 3). Entre os floculantes, o NaOH foi estatisticamente inferior às doses de PAC testadas (Tabela 3).

Tabela 3 – Eficiência de separação da biomassa de *Phaeodactylum tricorutum* e teste de comparação de médias para os fatores fase, diluição e floculante.

Fase	Eficiência (%)
E	98,94 <sup>a</sup>
S	98,85 <sup>a</sup>
Diluição	Eficiência (%)
0	99,40 <sup>a</sup>
½	99,00 <sup>b</sup>
¼	98,28 <sup>c</sup>
Floculante	Eficiência (%)
10	99,40 <sup>a</sup>
7,5	99,29 <sup>a</sup>
5	99,21 <sup>a</sup>
N	97,67 <sup>b</sup>

E - fase exponencial; S - fase estacionária; 0 - biomassa sem diluição; ½ - metade da biomassa; ¼ - um quarto da biomassa; 5 - 5 mg L<sup>-1</sup>; 7,5 - 7,5 mg L<sup>-1</sup>; 10 - 10 mg L<sup>-1</sup>; N - NaOH. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (p < 0,05).

Todas as interações entre os fatores apontaram diferenças estatisticamente significativas para separação de *P. tricorutum* (Tabela 4). A interação entre os fatores fase e diluição resultou em eficiência de 99,79% no tratamento S-0 (Tabela 4), estatisticamente superior aos demais tratamentos, talvez por este possuir maior biomassa (Tabela 1). A interação entre fase e floculante demonstrou diferença significativa entre as doses de PAC e de NaOH, sendo a eficiência de PAC superior a do NaOH, independente da fase de crescimento (Tabela 4). A interação entre os fatores floculante e diluição (Tabela 4) demonstrou maior eficiência com o uso das doses de PAC nas diluições 0 e ½ quando comparados a diluição de ¼ e ao NaOH, que foi inferior nos tratamentos N-½ e N-¼. Para a interação entre os três fatores (Tabela 4), os tratamentos mais eficientes foram S10-0, S7,5-0 e S5-0, todos da fase

estacionária, sem diluição e com uso de PAC. O melhor tratamento com NaOH foi SN-0, da fase estacionária e com diluição 0, tendo os outros tratamentos com NaOH as menores eficiências obtidas. No geral, a utilização de PAC resultou em valores mínimos de eficiência de 98,55% no tratamento S5-¼ e valores máximos de 99,95% no tratamento S10-0 (Tabela 4). Já a utilização de NaOH resultou em valores mínimos de eficiência de 94,82% no tratamento SN-¼ e máximos de 99,40% no tratamento SN-0 (Tabela 4).

Tabela 4 – Eficiência de separação da biomassa de *Phaeodactylum tricornutum* e teste de comparação de médias para as interações entre os fatores fase, diluição e floculante.

(continua)

Fase x Diluição	Eficiência (%)
S-0	99,79 <sup>a</sup>
E-½	99,04 <sup>b</sup>
E-0	99,01 <sup>b</sup>
S-½	98,96 <sup>b</sup>
E-¼	98,76 <sup>b</sup>
S-¼	97,79 <sup>c</sup>
Fase x Floculante	Eficiência (%)
S10	99,41 <sup>a</sup>
E10	99,39 <sup>a</sup>
S5	99,31 <sup>a</sup>
E7,5	99,31 <sup>a</sup>
S7,5	99,27 <sup>a</sup>
E5	99,12 <sup>a</sup>
EN	97,92 <sup>b</sup>
SN	97,41 <sup>b</sup>
Floculante x Diluição	Eficiência (%)
10-0	99,83 <sup>a</sup>
7,5-0	99,77 <sup>ab</sup>
5-0	99,72 <sup>abc</sup>
10-½	99,36 <sup>abcd</sup>
5-½	99,29 <sup>abcd</sup>
7,5-½	99,15 <sup>abcd</sup>
10-¼	99,01 <sup>bcde</sup>
7,5-¼	98,95 <sup>cdef</sup>
5-¼	98,63 <sup>def</sup>
N-0	98,28 <sup>ef</sup>
N-½	98,20 <sup>f</sup>
N-¼	96,52 <sup>g</sup>

Tabela 4 – Eficiência de separação da biomassa de *Phaeodactylum tricornutum* e teste de comparação de médias para as interações entre os fatores fase, diluição e floculante.

		(conclusão)
Fase x Floculante x Diluição		Eficiência (%)
	S10-0	99,95 <sup>a</sup>
	S7,5-0	99,93 <sup>a</sup>
	S5-0	99,88 <sup>a</sup>
	E10-0	99,71 <sup>ab</sup>
	E7,5-0	99,62 <sup>abc</sup>
	E5-0	99,56 <sup>abc</sup>
	S5-½	99,49 <sup>abc</sup>
	E10-½	99,42 <sup>abcd</sup>
	SN-0	99,40 <sup>abcd</sup>
	S10-½	99,31 <sup>abcd</sup>
	E7,5-½	99,25 <sup>abcd</sup>
	E5-½	99,09 <sup>abcde</sup>
	E7,5-¼	99,05 <sup>abcde</sup>
	E10-¼	99,05 <sup>abcde</sup>
	S7,5-½	99,04 <sup>abcde</sup>
	S10-¼	98,97 <sup>abcde</sup>
	S7,5-¼	98,85 <sup>abcde</sup>
	E5-¼	98,72 <sup>abcde</sup>
	S5-¼	98,55 <sup>bcede</sup>
	EN-½	98,40 <sup>cde</sup>
	EN-¼	98,22 <sup>def</sup>
	SN-½	98,01 <sup>ef</sup>
	EN-0	97,15 <sup>f</sup>
	SN-¼	94,82 <sup>g</sup>

E - fase exponencial; S - fase estacionária; 0 - biomassa sem diluição; ½ - metade da biomassa; ¼ - um quarto da biomassa; 5 - 5 mg L<sup>-1</sup>; 7,5 - 7,5 mg L<sup>-1</sup>; 10 - 10 mg L<sup>-1</sup>; N - NaOH. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (p < 0,05).

Considerando-se o valor de eficiência mínimo de 80% [35,36], todos os tratamentos resultaram em eficiência satisfatória, uma vez que a menor ESB foi do tratamento SN-¼ com 94,82% (Tabela 4). Além disso, a eficiência foi elevada mesmo em valores de biomassa abaixo de 500 mg L<sup>-1</sup> (E-½, E-¼ e S-¼) (Tabela 1).

Bilanovic, Shelef e Sukenik [43] constataram que polímeros catiônicos orgânicos induziram uma eficiência de floculação maior que 90% na separação de microalgas de água doce com doses consideradas baixas, entre 1 e 10 mg L<sup>-1</sup>, no entanto ponderaram que uma alta



salinidade poderia inibir a floculação, pois em altas forças iônicas o polímero encolheria, falhando no processo de *bridging*. Apesar disto, no presente experimento, o floculante mostrou-se extremamente eficiente para a microalga marinha *P. tricornutum*, em salinidade 35, e com dosagens semelhantes as do estudo citado. Outros experimentos também resultaram em elevada eficiência com o emprego de baixas dosagens, como no trabalho de Jancula, Marsalkova e Mrsalek [44] que obtiveram 80% de separação da biomassa com doses de PAC entre 3 e 5 mg L<sup>-1</sup>, em 1 hora de sedimentação, e Uduman et al. [45] que alcançaram eficiência de 90% de separação de *Chlorococcum* sp. utilizando 3 a 4 mg L<sup>-1</sup> de polímeros catiônicos com 30 minutos de sedimentação. Os resultados obtidos neste experimento sugerem que, além da baixa dose de PAC necessária, um menor tempo de sedimentação pode ser utilizado após a floculação, ao contrário dos estudos citados que aguardaram a sedimentação por até 1 hora. Além disso, apesar dos estudos citados terem obtido boas eficiências, entre 80 e 90%, uma maior eficiência foi obtida neste experimento, até 99,95%.

Şirin et al. [46], para separação de *P. tricornutum*, com tempo de sedimentação de 15 e 30 min, apontaram valores de dosagem ótima de 30 mg L<sup>-1</sup> para os floculantes cloreto de polialumínio e sulfato de alumínio, e de 20 mg L<sup>-1</sup> para quitosana (com pH próximo de 10). Os resultados obtidos sugerem que a PAC é mais eficiente que os outros compostos citados acima para separação de *P. tricornutum*, devido à menor dose utilizada e com tempo de sedimentação semelhante.

O emprego de PAC resultou em elevada eficiência para *P. tricornutum* e ineficiência para *N. oculata*, sendo que este fato corrobora a afirmação de Chen et al. [13] e de Granados et al. [33] de que a eficiência de um determinado floculante é específico para cada espécie. Este resultado na floculação parece sugerir que as diferenças estruturais entre as microalgas podem ter influenciado na ação da PAC (por exemplo, *P. tricornutum* possui frústula e seu volume celular é maior que o de *N. oculata*). De acordo com alguns autores [47,48] a eficiência de floculação pode estar relacionada a características da parede celular da microalga. Lubián [49], embora não tenha encontrado uma relação clara entre a resposta da floculação com quitosana e o grupo taxonômico das microalgas, indicou que outros fatores, como volume celular e composição da parede celular, podem ser mais determinantes na eficiência. Outra observação feita por Eldridge, Hill e Gladman [48] em seus experimentos, foi de que a microalga *Nannochloropsis salina* necessitaria de mais floculante, devido ao seu pequeno tamanho e elevada área superficial, assim como a microalga *N. oculata*, o que nos

leva a ponderar que a dose de PAC necessária para a floculação desta microalga possa ser maior do que aquelas utilizadas neste estudo.

No experimento de Wu et al. [41], a elevação do pH do meio para mais de 9,0 induziu uma eficiência de floculação acima de 90% após 10 minutos de sedimentação para *P. tricornutum* com biomassa de 1.800 mg L<sup>-1</sup>. Şirin et al. [46] obtiveram uma eficiência de separação acima de 90% com a utilização de NaOH para *P. tricornutum*, em pH 10,6, na fase estacionária. Os dados anteriores corroboram os resultados obtidos neste experimento, que resultaram em eficiência de até 99,40%, e rápida sedimentação, na separação da biomassa de *P. tricornutum* com a utilização de NaOH.

Spilling, Seppala e Tamminen [42] flocularam *P. tricornutum*, com biomassa seca de 1.100 mg L<sup>-1</sup>, através da elevação do pH do meio de 7 para 10,8, apenas diminuindo o fluxo de CO<sub>2</sub> por cinco horas. Şirin et al. [46] conseguiram, em culturas de *P. tricornutum*, atingir um pH alcalino elevado durante a fase de crescimento exponencial devido ao consumo de CO<sub>2</sub> pelo processo fotossintético. Esse processo, apenas ajustando o fornecimento de ar ou CO<sub>2</sub>, pode ser uma alternativa mais econômica em relação ao uso do NaOH, mas também necessita de maior tempo de tratamento para atingir o pH ideal. É importante ressaltar que, por conta dos elevados custos energéticos, as culturas em grande escala tendem a não utilizar CO<sub>2</sub> [2].

É importante salientar que a adição de floculante não interferiu no pH das culturas, ficando na média de 7,78 para *N. oculata* na fase exponencial e 6,90 na fase estacionária, e para *P. tricornutum* 7,34 na fase exponencial e 7,58 na fase estacionária. GODOS et al. [50] também relataram que floculantes a base de poliacrilamida não causaram uma variação significativa no pH da cultura de microalgas de água doce.

### **3.2. Teores de ácidos graxos e FAMES**

Devido aos resultados obtidos no experimento de ESB, a análise de ácidos graxos de *N. oculata* não foi realizada.

Os teores de ácidos graxos da biomassa de *P. tricornutum* mostraram pouca variação entre os tratamentos com PAC, mas apresentaram uma variação nos ácidos graxos predominantes em relação à biomassa floculada com NaOH (Tabela 5).

Tabela 5: Teor total de ácidos graxos na biomassa de *Phaeodactylum tricornutum*.

Ácidos Graxos	Teor total (%)			
	S5-0	S7,5-0	S10-0	SN-0
Mirístico (C14:0)	4,7	4,4	4,7	4,3
Pentadecílico (C15:0)	0,4	0,3	0,3	23,2
Palmítico (C16:0)	22,0	20,4	21,0	41,6
Palmitoleico (C16:1)	40,2	42,3	39,4	1,3
Hexadienoico (C16:2 c7,10)	1,4	1,6	1,5	0,6
Hexadienoico (C16:2 c9,12)	0,5	0,6	0,6	2,7
Hexatrienoico (C16:3)	3,2	3,3	3,6	-
Estearico (C18:0)	0,5	0,4	0,5	0,5
Oleico (C18:1 c9)	0,5	5,9	7,0	7,3
Vacênico (C18:1 c11)	7,1	1,8	2,0	3,0
Linoleico (C18:2)	0,4	0,6	0,8	1,5
Gama Linolênico (C18:3 c6,9,12)	1,1	0,1	-	-
Linolênico (C18:3 c9,12,15)	0,3	0,3	0,3	-
Octotetraenoico (C18:4)	0,3	0,3	0,3	-
Araquidônico (C20:4)	0,3	0,4	0,4	0,6
Eicosapentaenoico (C20:5)	14,0	13,2	13,8	12,1
Behênico (C22:0)	-	1,8	1,3	-
Tricosonoico (C23:0)	0,7	0,5	0,8	0,8
Eicosaenoico (C23:1)	0,6	0,6	0,7	0,5
Lignocérico (C24:0)	-	0,3	0,2	-

E - fase exponencial; S - fase estacionária; 0 - biomassa sem diluição;

½ - metade da biomassa; ¼ - um quarto da biomassa; 5 - 5 mg L<sup>-1</sup>;

7,5 - 7,5 mg L<sup>-1</sup>; 10 - 10 mg L<sup>-1</sup>; N - NaOH.

O ácido palmitoleico (C16:1) com teores de até 42,3% nos tratamentos com PAC resultou num teor de apenas 1,3% dos ácidos graxos totais no tratamento com NaOH, que por sua vez teve um aumento dos ácidos palmítico (C16:0) de 22% para 41,6% e pentadecílico (C15:0) de 0,4% para 23,2% (Tabela 5).

Castrillo et al. [18] observaram que, para a microalga de água doce *Scenedesmus obliquus*, o método de separação influenciou o perfil de ácidos graxos, sendo que nas amostras separadas pela adição de NaOH ocorreram a diminuição da concentração de ácidos graxos insaturados e o aumento na concentração de ácidos graxos saturados, em comparação com amostras obtidas por centrifugação. Além disso, a concentração de ácido palmítico foi a mais abundante entre todos os ácidos graxos analisados nas amostras de biomassa microalgal

coletadas. Borges et al. [51] obtiveram para *N. oculata* valores de 45,42% de lipídios totais com a biomassa separada por centrifugação e 4,40% nas amostras separadas com a utilização de NaOH. Ambas foram lavadas com formiato de amônio e percebeu-se aumento na concentração de ácido palmítico da biomassa centrifugada em relação à biomassa separada com NaOH, de 28,8% para 58,9%, respectivamente. Em nosso experimento, a concentração de ácido palmítico também aumentou consideravelmente, assim como nos estudos citados anteriormente. Foi obtido teor médio de 21,1% nas três amostras de PAC, e teor de 41,6% na amostra de NaOH. A grande diferença na concentração de lipídios totais observada por Borges et al. [51] pode estar relacionada com a mudança na concentração de determinados ácidos graxos, principalmente o ácido palmítico, que foi o mais abundante, nos estudos citados [18,51] e no presente estudo, quando houve a separação utilizando NaOH.

A maior alteração nas classes de ácidos graxos ocorreu entre os monoinsaturados e saturados (Tabela 6), sendo predominantemente saturados no tratamento com NaOH e monoinsaturados nos tratamentos com PAC. Com diferentes doses de PAC ocorreu pequena variação entre os tratamentos (Tabela 6).

A hipótese de Borges et al. [51] para diminuição nos valores lipídicos e para as mudanças nos ácidos graxos predominantes de cada biomassa é a de que o NaOH adere a parede celular da microalga, formando uma crosta que impede que os solventes orgânicos extraíam os ácidos graxos da membrana, provavelmente pela saponificação destes ácidos graxos. A hipótese se baseia no menor rendimento da extração de lipídios e também na diferente composição de ácidos graxos, uma vez que nos tratamentos com NaOH houve uma diminuição na concentração de ácidos graxos insaturados e um aumento nos ácidos graxos saturados. Estes autores afirmam também que, embora não sejam extraídos lipídios da membrana, os lipídios de reserva podem ser extraídos de dentro do citoplasma, devido a maior concentração de ácido palmítico, que é um ácido graxo de reserva na espécie estudada por aqueles autores (*N. oculata*). É importante salientar que ainda não há uma teoria amplamente aceita, e são necessários mais estudos de forma a entender o mecanismo de interação entre o NaOH, as células microalgais e os processos de extração dos lipídios.

Tabela 6 – Teor total de ácidos graxos por classe de saturação da biomassa de *Phaeodactylum tricornutum*.

Tratamento	SFA (%)	MUFA (%)	DUFA (%)	TUFA (%)	PUFA (%)
S5-0	28,3	48,4	4,1	4,6	14,6
S7,5-0	28,1	50,6	3,2	4,0	14,1
S10-0	28,8	49,1	2,9	3,9	15,3
SN-0	70,4	12,1	4,8	0,0	12,7

SFA - ácidos graxos saturados; MUFA - ácidos graxos monoinsaturados; DUFA - ácidos graxos di-insaturados; TUFA - ácidos graxos tri-insaturados; PUFA - ácidos graxos poli-insaturados; E - fase exponencial; S - fase estacionária; 0 - biomassa sem diluição; ½ - metade da biomassa; ¼ - um quarto da biomassa; 5 - 5 mg L<sup>-1</sup>; 7,5 - 7,5 mg L<sup>-1</sup>; 10 - 10 mg L<sup>-1</sup>; N - NaOH.

Em se tratando da produção de biodiesel, conforme a norma Europeia EN14214 [52], o limite máximo aceitável para o teor de ácido linolênico (C18:3) é de 12%, e de 1% para ácidos graxos com mais de três duplas ligações. As amostras analisadas continham teores de ácido linolênico dentro das normas, mas ácidos graxos poli-insaturados (do inglês, PUFAs) acima do permitido, inviabilizando sua utilização direta como matéria prima para produção de biodiesel, ao menos pelo método da transesterificação. Uma das alternativas pode ser o tratamento de hidrogenação ou a mistura do biodiesel rico em PUFAs com um biodiesel rico em ácidos graxos saturados [10].

Para avaliar uma microalga como fonte de biodiesel, mais importante que seu rendimento em lipídios é o rendimento da conversão em FAMES, obtido através de transesterificação da biomassa microalgal, uma vez que o biodiesel é elaborado a partir de FAMES [39].

O rendimento em FAMES (Tabela 7) da biomassa separada do tratamento com NaOH (SN-0), de 127,1 mg g<sup>-1</sup> de biomassa, foi 21,69% menor do que o maior rendimento de 162,3 mg g<sup>-1</sup> do tratamento S7,5-0. Assim como a alteração das classes e da predominância de ácidos graxos, o menor rendimento em FAMES nos indica que a separação com NaOH interfere de forma negativa na biomassa de *P. tricornutum*.

Anthony et al. [53] obtiveram valores entre 9 e 11% de FAMES com a microalga *Scenedesmus obliquus*, através de colheita por centrifugação e floculação (sulfato de alumínio, amido catiônico de milho e amido catiônico de batata), tendo lavado a biomassa com NaOH. O rendimento obtido no presente experimento para a biomassa

separada com NaOH corresponde a 12,71% de FAMES, semelhante ao obtido por Anthony et al. [53]. É possível considerar a possibilidade de que a lavagem da biomassa com NaOH, como feito por Anthony et al. [53], pode ter o mesmo efeito da separação com NaOH sobre a composição da biomassa.

Tabela 7 – Rendimento em FAMES da biomassa de *Phaeodactylum tricornutum*.

Tratamento	Rendimento (mg g <sup>-1</sup> )
S5-0	157,5
S7,5-0	162,3
S10-0	139,4
SN-0	127,1

E - fase exponencial; S - fase estacionária; 0 - biomassa sem diluição;  
 ½ - metade da biomassa; ¼ - um quarto da biomassa; 5 - 5 mg L<sup>-1</sup>;  
 7,5 - 7,5 mg L<sup>-1</sup>; 10 - 10 mg L<sup>-1</sup>; N - NaOH.

Algumas alterações físicas e químicas no meio de cultura podem afetar a síntese e o acúmulo de lipídios nas microalgas, e o pH do meio é um dos estímulos químicos que pode alterar a composição de ácidos graxos das células microalgais [54]. Entretanto, com base na teoria de Borges et al. [51] e nos rendimentos de FAMES de Anthony et al. [53], é possível considerar que a diferença na composição de ácidos graxos e no rendimento em FAMES de *P. tricornutum* seja em decorrência da utilização de NaOH como agente separador e não devido ao aumento do pH do meio.

Como comparação do rendimento em FAMES obtido, podemos citar a soja, oleaginosa mais utilizada no Brasil para produção de biodiesel e que rende 196,9 mg g<sup>-1</sup> de FAMES [39]. O maior rendimento obtido neste trabalho foi com o emprego do tratamento S7,5-0, com 162,3 mg g<sup>-1</sup> de FAMES, aproximadamente 17,57% menor que o rendimento em FAMES da soja. Entretanto, devido ao menor requerimento de área para cultivo de microalgas em comparação ao cultivo de soja [6] e rendimento em FAMES semelhante, a utilização de *P. tricornutum* como fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel é promissora.

#### 4. CONCLUSÃO

A separação da biomassa nas concentrações de floculante avaliadas e com NaOH se mostrou eficiente para a microalga *Phaeodactylum tricorutum*. Entretanto, para *Nannochloropsis oculata* o floculante não é eficiente nas doses testadas, enquanto que o NaOH deve ser utilizado sem diluição da biomassa.

O emprego de NaOH influenciou na concentração de ácidos graxos e nas classes de ácidos graxos da biomassa. O rendimento em FAMES da biomassa de *P. tricorutum* foi satisfatório para os tratamentos S5-0 e S7,5-0. Com isso, devido a ser a menor dose e possuir a mesma eficiência de separação que as doses maiores, sugerimos a utilização de 5 mg L<sup>-1</sup> de PAC para separação da biomassa de *P. tricorutum* na fase estacionária e com a biomassa sem diluição.

Devido a influência negativa do NaOH na biomassa de *P. tricorutum*, não aconselhamos seu uso para separação da biomassa de microalgas.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) pelo apoio financeiro ao Projeto “Potencial Biotecnológico das Microalgas para a Produção de Biodiesel”. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado de A. S. Vieira. Ao Laboratório de Métodos de Extração e Separação (LAMES), do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás pelas análises de ácidos graxos e FAMES.

#### 6. REFERÊNCIAS

- [1] Singh J, Gu S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renew Sust Energy Rev.* 2010;14(9):2596-610.
- [2] Amaro HM, Guedes AC, Malcata FX. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Appl Energ.* 2011;88(10):3402-10.
- [3] Taylor RL, Rand JD, Caldwell GS. Treatment with algae extracts promotes flocculation, and enhances growth and neutral lipid content in *Nannochloropsis oculata* - A candidate for biofuel production. *Mar Biotechnol (NY).* 2012;14(6):774-81.
- [4] Wijffels RH, Barbosa MJ. An outlook on microalgal biofuels. *Science.* 2010;329(5993):796-9.

- [5] Costa JAV, de Morais MG. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. *Bioresource Technol.* 2011;102(1):2-9.
- [6] Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv.* 2007;25(3):294-306.
- [7] Danquah MK, Ang L, Uduman N, Moheimani N, Fordea GM. Dewatering of microalgal culture for biodiesel production: exploring polymer flocculation and tangential flow filtration. *J Chem Technol Biot.* 2009;84(7):1078-83.
- [8] Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng* 2006;101:87.
- [9] Chisti Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol.* 2008;26(3):126-31.
- [10] Converti A, Casazza AA, Ortiz EY, Perego P, Del Borghi M. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chem Eng Process.* 2009;48(6):1146-51.
- [11] Oltra C. Stakeholder perceptions of biofuels from microalgae. *Energy Policy.* 2011;39(3):1774-81.
- [12] Banerjee C, Gupta P, Mishra S, Sen G, Shukla P, Bandopadhyay R. Study of polyacrylamide grafted starch based algal flocculation towards applications in algal biomass harvesting. *Int J Biol Macromol.* 2012;51(4):456-61.
- [13] Chen CY, Yeh KL, Aisyah R, Lee DJ, Chang JS. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technol.* 2011;102(1):71-81.
- [14] Bhave R, Kuritz T, Powell L, Adcock D. Membrane-based energy efficient dewatering of microalgae in biofuels production and recovery of value added co-products. *Environ Sci Technol.* 2012;46(10):5599-606.
- [15] González-Fernández C, Ballesteros M. Linking microalgae and cyanobacteria culture conditions and key-enzymes for carbohydrate accumulation. *Biotechnol Adv.* 2012;30(6):1655-61.
- [16] Grima EM, Belarbi EH, Fernandez FGA, Medina AR, Chisti Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol Adv.* 2003;20(7-8):491-515.
- [17] Chen FJ, Liu ZY, Li DM, Liu CF, Zheng P, Chen SL. Using ammonia for algae harvesting and as nutrient in subsequent cultures. *Bioresource Technol.* 2012;121:298-303.
- [18] Castrillo M, Lucas-Salas LM, Rodriguez-Gil C, Martinez D. High pH-induced flocculation-sedimentation and effect of supernatant reuse



on growth rate and lipid productivity of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technol.* 2013;128:324-9.

[19] Şirin S, Clavero E, Salvado J. Potential pre-concentration methods for *Nannochloropsis gaditana* and a comparative study of pre-concentrated sample properties. *Bioresource Technol.* 2013;132:293-304.

[20] Derner RB, Ohse S, Villela M, Carvalho SMd, Fett R. Microalgae, products and applications. *Ciência Rural.* 2006;36:1959-67.

[21] Lee AK, Lewis DM, Ashman PJ. Microbial flocculation, a potentially low-cost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel. *J Appl Phycol.* 2009;21(5):559-67.

[22] Brennan L, Owende P. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew Sust Energ Rev.* 2010;14(2):557-77.

[23] Vandamme D, Pontes SCV, Goiris K, Foubert I, Pinoy LJJ, Muylaert K. Evaluation of electro-coagulation-flocculation for harvesting marine and freshwater microalgae. *Biotechnol Bioeng.* 2011;108(10):2320-9.

[24] Christenson L, Sims R. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnol Adv.* 2011;29(6):686-702.

[25] Borges L, Moron-Villarreyes JA, D'Oca MGM, Abreu PC. Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. *Biomass Bioenerg.* 2011;35(10):4449-54.

[26] Scholz M, Hoshino T, Johnson D, Riley MR, Cuello J. Flocculation of wall-deficient cells of *Chlamydomonas reinhardtii* mutant cw15 by calcium and methanol. *Biomass Bioenerg.* 2011;35(12):4835-40.

[27] Vandamme D, Foubert I, Fraeye I, Meesschaert B, Muylaert K. Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH: Role of magnesium and calcium and practical implications. *Bioresource Technol* 2012;105:114.

[28] Lee SJ, Kim SB, Kim JE, Kwon GS, Yoon BD, Oh HM. Effects of harvesting method and growth stage on the flocculation of the green alga *Botryococcus braunii*. *Lett Appl Microbiol.* 1998;27(1):14-8.

[29] Vandamme D, Foubert I, Muylaert K. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. *Trends Biotechnol* 2013;31:233.

[30] Singh NK, Dhar DW. Microalgae as second generation biofuel. A review. *Agron Sustain Dev.* 2011;31(4):605-29.

- [31] Halim R, Danquah MK, Webley PA. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnol Adv* 2012;30:709.
- [32] Guillard RRL. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith WL, Chanley MH, editors. *Culture of marine invertebrate animals*. New York, USA: Plenum Press; 1975. p. 26-60.
- [33] Granados MR, Acien FG, Gomez C, Fernandez-Sevilla JM, Grima EM. Evaluation of flocculants for the recovery of freshwater microalgae. *Bioresource Technol*. 2012;118:102-10.
- [34] Salim S, Bosma R, Vermue MH, Wijffels RH. Harvesting of microalgae by bio-flocculation. *J Appl Phycol* 2010;23:849.
- [35] Heasman M, Diemar J, O'Connor W, Sushames T, Foulkes L. Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs - a summary. *Aquac Res*. 2000;31(8-9):637-59.
- [36] Beuckels A, Depraetere O, Vandamme D, Foubert I, Smolders E, Muylaert K. Influence of organic matter on flocculation of *Chlorella vulgaris* by calcium phosphate precipitation. *Biomass Bioenergy* 2013;54:107.
- [37] Guschina IA, Harwood JL. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog Lipid Res* 2006;45:160.
- [38] Chiu SY, Kao CY, Tsai MT, Ong SC, Chen CH, Lin CS. Lipid accumulation and CO<sub>2</sub> utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO<sub>2</sub> aeration. *Bioresource Technol*. 2009;100(2):833-8.
- [39] Menezes RS, Leles MIG, Soares AT, Franco PIBEM, Antoniosi NR, Sant'Anna CL, et al. Evaluation of the potentiality of freshwater microalgae as a source of raw material for biodiesel production. *Quim Nova*. 2013;36(1):10-5.
- [40] Knuckey RM, Brown MR, Robert R, Frampton DMF. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. *Aquacult Eng* 2006;35:300.
- [41] Wu ZC, Zhu Y, Huang WY, Zhang CW, Li T, Zhang YM, et al. Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium. *Bioresource Technol* 2012;110:496.
- [42] Spilling K, Seppala J, Tamminen T. Inducing autoflocculation in the diatom *Phaeodactylum tricorutum* through CO<sub>2</sub> regulation. *J Appl Phycol* 2011;23:959.
- [43] Bilanovic D, Shelef G, Sukenik A. Flocculation of microalgae with cationic polymers - Effects of medium salinity. *Biomass* 1988;17:65.

- [44] Jancula D, Marsalkova E, Marsalek B. Organic flocculants for the removal of phytoplankton biomass. *Aquacult Int* 2011;19:1207.
- [45] Uduman N, Qi Y, Danquah MK, Hoadley AFA. Marine microalgae flocculation and focused beam reflectance measurement. *Chem Eng J*. 2010;162(3):935-40.
- [46] Şirin S, Trobajo R, Ibanez C, Salvadó J. Harvesting the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* with polyaluminum chloride, aluminium sulphate, chitosan and alkalinity-induced flocculation. *J Appl Phycol* 2011;24:1067.
- [47] Teixeira CMLL, Kirsten FV, Teixeira PCN. Evaluation of *Moringa oleifera* seed flour as a flocculating agent for potential biodiesel producer microalgae. *J Appl Phycol*. 2012;24(3):557-63.
- [48] Eldridge RJ, Hill DRA, Gladman BR. A comparative study of the coagulation behaviour of marine microalgae. *J Appl Phycol* 2012;24:1667.
- [49] Lubian LM. Concentrating cultured marine microalgae with chitosan. *Aquacult Eng* 1989;8:257.
- [50] Godos I, Guzman HO, Soto R, Garcia-Encina PA, Becares E, Munoz R, et al. Coagulation/flocculation-based removal of algal-bacterial biomass from piggery wastewater treatment. *Bioresour Technol* 2011;102:923.
- [51] Borges L, Caldas S, D'Oca MGM, Abreu PC. Negative effects of sodium hydroxide and salt content in dry biomass on the lipid content and fatty acids profile of the marine microalgae *Nannochloropsis oculata*. Artigo não publicado.
- [52] European Standard EN ISO 14214. Automotive fuels – fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines – requirements and test methods. 2008.
- [53] Anthony RJ, Ellis JT, Sathish A, Rahman A, Miller CD, Sims RC. Effect of coagulant/flocculants on bioproducts from microalgae. *Bioresour Technol* 2013;149:65.
- [54] Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J* 2008;54:621.



#### 4 REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

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

BANERJEE, C.; GUPTA, P.; MISHRA, S.; SEN, G.; SHUKLA, P.; BANDOPADHYAY, R. Study of polyacrylamide grafted starch based algal flocculation towards applications in algal biomass harvesting. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 4, p. 456-461, 2012.

BEUCKELS, A.; DEPRAETERE, O.; VANDAMME, D.; FOUBERT, I.; SMOLDERS, E.; MUYLAERT, K. Influence of organic matter on flocculation of *Chlorella vulgaris* by calcium phosphate precipitation. **Biomass & Bioenergy**, v. 54, p. 107-114, Jul 2013.

BHAVE, R.; KURITZ, T.; POWELL, L.; ADCOCK, D. Membrane-based energy efficient dewatering of microalgae in biofuels production and recovery of value added co-products. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 10, p. 5599-5606, 2012.

BORGES, L.; MORON-VILLARREYES, J. A.; D'OCA, M. G. M.; ABREU, P. C. Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. **Biomass & Bioenergy**, v. 35, n. 10, p. 4449-4454, 2011.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae -A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557-577, 2010.

CASTRILLO, M.; LUCAS-SALAS, L. M.; RODRIGUEZ-GIL, C.; MARTINEZ, D. High pH-induced flocculation-sedimentation and effect of supernatant reuse on growth rate and lipid productivity of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 324-329, 2013.

CHEN, C. Y.; YEH, K. L.; AISYAH, R.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for

biodiesel production: A critical review. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 71-81, 2011.

CHEN, F. J.; LIU, Z. Y.; LI, D. M.; LIU, C. F.; ZHENG, P.; CHEN, S. L. Using ammonia for algae harvesting and as nutrient in subsequent cultures. **Bioresource Technology**, v. 121, p. 298-303, 2012.

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

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 126-131, 2008.

CHRISTENSON, L.; SIMS, R. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 686-702, 2011.

CONVERTI, A.; CASAZZA, A. A.; ORTIZ, E. Y.; PEREGO, P.; DEL BORGHI, M. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing**, v. 48, n. 6, p. 1146-1151, 2009.

COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 2-9, 2011.

DANQUAH, M. K.; ANG, L.; UDUMAN, N.; MOHEIMANI, N.; FORDEA, G. M. Dewatering of microalgal culture for biodiesel production: exploring polymer flocculation and tangential flow filtration. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, n. 7, p. 1078-1083, 2009.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C.; BALLESTEROS, M. Linking microalgae and cyanobacteria culture conditions and key-enzymes for carbohydrate accumulation. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1655-1661, 2012.

GRANADOS, M. R.; ACIEN, F. G.; GOMEZ, C.; FERNANDEZ-SEVILLA, J. M.; GRIMA, E. M. Evaluation of flocculants for the recovery of freshwater microalgae. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 102-110, 2012.

GRIMA, E. M.; BELARBI, E. H.; FERNANDEZ, F. G. A.; MEDINA, A. R.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 7-8, p. 491-515, 2003.

HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 709-732, May-Jun 2012.

LEE, S. J.; KIM, S. B.; KIM, J. E.; KWON, G. S.; YOON, B. D.; OH, H. M. Effects of harvesting method and growth stage on the flocculation of the green alga *Botryococcus braunii*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 14-18, 1998.

OLGUIN, E. J. Dual purpose microalgae-bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a Biorefinery. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 5, p. 1031-1046, 2012.

OLTRA, C. Stakeholder perceptions of biofuels from microalgae. **Energy Policy**, v. 39, n. 3, p. 1774-1781, 2011.

SCOTT, S. A.; DAVEY, M. P.; DENNIS, J. S.; HORST, I.; HOWE, C. J.; LEA-SMITH, D. J.; SMITH, A. G. Biodiesel from algae: challenges and prospects. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 277-286, 2010.

SINGH, N. K.; DHAR, D. W. Microalgae as second generation biofuel. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 31, n. 4, p. 605-629, 2011.

ŞİRİN, S.; CLAVERO, E.; SALVADO, J. Potential pre-concentration methods for *Nannochloropsis gaditana* and a comparative study of pre-concentrated sample properties. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 293-304, 2013.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.

TAHER, H.; AL-ZUHAIR, S.; AL-MARZOUQI, A. H.; HAIK, Y.; FARID, M. M. A review of enzymatic transesterification of microalgal oil-based biodiesel using supercritical technology. **Enzyme Research**, v. 2011, article ID 468292, 25 p., 2011.

TAYLOR, R. L.; RAND, J. D.; CALDWELL, G. S. Treatment with algae extracts promotes flocculation, and enhances growth and neutral lipid content in *Nannochloropsis oculata* - A candidate for biofuel production. **Marine Biotechnology**, v. 14, n. 6, p. 774-781, 2012.

VANDAMME, D.; FOUBERT, I.; MUYLAERT, K. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 4, p. 233-239, 2013.

WIJFFELS, R. H.; BARBOSA, M. J. An outlook on microalgal biofuels. **Science**, v. 329, n. 5993, p. 796-799, 2010.