

Universidade de Passo Fundo
Faculdade de Engenharia e Arquitetura
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e
Ambiental

Francine de Souza Sossella

EFEITOS DE COAGULAÇÃO NA COLHEITA DE
BIOMASSA DE *S. platensis* SOBRE A HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA

Passo Fundo

2019

Francine de Souza Sossella

EFEITOS DE COAGULAÇÃO NA COLHEITA DE
BIOMASSA DE *S. platensis* SOBRE A HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental, da Faculdade de Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia, sob a orientação da Prof. Dr. Luciane Maria Colla e coorientação do Prof. Dr. Marcelo Hemkemeier.

Passo Fundo

2019

Universidade de Passo Fundo
Faculdade de Engenharia e Arquitetura
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e
Ambiental

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a dissertação de mestrado EFEITOS DE COAGULAÇÃO NA COLHEITA DE BIOMASSA DE *S. platensis* SOBRE A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA, elaborada por Francine de Souza Sossella, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia.

Data de aprovação: 12/04/2019.

Membros componentes da comissão Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Luciane Maria Colla
Universidade de Passo Fundo
Orientadora

Prof. Dr. Marcelo Hemkemeier
Universidade de Passo Fundo
Coorientador

Prof. Dr. Vandrê Barbosa Brião
Universidade de Passo Fundo

Prof.^a Dr.^a Helen Treichel
Universidade Federal da Fronteira Sul

Passo Fundo, 2019

DEDICATÓRIA

Ao meu avô, Francisco

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde e por tudo que me foi concedido, principalmente a persistência;

Aos meus pais, pelo estudo que me foi dado e incentivo;

Aos meus irmãos, pela companhia e compreensão;

À minha família, por representarem um abrigo;

Ao Rafael, por me mandar ter calma, dizer que tudo ia dar certo e lembrar que eu era capaz de fazer;

Aos meus amigos e colegas, por permanecerem comigo em mais uma etapa;

Aos meus colegas de laboratório, por compartilharem as delícias e as dores de fazer pesquisa: os cuidados com os inóculos, auxílio nas análises, realização de curvas, o café feito, o chá termogênico, a limpeza da estufa, as faxinas, os empenhos para abrir, as frases de incentivo, “hoje deu errado também, vou ter que refazer”, as vidrarias aniversariantes do dia, “anota aqui pra mim”...

Às minhas ajudantes que tem muita parte nesse trabalho, Cora, Gabrielle e Regina;

À minha orientadora, meu coorientador e às bancas que tive por todo o auxílio e exemplo que representam;

Aos demais professores, funcionários e colegas do PPGEng;

Às empresas de coagulantes que me cederam os coagulantes comerciais que foram utilizados;

A todos que tiveram participação de alguma forma, sintam meu agradecimento.

Ainda, ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, que me possibilitou tranquilidade para me dedicar exclusivamente.

“Não há nada que dominemos inteiramente a não ser os nossos pensamentos”

(René Descartes)

“Viver é um rasgar-se e remendar-se”

(Guimarães Rosa)

RESUMO

As microalgas são apontadas como uma alternativa aos combustíveis fósseis, pois podem ser aplicadas na produção de biocombustíveis. As vantagens ambientais e técnicas já foram comprovadas, mostrando que a produtividade de cultivos de microalgas, quando comparadas com as culturas tradicionais (milho e soja, por exemplo), é superior. Entretanto, um dos problemas na produção é o elevado custo e a colheita da biomassa figura como uma das etapas mais onerosas. Desta forma, buscar métodos mais adequados e viáveis se torna necessário. Um dos processos indicados para separação é o uso de coagulantes. No caso da produção de etanol, que envolve processos enzimáticos e fermentativos, muitos fatores podem afetar a eficiência de conversão em produto. Com isso, o objetivo do trabalho foi estudar a separação da *Spirulina platensis* com diferentes coagulantes e as influências destes nos processos de hidrólise enzimática. Foram realizados cultivos de *Spirulina platensis* LEB 52 em tanques abertos, em modo semi-contínuo. A colheita da microalga foi realizada com 11 tipos de coagulantes, sendo estes orgânicos e inorgânicos, e uma comparação com o método de centrifugação. Para a determinação da melhor condição de colheita, foram realizados delineamentos compostos centrais, variando dois fatores (pH e concentração) em dois níveis. Com as condições de colheita ideais para cada coagulante, seguiu a aplicação em maior escala, caracterização da biomassa foi realizada quanto a teor de carboidratos, proteínas, cinzas, umidade e análise em MEV/EDS. A biomassa foi rompida pelo método de congelamento e descongelamento seguida de hidrólise enzimática dos carboidratos e das proteínas. Os coagulantes se mostraram eficientes na separação da biomassa, alcançando eficiências de até 99,5%. Na caracterização química foi identificado alto teor de cinzas, proveniente dos sais do meio de cultivo e coagulante retido. O sulfato de alumínio férrico se destacou na sacarificação, convertendo aproximadamente 37,52% dos carboidratos em açúcar redutor. Na hidrólise proteica, baixas eficiências de hidrólise foram obtidas (1,26 - 4,07 %). O processo de coagulação e floculação tem um campo de aplicação promissor, devida à facilidade de aplicação em cultivos de grande escala e as altas eficiências de remoção. No entanto, para utilização em processos biotecnológicos sugerem-se estudos para separação dos coagulantes da biomassa previamente.

Palavras-chave: Microalgas. Coagulação. Hidrólise enzimática.

ABSTRACT

Microalgae are an alternative to fossil fuels, as they can be applied in the production of biofuels. The environmental and technical advantages are proven, showing that the productivity of microalgae, when compared to traditional crops (corn and soybean, for example), is higher. However, one of the problems in production is the high cost and the harvesting of biomass is one of the most costly stages. In this way, finding more suitable and viable methods becomes necessary. One of the indicated processes for separation is the use of coagulants. In the case of ethanol production, which involves enzymatic and fermentative processes, many factors can affect the conversion efficiency into product. Therefore, the objective of this work was to study the separation of *Spirulina platensis* with different coagulants and their influence on enzymatic hydrolysis processes. Cultures of *Spirulina platensis* LEB 52 were performed in raceways, in semi-continuous mode. The microalgae harvest was carried out with 11 types of coagulants, these being organic and inorganic, and a comparison with the centrifugation method. For the determination of the best harvesting condition, central compound designs were performed, varying two factors (pH and concentration) at two levels. With the ideal harvest conditions for each coagulant, it followed the application on a larger scale, characterization of the biomass was carried out regarding the carbohydrate, protein, ash, moisture content and SEM/EDS analysis. The biomass was broken by the freezing and thawing method followed by enzymatic hydrolysis of carbohydrates and proteins. The coagulants were efficient in separating the biomass, reaching efficiencies up to 99.5%. In the chemical characterization, high ash content was identified from the culture medium salts and retained coagulant. Ferric aluminum sulphate stood out in saccharification, converting approximately 37.52% of the carbohydrates into reducing sugar. In protein hydrolysis, low hydrolysis efficiencies were obtained (1.26 - 4.07%). The coagulation and flocculation process has a promising application area, for ease of large-scale application and high removal efficiencies. However, for use in biotechnological processes studies are suggested to separate biomass coagulants previously.

Keywords: Microalgae. Coagulation. Enzymatic hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processos e produtos provenientes de biomassa.....	16
Figura 2 - Crescimento microalgal (linha sólida) e concentração de nutrientes (tracejada)	20
Figura 3 - Exemplos de cultivo aberto e cultivo fechado	21
Figura 4 - Formas de colheita de biomassa	24
Figura 5 - Reação de sulfato de alumínio em condições alcalinas.	27
Figura 6 - Teste de viabilidade de células.	28
Figura 7 - Fluxograma do trabalho	33
Figura 8 - Tanque <i>raceway</i> para cultivo de microalgas.....	34
Figura 9 – Efeitos de pH e concentração na colheita de <i>Spirulina</i> utilizando tanino, blend 1, PAC 1, cloreto férrico e blend 2	46
Figura 10 - Média das concentrações celulares dos cultivos (•) e milivoltagens (×) dos cultivos	48
Figura 11 – Microscopia eletrônica de varredura das biomassas separadas com os coagulantes em aumento de 60 vezes	51
Figura 12 - Amostra coagulada com sulfato de alumínio férrico em aumento de 300 vezes...	54
Figura 13 - Biomassa separada com cloreto férrico, sulfato de alumínio isento de ferro e centrifugada, respectivamente	56
Figura 14 - Açúcar redutor formado (g/L) ao longo do tempo para cada método de separação	57
Figura 15 - Estrutura química da substância ativa do tanino.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição celular de diferentes espécies de microalga	22
Tabela 2 - Composição do meio de cultivo Zarrouk 20%.....	34
Tabela 3 – Delineamento Composto Central para os coagulantes com valores codificados e reais.....	36
Tabela 4 - Eficiências médias da colheita de <i>Spirulina</i> utilizando coagulantes.....	43
Tabela 5 – Efeitos calculados e níveis de significância (p) das variáveis pH e concentração de coagulante sobre a eficiência de coagulação, para cada coagulante testado.	44
Tabela 6 - Condições de concentração celular, pH e milivoltagem dos cultivos	49
Tabela 7 - Eficiências médias para cada coagulante no acúmulo de biomassa em aproximadamente 45 dias de ensaio	50
Tabela 8 - Composição química das biomassas secas separadas por diferentes métodos.....	54
Tabela 9 - Eficiência de conversão dos carboidratos em açúcar redutor para cada coagulante (média±desvio padrão)	59
Tabela 10 - Grau de hidrólise proteica (%) das suspensões de <i>Spirulina platensis</i> em 4 horas de reação	61

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1	BIOCOMBUSTÍVEIS.....	15
2.1.1	Processo de obtenção de bioetanol.....	16
2.1.2	Hidrólise Proteica.....	18
2.2	CULTIVO E COLHEITA DE MICROALGAS.....	19
2.2.1	Cultivos de microalgas.....	19
2.3	Aplicações da biomassa de microalga.....	21
2.4	Formas de colheita de microalgas.....	23
2.4.1	Colheita por processos físico-químicos.....	26
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1	Condições de cultivo.....	33
3.2	Estudos de coagulação para colheita da <i>S. platensis</i>	35
3.3	Caracterização da biomassa.....	38
3.4	Ruptura celular e sacarificação.....	38
3.5	Hidrólise proteica.....	40
3.6	Análise dos dados.....	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	42
4.1	Estudo das condições de colheita utilizando coagulantes.....	42
4.2	Coagulação em maior escala.....	49
4.3	Caracterização das biomassas.....	51
4.4	Efeitos dos coagulantes na hidrólise enzimática de carboidratos.....	57
4.5	Efeitos dos coagulantes na hidrólise enzimática de proteínas.....	61
5	CONCLUSÕES.....	63
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	64
	REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

A crise do petróleo na década de 1970 e as crescentes preocupações com os impactos do aquecimento global aumentaram a busca por fontes de energia renováveis, porém os combustíveis fósseis ainda dominam a geração de energia, gerando uma dependência global (JUAREZ et al., 2014). Dados do *Renewable Energy Policy Network for the 21st Century* (REN21) mostram que em 2016, a participação de combustíveis fósseis no consumo de energia mundial era ainda de 79,5%, enquanto as fontes renováveis eram responsáveis por apenas 18,2%.

Os combustíveis renováveis são uma alternativa do ponto de vista econômico, ambiental e social, sendo que os principais biocombustíveis produzidos em grande escala são o biodiesel e o etanol, usados isolados ou em misturas com os combustíveis fósseis (ESCOBAR et al., 2009; BARROS, 2007).

Atualmente, o etanol é o principal biocombustível líquido produzido no mundo, destacando a construção de biorrefinarias especialmente nos Estados Unidos e Brasil. A produção global de etanol em 2014 foi de 108 bilhões de litros, sendo que em 2009 a produção foi equivalente a 74 bilhões de litros, o que demonstra a expansão do setor (RFA, 2016).

Na produção do etanol de primeira geração (produzido através de milho e cana-de-açúcar, por exemplo) apesar da viabilidade técnica e econômica, há a competição por terras agricultáveis com a produção de alimentos e geração de subprodutos. Com isso, buscando uma valorização dos produtos, fomentou-se o interesse por biocombustíveis de segunda geração (produzido a partir de resíduos de culturas alimentares) que requerem métodos diferenciados para converter a biomassa em combustível e com isso, equipamentos mais sofisticados e maior investimento, que são uma barreira à produção (NIGAM; SINGH, 2011).

As pesquisas têm se concentrado, então, na terceira geração que é produzido através da biomassa de microalgas. As microalgas podem ter diversas outras aplicações: ração animal, aquicultura, cosméticos e fármacos. No Brasil, a pesquisa e produção começaram em 1970 e a produção comercial atual é voltada principalmente para aquicultura (DAMASO et al., 2014).

Um estudo sobre os impactos do ciclo de vida, com ênfase nas emissões de CO₂ e uso do solo, de Gnansounou e Raman (2016), mostrou que a produção de combustíveis a partir de microalgas gera menos impactos quando comparados com as fontes convencionais. No entanto, como as outras tecnologias, existem desvantagens.

O fator mais importante que impede a viabilidade da produção em grande escala é o custo. Estima-se que a colheita e a secagem da cultura de microalgas contribuam de 20% a 30% no custo líquido da produção da biomassa (MATA; MATINS; CAETANO, 2010).

A colheita de microalgas é dificultada pelos seguintes motivos: são organismos microscópicos com diâmetro entre 3 μm e 30 μm ; nos cultivos suas concentrações são baixas (menores que 5 g/L); apresentam cargas de superfície negativas, que causam repulsão entre as células, e com isso baixa taxa de sedimentação (GRIMA et al., 2003). A técnica mais utilizada para a separação das células do meio de cultivo é a centrifugação (RAWAT et al., 2013), no entanto, outras técnicas podem ser utilizadas, até mesmo em conjunto, para diminuição dos custos do processo.

Dentre diversas técnicas de separação, o uso de coagulantes se tornou objeto de estudo pela facilidade na aplicação em grande escala (TRAN et al., 2013; KIM et al., 2017; CANCELA et al., 2017; MOHAMED et al., 2017). No entanto, alguns estudos já apontam que os tradicionais produtos comerciais utilizados nos processos físico-químicos de tratamento de água e efluentes podem apresentar desvantagens de acordo com a finalidade da biomassa.

Os coagulantes inorgânicos, que são de uso comum, apresentaram em alguns estudos lise celular e descoloração da biomassa (PAPAZI; MAKRIDIS; DIVANACH, 2010). Com isso, os coagulantes orgânicos seriam mais adequados para a separação. No entanto, há de se observar qual o comportamento da biomassa segregada por processos de coagulação quando submetidas a uma finalidade específica.

Nos processos biotecnológicos é comum a utilização de enzimas para a obtenção do produto. A produção de bioetanol, por exemplo, compreende processos de sacarificação e fermentação, utilizando enzimas e leveduras, o que pode se tornar sensível à presença de algumas substâncias, estas que podem estar na composição dos coagulantes utilizados. Além disso, outras aplicações da biomassa microalgal, em função da composição química desta, podem incluir etapas de hidrólise enzimática, como por exemplo a hidrólise enzimática de proteínas para a síntese de biopeptídios. Essas aplicações são comuns quando se busca a aplicação total da biomassa num conceito de biorrefinarias de microalgas. Desta forma, verificar o efeito da biomassa separada utilizando processos de coagulação e floculação é importante para essas aplicações.

Este trabalho está vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental na linha de pesquisa de “Infraestrutura Sustentável”, mais especificamente ao Saneamento Ambiental. Nos últimos anos vários projetos foram realizados visando a

produção de biocombustíveis a partir de microalgas, principalmente estudando diferentes meios de cultivo (por exemplo, com adição de resíduos industriais), mas nenhum estudo focou na colheita da biomassa. Assim, espera-se contribuir com os estudos já realizados e agregar conhecimento para projetos futuros.

O objetivo geral do trabalho foi estudar a separação da *Spirulina platensis* com diferentes coagulantes e as influências destes nos processos de hidrólise enzimática.

Os objetivos específicos foram:

- a) Estudar se coagulantes orgânicos, inorgânicos e naturais são eficientes na colheita da *Spirulina platensis*;
- b) Avaliar se o tipo de coagulante influencia a composição físico-química da biomassa colhida;
- c) Avaliar se os coagulantes apresentam efeito na hidrólise enzimática.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOCOMBUSTÍVEIS

Segundo a Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, biocombustível é o combustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna ou, conforme regulamento, para outro tipo de geração de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil (BRASIL, 2005).

A Portaria MAPA nº 75, de 05 de março de 2015, estabelece a adição de 27% de etanol à gasolina comum e 25% na gasolina premium (BRASIL, 2015).

Ainda, a Lei nº 13.263, de 23 de março de 2016 estabelece adição obrigatória de 10% de biodiesel ao óleo diesel em todo território nacional (BRASIL, 2016).

A matéria-prima para obtenção dos biocombustíveis chamados de primeira geração provem de culturas alimentares. O processo utilizado é a fermentação das culturas (cana-de-açúcar e milho) se o objetivo é a produção de bioetanol. Para as culturas oleaginosas (girassol) é aplicado o processo de transesterificação para obtenção de biodiesel (REBELO, 2014).

Os biocombustíveis de segunda geração, por exemplo, biomassa lignocelulósica, resíduos de culturas alimentares, entre outras fontes, que requerem métodos diferenciados para converter a biomassa em combustível e com isso, equipamentos mais sofisticados e maior investimento, que são uma barreira à produção (NIGAM; SINGH, 2011).

A contínua busca por fontes mais sustentáveis para produção de biocombustíveis tem se concentrado nas microalgas, que compõe a terceira geração de produção (RAMALHO, 2013). As microalgas fornecem carboidratos que são fonte de carbono para a fermentação, porém, alguns detalhes ainda impedem que a produção de etanol a partir de biomassa microalgal seja viável economicamente, como a dificuldade e investimento para os cultivos.

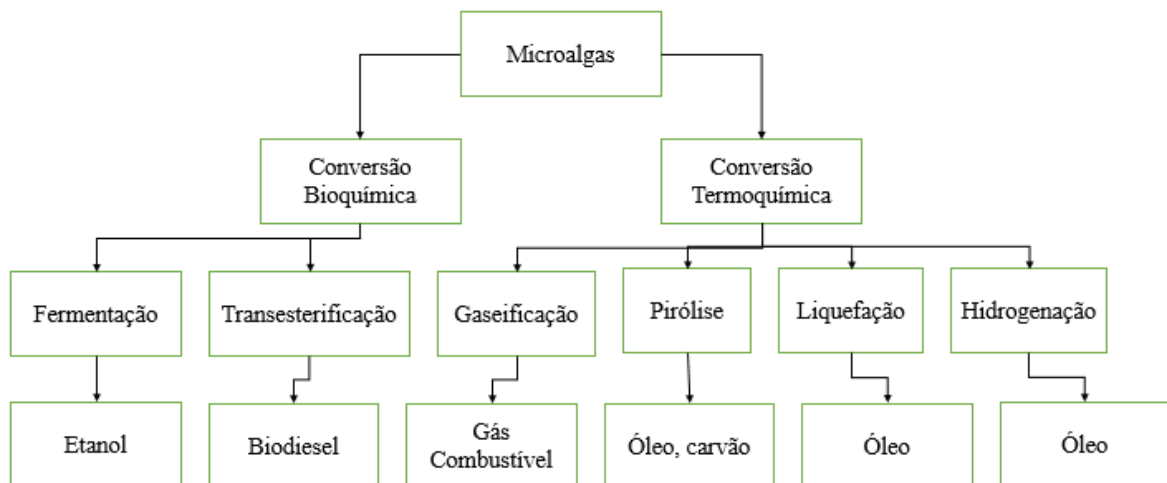
O processo de obtenção do bioetanol em si é o mesmo que as outras culturas (por exemplo, o milho), porém, anteriormente, é necessária a remoção dos lipídios, rompendo a célula via extração por solvente ou mecânica, fazendo com que os carboidratos tanto presentes na membrana celular quanto no meio intracelular estejam disponíveis para a fermentação (CARDOSO et al., 2011).

Segundo Miranda (2011), as vantagens para que as microalgas tornem-se matéria-prima preferencial para a produção de biocombustíveis é a maior eficiência fotossintética, cerca de 3-8% nas microalgas *versus* 0,5% nas plantas, manuseio mais fácil, bem como

capacidade de remoção de dióxido de carbono, sendo que o cultivo pode ser realizado em áreas impróprias para desenvolvimento de culturas alimentares.

A Figura 1 esquematiza os processos que podem ser aplicados para obtenção de produtos provenientes de biomassa de microalgas.

Figura 1 - Processos e produtos provenientes de biomassa



Fonte: adaptado de BORGES (2014).

Como demonstrado na Figura 1, existem vários produtos da biomassa de microalgas, dependendo da conversão que for realizada. Cada aplicação requer características fisiológicas específicas, como por exemplo, um maior teor de carboidratos ou lipídios, para que se tenha maior rendimento possível (BORGES, 2014). Uma das possibilidades bastante exploradas é a obtenção de etanol, via conversão bioquímica, que demanda de alto teor de carboidratos acumulado pela microalga.

2.1.1 Processo de obtenção de bioetanol

O Brasil, Estados Unidos e Canadá são os países que se destacam com maiores produções de bioetanol. O bioetanol é produzido pelo processo bioquímico da fermentação, que pode ser realizado com diferentes matérias-primas desde que possuam determinado teor de açúcares simples (DEMIRBAS, 2010).

Existem diversas metodologias para produção de bioetanol, variando de acordo com a matéria-prima utilizada. No Brasil, que utiliza a cana-de-açúcar como matéria-prima primeiramente, é realizada a hidrólise enzimática da sacarose, seguida pela transformação dos açúcares simples em glicose e frutose. Então é realizada a fermentação, sendo a

Saccharomyces cerevisiae o fermentador comumente utilizado. Na etapa de fermentação, as enzimas presentes convertem a glicose e frutose em etanol, liberando gás carbônico (SOUZA et al., 2012).

Algumas microalgas se destacam em estudos para produção de bioetanol, como a *Chlorella*, *Dunaliella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus* e *Spirulina*, pois apresentam altas concentrações de amido e glicogênio em sua composição (JOHN et al., 2011).

Para biomassa de microalgas, o processo comum de produção de bioetanol envolve um pré-tratamento para romper a parede celular da biomassa, a hidrólise dos polissacarídeos, com intuito de formar os açúcares simples e fermentação alcoólica (HARUN et al., 2010).

O pré-tratamento ou rompimento celular é essencial para disponibilizar os açúcares para o processo de fermentação. Os pré-tratamentos podem ser divididos em físicos, biológicos e químicos. O pré-tratamento físico compreende processos mecânicos para romper a parede celular; o tratamento biológico utiliza microrganismos e enzimas com objetivo de degradar a biomassa, causando a liberação dos açúcares e o tratamento químico insere reagentes químicos, geralmente ácido sulfúrico e hidróxido de sódio, aumentando a biodegradabilidade da celulose (HARUN; DANQUAH, 2011; ZHENG; PAN; ZHANG, 2009).

Alguns estudos, como de Miranda, Passarinho e Gouveia (2012) estudaram diferentes tipos de pré-tratamentos para biomassa de microalga *Scenedesmus obliquus*. Os resultados obtidos foram mais satisfatórios para o método químico com ácido sulfúrico, comparando com ultrassom, autoclave, ácido clorídrico e hidróxido de sódio.

A etapa de sacarificação comumente utiliza hidrólise enzimática em conjunto de hidrólise ácida. As enzimas reduzem os compostos em açúcares simples e a hidrólise ácida torna o processo economicamente viável (HARUN et al., 2010). Pourzolfaghar et al. (2016) citam que são vantagens da hidrólise enzimática ocorrer sob condições de pH e temperatura mais suaves, reduzir custos de energia, consumir menos solventes e fornecer produtos de reação mais limpos, com perigo reduzido de reações secundárias.

Enzimas são proteínas que catalisam uma reação química, reduzindo a energia de ativação necessária para que os produtos sejam gerados. No funcionamento, o substrato se liga ao sítio ativo da enzima, induzindo uma alteração no estado conformacional da enzima, ocasionando um encaixe. Posteriormente, os produtos são formados, se desligam da enzima e são liberados. Alguns fatores de controle são importantes quando se fala em reações enzimáticas: temperatura e pH dependem do intervalo no qual as enzimas apresentam maior

atividade; relação enzima-substrato influencia diretamente a velocidade de reação, sendo que uma alta relação torna o processo inviável (MOTTA, 2011).

A α -amilase, por exemplo, é uma enzima extracelular que hidrolisa várias ligações α -1,4 não terminais de moléculas de amilopectina, amilose, glicogênio e dextrina. A faixa de pH ótima de atuação varia entre 4,6 e 9,2, conforme a espécie bacteriana ou fúngica, método de ensaio e temperatura de incubação. A temperatura ótima das amilases está na faixa de 15 °C a 30 °C (REGULY, 1996).

A fermentação a partir de microalgas é considerada vantajosa pois envolve menor consumo de energia, se comparado ao biodiesel e o CO₂, subproduto da fermentação, pode ser reciclado como fonte de carbono nos cultivos (SINGH; GU, 2010). A seleção de microrganismos para a fermentação deve levar em consideração a alto desempenho para fermentar carboidratos, elevada velocidade de fermentação, osmotolerância, tolerância ao etanol formado e compostos ácidos, resistência a altas temperaturas e estabilidade genética (ALENCAR et al., 2009).

2.1.2 Hidrólise Proteica

As proteínas formadas fundamentalmente por carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio. São compostas por unidades fundamentais chamadas aminoácidos que estão ligados entre si por ligações peptídicas (DAMODARAN et al., 2010).

Os biopeptídeos são definidos como fragmentos de proteínas que apresentam benefícios à saúde do ser humano, contendo de 3 a 20 resíduos de aminoácidos, normalmente são inativos dentro da molécula de proteína. Para que ocorra a liberação dos fragmentos bioativos, as proteínas precisam ser hidrolisadas (KORHONEN, 2009).

Os fragmentos bioativos podem ser liberados por: hidrólise enzimática através de ação de protease gastrointestinal, hidrólise enzimática microbiana durante a fermentação ou processamento proteolítico utilizando enzimas exógenas (SAMARAKOON; JEON, 2012).

A hidrólise proteica baseia-se no rompimento das ligações peptídicas, originando peptídeos de diferentes tamanhos e aminoácidos livres. Os hidrolisados proteicos podem ser obtidos basicamente por três métodos: hidrólise alcalina, hidrólise ácida e hidrólise enzimática (CAMPBELL; FARRELL, 2007; NELSON; COX, 2011).

A hidrólise enzimática destaca-se por apresentar maiores benefícios e vantagens em relação à modificação química, já que as enzimas possuem maior especificidade com o substrato, diminuindo a probabilidade de ocorrerem reações indesejáveis, que resultem na formação de produtos tóxicos (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

2.2 CULTIVO E COLHEITA DE MICROALGAS

2.2.1 Cultivos de microalgas

O termo microalga diz respeito aos microrganismos que contêm clorofila e outros pigmentos fotossintéticos, capazes de realizar fotossíntese. A estrutura celular pode ser eucariótica ou procariótica, sendo que o segundo caso pode denominar-se cianobactéria (GÓMEZ, 2007).

Segundo Lourenço (2006), o cultivo de microalgas é praticado há aproximadamente 140 anos. O cultivo depende de fatores específicos, pois as microalgas apresentam elevada sensibilidade: instalações especiais, equipamentos, água de boa qualidade e meio de cultivo adequado, proporcionando os nutrientes essenciais para o crescimento do microrganismo.

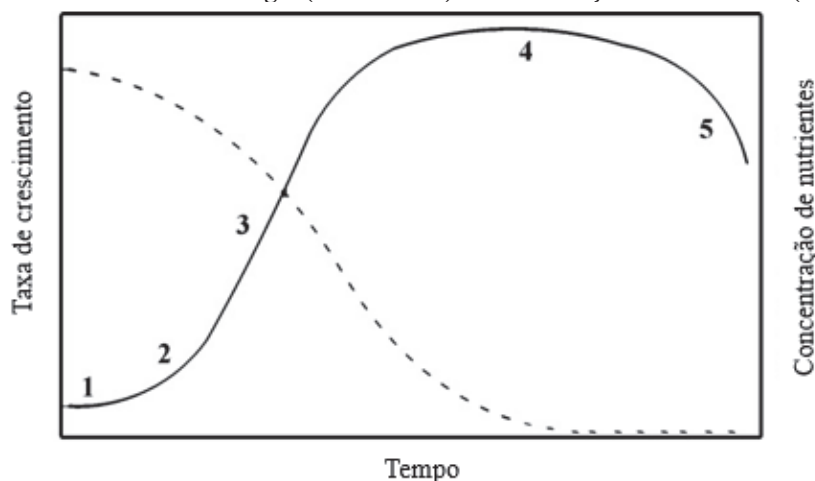
Um parâmetro importante é a agitação, prevenindo a sedimentação das células e assegurando exposição uniforme do cultivo à luz e nutrientes. O pH também deve ser controlado, sendo que o pH ótimo para a maioria das espécies está entre 7 e 9. Caso não seja mantido o pH ótimo pode ocorrer colapsos na cultura por rompimento de processos celulares (WANG et al., 2012).

Os cultivos podem ser, segundo Mata et al. (2010):

- a) Fotoautotróficos: a luz é utilizada como fonte de energia e CO₂ como fonte de carbono;
- b) Heterotróficos: ausência de luz e utilização de compostos orgânicos como fonte de carbono e energia;
- c) Mixotrófico: a combinação de a) e b).

Como todos os microrganismos, as microalgas seguem uma curva de crescimento definida, como é apresentada na Figura 2.

Figura 2 - Crescimento microalgal (linha sólida) e concentração de nutrientes (tracejada)



Fonte: MATA et al. (2010).

A fase identificada como 1 compreende a fase de lag, uma fase de adaptação das células ao meio de cultivo; na fase 2, fase de aceleração, observa-se uma faixa de crescimento na concentração; a fase 3 é caracterizada por um crescimento exponencial; a fase 4 é estacionária, ou seja, o crescimento máximo foi alcançado, já que os nutrientes foram consumidos; finalmente a fase 5 é de declínio, onde há um decréscimo no número de células. (MATA et al., 2010).

No cultivo, em geral, há necessidade de fonte de energia luminosa e fontes de carbono, podendo ser na forma de carbonos comuns (CO_2 e HCO_3) e utilização de outros macronutrientes (nitrogênio, fósforo e potássio) e micronutrientes (ferro, molibdênio, dentre outros). A temperatura deve estar na faixa de tolerância da microalga cultivada (FRANCO; LÔBO; CRUZ, 2013).

O cultivo de microalgas pode ser feito em sistemas de cultura abertos (lagos) e em sistemas fechados e controlados (fotobiorreatores). Os *raceway ponds* (Figura 3) e também lagos naturais são utilizados para a produção comercial de microalgas pela vantagem econômica, porém, trazem desvantagens quanto ao pouco controle que se tem das condições de cultivo e baixa produtividade quando comparado a sistemas controlados. Então, os fotobiorreatores chegam a altas produtividades, devido ao controle que se tem (MATA et al, 2010).

Figura 3 - Exemplos de cultivo aberto e cultivo fechado



Um resumo dos parâmetros e controles necessários entre os tipos de cultivo é apresentado no Quadro 1.

Quadro 1 - Comparação entre tipos de cultivo de microalgas em tanques abertos e fechados

Parâmetro	Tanque aberto	Fotobiorreator fechado
Iluminação	Razoável	Excelente
Controle da temperatura	Nenhum	Excelente
Agitação	Baixo	Médio
Controle de contaminação	Baixo	Elevado
Custos	Baixo	Elevado
Produção volumétrica	Elevada	Baixa

Fonte: adaptado de SANTOS (2013).

O Quadro 1 mostra que se os cultivos necessitam de controles rígidos em iluminação, temperatura, agitação e evitar a contaminação, o mais indicado é utilizar o reator fechado. Se os controles de iluminação, temperatura, agitação e contaminação não são tão importantes, o tanque aberto pode ser mais vantajoso pelo custo baixo e alta produção.

2.3 Aplicações da biomassa de microalga

Os estudos utilizando biomassa de microalgas aumentaram devido à diversidade de espécies e substâncias que podem ser sintetizadas. Algumas espécies cultivadas em grande escala, a partir do desenvolvimento das tecnologias de cultivo, colheita e processamento

permitem a utilização comercial, para fins de nutrição humana e animal (AHMAD; YASIN; DEREK; LIM, 2011b).

Segundo Gómez (2007) o cultivo de microalgas interessa na utilização como fonte de alimento de crustáceos, tratamento de águas residuais, biofertilizantes, nutrição humana e fármacos, produção de enzimas, vitaminas, pigmentos e combustíveis.

Na produção de combustíveis, as microalgas vêm destacando sua aplicabilidade já que podem ser cultivadas em terrenos impróprios para agricultura convencional, não competindo com culturas alimentares; podem ser cultivadas em águas salobras e residuais, nessa última, contribuindo para o tratamento, principalmente consumindo nitrogênio e fósforo; alto rendimento em pequenas áreas, comparando com culturas de soja e milho e remoção de CO₂ da atmosfera (AHMAD; YASIN; DEREK; LIM, 2011b).

Os teores de proteínas, carboidratos e lipídios da composição celular de algumas espécies estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição celular de diferentes espécies de microalga

Espécies	Proteínas (%)	Carboidratos (%)	Lipídios (%)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20
<i>Tetraselmis maculata</i>	52	15	3
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11

FONTE: Adaptado de LOURES (2016).

Para as microalgas, os carboidratos atuam como componentes estruturais nas paredes celulares e como componentes de armazenamento dentro da célula, fornecendo energia necessária para o metabolismo. O teor dos compostos de armazenamento (proteínas, lipídios e carboidratos) pode variar de acordo com as condições ambientais do crescimento (MARKOU et al., 2012).

Buscando maximizar a produção de bioetanol, a espécie de microalga deve, então, ter alto teor de carboidratos e alta produção de biomassa. Para tanto, existem maneiras de manipular as condições de cultivo para induzir as células a acumularem mais carboidratos. Os fatores mais citados são a limitação de nutrientes, limitação de luz e temperatura. A reação

das microalgas quando em meio de cultivo com restrição de nitrogênio depende da espécie em estudo: em alguns casos, resulta em acúmulo maior de lipídios e em outros casos, acúmulo de carboidratos. Da mesma maneira, a limitação de fósforo resulta em acumulação de carboidratos e lipídios, diminuindo a síntese de proteínas (MARKOU et al., 2012).

A luz é citada como influência no acúmulo de carboidratos no trabalho de Magro (2016), que alterou a velocidade de agitação dos cultivos de *Spirulina platensis* em tanques abertos, obtendo nas maiores velocidades testadas, maior teor de carboidratos, devido ao fato de que maior agitação promove uma distribuição mais uniforme de luz às células.

Vendruscolo (2016) testou diferentes microalgas em meios de cultivo com adição de efluente de maltaria e em restrição de fósforo e nitrogênio, conseguindo acumular 30% e 49% de carboidratos em *Spirulina platensis* e *Synechococcus nidulans*, respectivamente.

Salla et al. (2016) apontaram a microalga *Spirulina platensis* como promissora matéria-prima para produção de bioetanol por conta da alta produtividade de carboidratos. Realizando cultivos com diluição do meio padrão Zarrouk a 20% e adição de resíduos de soro de leite, resultando num meio de cultivo com limitação de fósforo, potássio e ferro, principalmente, obtiveram biomassa com teor de carboidratos de aproximadamente 38% e produtividade de carboidratos de 60 mg.L⁻¹.d⁻¹.

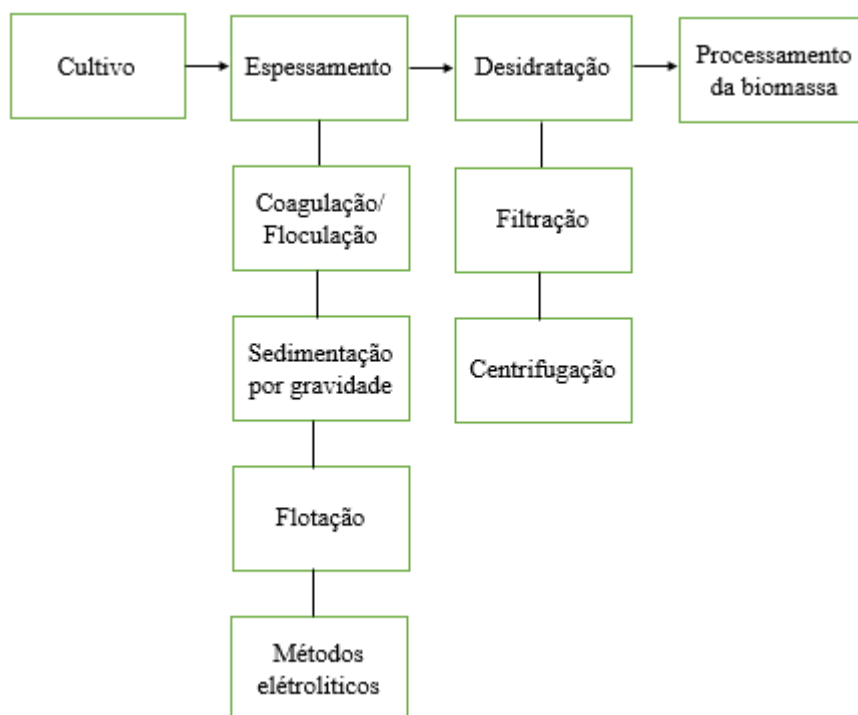
2.4 Formas de colheita de microalgas

A colheita é a separação da biomassa do seu meio de cultura e um obstáculo no processamento da microalga contribuindo com cerca de 30 % do custo de produção. É dificultada pelo pequeno tamanho das células e baixa concentração no meio (JESUS, 2014). O método adequado para colheita varia de acordo com dimensão da cultura, espécie, densidade celular, produto final e valor comercial (ABDELAZIZ et al., 2014).

Por exemplo, a cianobactéria *Spirulina* tem uma forma longa em espiral (20 – 100 µm de comprimento) que faz com que a colheita seja facilitada. Microalgas relativamente grandes (>70 µm), como a *Coelastrum* e a *Spirulina* podem ser recuperadas com processos mais simples, como filtração convencional. Já as microalgas que se aproximam de dimensões bacterianas (< 30 µm), como a *Scenedesmus*, *Dunaliella* e *Chlorella*, requerem métodos mais específicos (BRENNAN; OWENDE, 2010).

Dois processos fundamentais são compreendidos: espessamento e desidratação. Na Figura 4 estão esquematizados os processos e métodos químicos e físicos para a colheita (BARROS, 2015).

Figura 4 - Formas de colheita de biomassa



Fonte: adaptado de BARROS (2015).

Segundo Gouveia (2015) a centrifugação seria o método mais rápido para recuperação da biomassa. É adequado a todo o tipo de microalgas, porém aumenta consideravelmente os custos de produção.

Para a colheita recorrendo ao método de sedimentação gravitacional, Show e Lee (2014) alcançaram recuperação de, no máximo, 3% dos sólidos suspensos totais. O método é simples e baixo custo, mas a concentração de biomassa recuperada é reduzida, sendo necessária a utilização prévia de agentes flocculantes já que as células possuem uma superfície carregada negativamente, o que as impede de se auto agregarem.

A filtração por membranas, microfiltração e ultrafiltração estão entre as formas mais utilizadas pela grande produtividade. No entanto, apresentam consumo energético considerável e podem danificar as células de microalgas, levando a perda de produtos de interesse (BILAD et al., 2012). Além disso, o processo de filtração por membranas pode ser lento, por conta de incrustação das membranas, provocando redução do fluxo de permeação (LEITÃO, 2015). Na filtração convencional, a recuperação é eficiente apenas para células com diâmetros elevados (UDUMAN et al., 2010).

A flotação por ar dissolvido foi testada para a *C. zofingiensis* por Zhang et al. (2014), com adição de quitosana, sais de alumínio e ferro para auxiliar o processo, alcançando

eficiências de até 91%. Já a flotação por ar disperso, Wiley et al. (2009) alcançaram em cultivos mistos, com polímeros como auxiliares da flotação, 77% de eficiência. Dentre os inúmeros métodos de flotação, a microflotação apresenta para microalgas as maiores eficiências, entre 95% e 99%, comprovadas pelo estudo de Hanotu et al. (2012) na colheita de *Dunaliella salina*.

Estudos de eletrofloculação para a colheita de biomassa e posterior separação dos flocos por sedimentação gravimétrica e flotação tiveram como resultados 91% de eficiência para a sedimentação gravimétrica e 87% para a flotação. O uso de corrente elétrica é eficaz, não necessita de adição de produtos, entretanto os custos (principalmente com eletrodos) se tornam grandes desvantagens para aplicação em grande escala (LEE et al., 2013).

A floculação agrega as células com a adição de um floculante que perturba a estabilidade das partículas. A técnica é simples, rápida, com custos reduzidos e eficiência superior a 90%. No entanto, sua aplicação é limitada pois pode provocar contaminação da biomassa, principalmente quando são utilizados floculantes químicos (AlCl_3 e FeCl_3) por conterem íons metálicos. Os polímeros orgânicos são mais indicados por serem biodegradáveis e não tóxicos (LEITÃO, 2015).

O Quadro 2 traz uma comparação entre os métodos de separação de biomassa, a taxa de recuperação de cada método, vantagens e desvantagens.

Quadro 2 - Comparação entre métodos de separação de biomassa

Método	Recuperação	Vantagens	Desvantagens
Centrifugação	> 90%	Aplicável para quase todas as espécies; Alta eficiência; Não requer adição de produtos químicos.	Método caro; Energia requerida; Dano celular (forças de cisalhamento).
Filtração tangencial	70 – 90%	Alta eficiência; Permite a separação de espécies sensíveis ao cisalhamento.	Entupimento; Limpeza das membranas; Custo alto.
Sedimentação gravimétrica	10 – 90%	Simples; Barato	Processo demorado; Baixa eficiência; Possibilidade de deterioração da biomassa; Pode utilizar flocculantes.
Flotação	50 – 90%	Viável para grande escala; Alta eficiência; Custo médio.	Pode utilizar flocculantes.
Floculação e Coagulação	25 – 98%	Custo médio; Alta eficiência; Viável para grande escala.	Possibilidade de contaminação da biomassa

FONTE: adaptado de Laamanen et al. (2016).

2.4.1 Colheita por processos físico-químicos

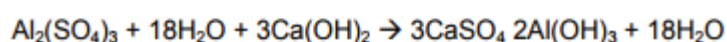
Segundo Borges (2014) a coagulação inclui reações e mecanismos com objetivo de desestabilizar os coloides, formando partículas maiores com adição de contraíons. Pode ser realizada por mecanismos diversos: compressão da dupla camada, neutralização das cargas, aprisionamento do coloide e aglomeração direta.

Coloides são partículas que não sedimentam, numa faixa de tamanho de 0,1 nm a 1 nm. O fato de não sedimentarem está ligado às propriedades elétricas da sua superfície (camada difusa), que criam uma força de repulsão entre as partículas. Os agentes coagulantes atuam anulando as forças de repulsão, promovendo a coagulação em períodos que variam desde décimos de segundos a minutos, dependendo de pH, temperatura, concentração e outros fatores (JESUS, 2014).

Um coagulante pode ser definido como um eletrólito inorgânico, utilizado com objetivo de desestabilizar uma suspensão e adicionado sob agitação. Floculantes são macromoléculas com grupos carregados e são classificados em: catiônicos, aniônicos e não iônicos e utilizados para contribuir para a formação de agregados maiores que podem ser removidos mais facilmente por sedimentação, filtração ou flotação (LETTERMAN; AMIRTHARAJAH; O'MELIA, 1999).

Os produtos químicos mais empregados nos processos de precipitação química são o sulfato de alumínio, cloreto férrico e sulfato ferroso. Esses produtos são soluções agressivas que formam, respectivamente, ácido sulfúrico, ácido clorídrico e hidróxido ferroso insolúvel (NUNES, 2004). O sulfato de alumínio quando adicionado na água em condições alcalinas resulta na seguinte reação, apresentada na Figura 5.

Figura 5 - Reação de sulfato de alumínio em condições alcalinas.



O sulfato de alumínio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) é um produto de custo baixo, portanto, o mais utilizado no tratamento de água de abastecimento. Porém, o caso de efluentes com elevado índice de sólidos requer uma alta dosagem e mesmo assim não apresenta eficiência adequada, o que restringe seu uso. O cloreto férrico (FeCl_3) é mais utilizado no tratamento de efluentes como coagulante, principalmente porque atua em uma faixa de pH mais larga que os demais (entre 5 e 11). O inconveniente do uso do sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), por sua vez, é a necessidade de aeração do meio, já que o objetivo é a formação de hidróxido ferroso, reação que só ocorre com presença de oxigênio dissolvido (NUNES, 2004).

O pH interfere diretamente, segundo Nunes (2004), na corrosão de equipamentos e tubulações; no crescimento de microrganismos nos sistemas biológicos; na velocidade cinética das reações; na toxidez de compostos e no processo de coagulação, floculação e precipitação química.

O potencial zeta, também denominado de potencial eletrocinético, é utilizado para determinar a carga eletrostática superficial das partículas coloidais. Pode ser considerado um bom índice para medir as interações repulsivas entre partículas. Esse parâmetro é dependente do pH do meio, da espessura da dupla camada elétrica, que também depende da concentração de íons e força iônica da suspensão. Se o potencial zeta é alto, as partículas se repelem e o colóide é estável, por outro lado, se o potencial zeta for próximo de zero, o efeito final é a aglomeração das partículas, levando à floculação (PAVANELLI, 2001).

Segundo Kwak et al. (2006), o potencial zeta para as microalgas é altamente influenciado pela adição de coagulantes, assim é importante que seja controlado para eficiência de remoção das células.

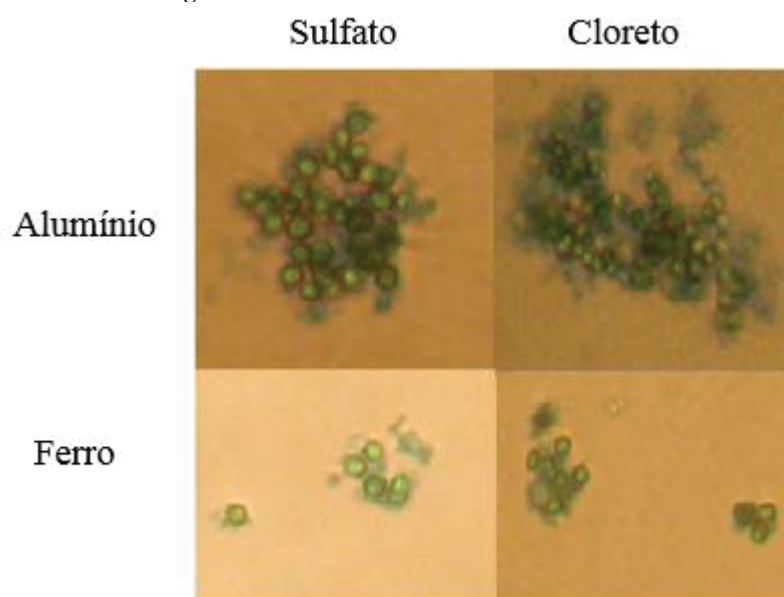
A floculação e coagulação são consideradas como métodos superiores para separação de microalgas do meio de cultura, considerando a eficiência, economia operacional e viabilidade técnica e portanto, muitos estudos foram realizados com essa temática (WAN et al., 2015).

No estudo de Borges (2014), a *Nannochloropsis oculata*, microalga marinha, em testes de remoção por coagulação, floculação e flotação por ar dissolvido, apresentou carga superficial negativa, assim os reagentes catiônicos (que possuem grupamentos carregados positivamente) são mais recomendados para promover o aumento do potencial zeta e promover a coagulação ou floculação.

2.4.1.1 Coagulantes inorgânicos

Os coagulantes químicos podem causar danos às células de microalgas. Papazi, Makridis e Divanach (2010) utilizaram doze diferentes sais para colheita de culturas de *Chlorella minutissima*. Além da eficiência na separação, foi testada a viabilidade do uso das células através de teste com solução azul de Evans. O resultado do teste de viabilidade está apresentado na Figura 6.

Figura 6 - Teste de viabilidade de células.



FONTE: Papazi, Makridis e Divanach (2010).

Os sais de cloreto e sulfato de alumínio e de ferro foram mais eficientes na separação, porém os sais de alumínio causaram lise celular (ruptura da membrana plasmática) e sais férricos causaram descoloração da célula. A lise celular foi mais evidente com cloreto de alumínio (cerca de 25% do número total de células) do que sulfato de alumínio (cerca de 10% do número total de células). Então, Papazi, Makridis e Divanach (2010), concluem que a seleção do coagulante apropriado deve ser correlacionada ao objetivo do processo. Se o propósito é produção de pigmentos, os sais de ferro são indesejáveis pela descoloração causada. Se o objetivo é produção de biodiesel, onde é importante eficiência e custo, o cloreto de alumínio é apropriado.

Kim et al. (2017) buscou desenvolver um método de colheita de baixo custo, utilizando sulfato férrico para floculação e ácido sulfúrico para liberação dos precipitados de ferro, oferecendo benefícios de uma biomassa sem metal adsorvido e reuso do coagulante. O método proposto baseia-se no fato de que os coagulantes à base de ferro formam precipitados, quando em meio aquoso, que podem ser solubilizados (liberando íons Fe^{3+} desde que o pH seja suficientemente baixo). Também, o ácido residual funcionou como um catalisador da extração de lipídios para produção de biodiesel.

Considerando a produção de biodiesel, Tran et al. (2013) reportaram que utilização de policloreto de alumínio (PAC) na colheita de biomassa de microalgas pode inibir significativamente a transesterificação enzimática e química. Já quando utilizada a quitosana, a lipase imobilizada funcionou bem, resultando uma alta conversão de biodiesel (97,6%), comparável com a conversão de biodiesel de microalgas colhidas por centrifugação (97,1%).

Farooq et al. (2015) desenvolveram pesquisa testando três métodos de separação da *Chlorella vulgaris*: centrifugação, floculação utilizando FeCl_3 e floculação utilizando sulfato de alumínio. O objetivo era reutilizar o meio de cultivo, mas sem afetar a qualidade da biomassa que seria destinada à produção de biodiesel. Na floculação com FeCl_3 e na centrifugação, pode-se realizar até quatro ciclos de reuso, porém nos testes com alumínio não obtiveram sucesso, pois o crescimento das células foi inibido devido à toxicidade do alumínio residual. Os autores salientaram que mesmo com os bons resultados utilizando FeCl_3 , é necessária uma etapa subsequente de remoção de ferro da biomassa recuperada, podendo ser realizada antes ou depois da produção do biodiesel para que não seja afetada a qualidade do biocombustível.

Cancela et al. (2017) estudaram a coagulação de *D. subspicatus*, que tem potencial para produção de biodiesel, utilizando sulfato de cobre e nitrato de alumínio. O sulfato de cobre se mostrou mais eficiente, com remoção de 90%.

No estudo de Xia et al. (2017) a *Chlorella sp* foi separada por flotação, porém com um pré-tratamento com Al^{3+} como coagulante. Assim, o método foi aprimorado e obteve 98,73% de eficiência de separação, sem ajuste de pH. Concluíram, então, que a flotação em conjunto com coagulação pode ser efetiva na colheita de biomassa.

2.4.1.2 Coagulantes orgânicos

Dentre os coagulantes naturais, pode-se citar o amido, formado de dois polímeros, amilose (20% – 40% em massa) e amilopectina (60% – 80% em massa). Para que possa ser utilizado, no entanto, são necessárias modificações, como eterificação, esterificação e oxidação. Uma das vantagens da utilização é que não são tóxicos e, então, facilmente biodegradados (WANG et al., 2013).

O amido de milho foi estudado como coagulante para clarificação de água da chuva por Murakami e Moruzzi (2012) em pH médio aproximado de 6,0, variando as dosagens de 1 a 12 mg/L, avaliando a remoção de cor e turbidez de efluentes. Obtiveram como resultados de remoção de 70% de cor e 80% da turbidez.

Moruzzi e Nakada (2009) conseguiram eficiências de remoção maiores que 86% de turbidez e superiores a 88% de cor aparente com uma dosagem de amido de milho de 6,0 mg/L para clarificação da água da chuva.

A quitina, segundo biopolímero mais abundante, provém do exoesqueleto de crustáceos, sua estrutura é insolúvel em água, solventes orgânicos e alguns ácidos e bases. A degradação da cadeia polimérica ocorre em ácidos minerais concentrados, produzindo compostos como a quitosana. A utilização da quitosana como coagulante se sustenta no fato de sua elevada densidade de carga catiônica, permitindo a adsorção das regiões negativas de partículas, desestabilizando-as. Não é tóxica nem corrosiva, grandes vantagens da utilização, porém, o custo ainda é muito alto, limitando a utilização em grande escala (AHMAD et al., 2011a; RENAULT, 2009).

Os taninos são quimicamente complexos, na maioria das vezes compostos polifenólicos hidrossolúveis com massa molar variando de 500 a milhares de Daltons. Sua obtenção se dá a partir de metabólitos secundários de vegetais, por exemplo cascas, frutos e folhas (GRAHAM et al., 2008). São classificados quimicamente em taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os taninos hidrolisáveis apresentam na sua constituição monômeros de ácido gálico ou ácido elágico, enquanto que os taninos condensados são polifenóis com peso molecular variado, consistindo de unidades flavonóidicas (flavan-3-ol e flavan-3,4-diol), em vários graus de condensação. Eles não consomem alcalinidade do meio, não alterando o pH e

são efetivos em uma extensa faixa de pH, de 4,5 a 8,0 (VIEIRA; LELIS; RODRIGUES, 2014).

Bongiovani et al. (2010) constatou que o uso de coagulantes orgânicos biodegradáveis são uma boa alternativa técnica aos coagulantes convencionais quando estudou o comportamento de um coagulante tanino para o tratamento de água para abastecimento, variando pH de coagulação e concentração do coagulante. Assim, concluiu que para todas as concentrações, o pH que tornou a técnica mais eficiente foi entre 6,0 e 9,0.

Gerde et al. (2014) compararam o coagulante inorgânico sulfato de alumínio ($Al_2(SO_4)_3$) com o orgânico amido catiônico. A quantidade de células coaguladas por miligrama de coagulante utilizado foi de 4 a 28 vezes maior para amidos em relação ao sulfato de alumínio.

Quanto aos polímeros floculantes, Magnafloc LT-25 (polímero não iônico) foi testado para recuperação de microalgas marinhas, com eficiência de recuperação maior que 80% quando o pH foi ajustado entre 10 e 10,6 (KNUCKEY et al., 2006).

Recuperando *Chlorella sp*, Ahmad et al. (2011a), conseguiram eficiência de 99% com concentrações baixas de quitosana, otimizando concentração, taxa de mistura e tempo de sedimentação. Também utilizando quitosana, para recuperação de *Spirulina*, *Oscillatoria* e *Chlorella*, em pH 7, Divakaran e Pillai (2002) recuperaram 90% de biomassa.

Gouveia (2015) utilizou coagulantes orgânicos Veta Organic[®] e Tanfloc SL[®] para remoção de microalgas em meio de alta ionicidade (meio marinho), sendo necessária uma concentração do coagulante orgânico dez vezes maior que o cloreto férrico (inorgânico). Porém, ainda assim afirma que é mais vantajoso o uso dos coagulantes orgânicos, baseados em taninos, que não contaminam o meio e apresentam eficiência adequada, no estudo, maiores que 90%.

O estudo de Borges (2011) testou a possível interferência de coagulantes aniônicos e catiônicos na extração lipídica e perfis de ácidos graxos na *Nannochloropsis oculata* e *Thalassiosira weissflogii*. Com seus resultados, concluiu que a escolha do floculante deve levar em conta o tipo de biodiesel desejado. Se o objetivo é produzir biodiesel mais estável, com baixo teor de ácidos graxos insaturados, os floculantes aniônicos são uma boa escolha, já que observou interferência do floculante no perfil de ácidos graxos sintetizados pela microalga.

Konig et al. (2014) estudaram o melhor floculante e concentração ideal para colheita da microalga marinha *Conticribra weissflogii* (anteriormente *Thalassiosira weissflogii*) visando a produção de biocombustíveis. Com os resultados, concluíram que o FLOPAM[®] FO

4240 SH de baixa carga foi o mais eficiente, principalmente quando em concentrações maiores que 1 mg/m^3 , e que a densidade celular também é importante para eficiência, com efeitos significativos quando em densidades superiores a $35,4 \times 10^4 \text{ cm}^3$.

Com flocculantes naturais (Ecotan e Tanfloc), Gutiérrez et al. (2015) conseguiram recuperar microalgas cultivadas em lagoas com altas concentrações de células com até 93% de eficiência. Os autores constataram através de testes potenciais de metano bioquímico que não houve impacto negativo do uso dos flocculantes, não observando redução de pH ou mudanças na característica da biomassa que pudessem afetar a produção posterior de biogás.

O reuso do meio de cultivo através da floculação da *Chlamydomonas reinhardtii* também foi estudado por Delrue et al. (2015), porém utilizando quitosana, polímero catiônico e clorossulfato de alumínio. Foi constatado uma considerável perda de nutrientes do meio pelo processo de floculação, especialmente com o clorossulfato de alumínio. Quanto a possível toxicidade do meio provocada pela presença de metais, não foi observada, no entanto, os flocculantes tiveram efeitos diferentes sobre a taxa de crescimento e produção de biomassa.

Em estudo realizado por Yunos et al., (2017), a quitosana foi eficaz na colheita de bioflocos de microalgas (sendo a *Chlorella* sp. a espécie dominante) apresentando alto desempenho, com turbidez final menor que 5 NTU, utilizando apenas 30 mg/L de quitosana. Além disso, o pH não foi afetado pela acidez da solução de quitosana.

O flocculante à base de taninos (Tanfloc) se mostrou confiável e econômico para a colheita de *N. oculata* com eficiências de até 98%. Quando comparado a outros polímeros sintéticos testados recentemente para colheita de microalgas marinhas, o Tanfloc apresentou melhor desempenho, porém destacaram que para uma colheita eficiente o pH deve ser ácido (ROSELET et al., 2016).

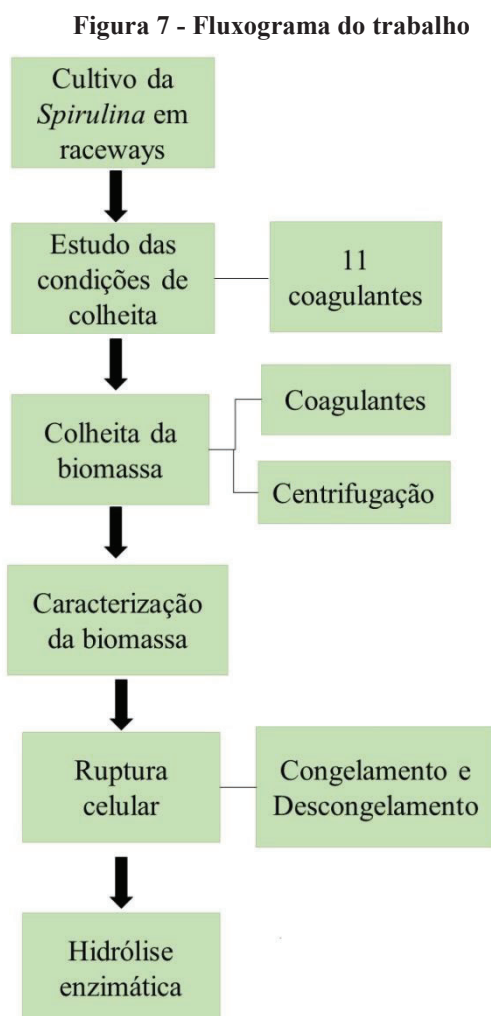
Hauwa et al. (2017) utilizaram *Moringa oleífera* (acácia branca) e *Strychnos potatorum* na colheita da microalga *Botryococcus* sp e concluíram que os coagulantes foram eficientes, principalmente com dosagem de 35 mg/L a pH 7,5 e com 75 minutos de repouso. A recuperação com *M. oleífera* foi maior, de 91,27%, enquanto que para *S. potatorum* a eficiência foi 41,33%.

A *M. oleífera* foi testada por Mohamed et al. (2017) para colheita de *Scenedesmus* sp. em comparação com coagulantes químicos, concluindo que o uso de coagulantes naturais é mais eficaz na recuperação da biomassa e cumpre com os padrões exigidos pela legislação em termos de turbidez.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos da Faculdade de Engenharia e Arquitetura e nas instalações do Parque Científico e Tecnológico (UPF Parque) da Universidade de Passo Fundo. A microalga selecionada, *Spirulina platensis* LEB 52, pertence à Coleção do Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos.

A metodologia e as etapas do trabalho estão esquematizadas na Figura 7.



3.1 Condições de cultivo

Os ensaios foram realizados em modo semi-contínuo, em tanques tipo *raceway* (Figura 8) de 300 L, com altura de fluido de 20 cm. O meio de cultivo utilizado foi o padrão Zarrouk (1966) na concentração 20%, apresentado na Tabela 2. Os cultivos foram mantidos com agitação promovida por bombas submersas com vazão máxima de 2500 L/h, com temperatura

entre 20 °C e 35 °C, luminosidade em condições ambientais não controladas e concentração inicial de inóculo de 0,20 g.L⁻¹ (MAGRO et al., 2017).

Tabela 2 - Composição do meio de cultivo Zarrouk 20%

Reagentes	Concentração (g.L ⁻¹)
NaHCO ₃	3,36
K ₂ HPO ₄	0,1
NaNO ₃	0,5
K ₂ SO ₄	0,2
NaCl	0,2
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,04
CaCl ₂	0,008
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,002
EDTA	0,0016

Fonte: Adaptado de Zarrouk, 1966.

A concentração celular dos cultivos foi acompanhada através da densidade ótica a 670 nm em espectrofotômetro, a partir de uma curva de calibração que relaciona massa seca de biomassa e absorbância (COSTA et al., 2002).

O pH e milivoltagem dos cultivos foram avaliados através do método potenciométrico, segundo a AOAC (1995).

Figura 8 - Tanque *raceway* para cultivo de microalgas



Durante a realização dos cultivos também foi realizado o ajuste diário do volume de líquido no tanque com água, devido às perdas por evaporação.

3.2 Estudos de coagulação para colheita da *S. platensis*

A colheita, separação das células do meio de cultivo, foi realizada com diferentes coagulantes. Para a escolha da concentração de coagulante foram realizados testes preliminares sem alteração de pH de cultivo (pH 10), testando concentrações de 300, 500, 700, 900, 1100, 1300 e 1500 mg/g de biomassa. Diante da ineficiência do processo de coagulação com pH 10, foram efetuados alguns testes realizando o ajuste de pH de cultivo para 7,5 através da adição de ácido acético, e utilizando concentrações de 50, 450, 850, 1250 mg/g de biomassa.

Os resultados dos testes preliminares foram considerados para a definição das variáveis de estudo e os níveis para a realização de Delineamentos Compostos Centrais (DCC), um delineamento para cada tipo de coagulante, tendo como variáveis a concentração de coagulante e pH (Tabela 3).

Tabela 3 – Delineamento Composto Central para os coagulantes com valores codificados e reais

Valores codificados		Valores reais												
Concentração														
pH	(mg/g biomassa)	pH	AM	Mo	SA	CF	B1	B2	SAIFe	P1	P2	SAFe	Tanino	
-1	-1	6,0	500	200	450	500	200	200	200	200	450	450	200	
+1	-1	9,0	500	200	450	500	200	200	200	200	450	450	200	
-1	+1	6,0	1500	1000	1250	1500	1000	1000	1000	1000	1250	1250	1000	
+1	+1	9,0	1500	1000	1250	1500	1000	1000	1000	1000	1250	1250	1000	
0	0	7,5	1000	600	850	1000	600	600	600	600	850	850	600	

AM: amido; Mo: *Moringa oleifera*; SA: Sulfato de Alumínio; CF: cloreto férrico; B1: Blend 1; B2: Blend 2; SAIFe: Sulfato de alumínio isento de ferro; P1: PAC 1; P2: PAC 2; SAFe: Sulfato de alumínio férrico.

Dentre os coagulantes, a *Moringa oleífera* e o amido necessitam de preparos específicos para extrair os compostos de interesse das sementes e do pó. Os blends comerciais são coagulantes a base de polímeros catiônicos em solução e coagulantes inorgânicos.

As sementes de *Moringa oleífera* foram reduzidas a pó através de moinho de facas e adicionadas a água destilada. A mistura foi agitada durante um período de 30 minutos a temperatura ambiente, resultando em um líquido esbranquiçado. O amido foi adicionado em água, na concentração escolhida e levado a aquecimento até 80 °C para gelatinização. As soluções foram preparadas imediatamente antes do uso, uma vez que perdem suas propriedades no armazenamento.

Cada experimento dos DCCs foi realizado em tréplicas utilizando-se volume de cultivo de 250 mL. O ajuste do pH foi realizado conforme Tabela 3, com ácido acético glacial, adicionou-se os coagulantes conforme as concentrações estabelecidas, levando a agitação 200 rpm provida por agitador mecânico durante 2 minutos, garantindo a mistura rápida, seguida de mistura lenta de 20 rpm durante 15 minutos para a floculação e repouso por 30 minutos.

A eficiência de separação de biomassa foi calculada levando em consideração a concentração inicial (método espectrofotométrico) e a concentração final do sobrenadante após coagulação (Equação 1).

$$Eficiência\ de\ separação\ de\ biomassa\ (\%) = \frac{(C_0 - C_f)}{C_0} \times 100 \quad (1)$$

Em que:

C_0 = Concentração inicial (g/L);

C_f = Concentração final (g/L).

Em função dos melhores resultados do delineamento composto central, foram realizados ensaios de coagulação e floculação com cada coagulante utilizando volume de cultivo de 2 L. Essa etapa teve duração de aproximadamente 45 dias, e o principal objetivo foi acumular biomassa para as etapas seguintes. Para efeito de controle, foi realizada a separação da biomassa dos cultivos por centrifugação a 1783g (3500 rpm) por 10 minutos, para comparação da qualidade da biomassa.

3.3 Caracterização da biomassa

A biomassa separada foi submetida a secagem a 50°C em estufa com circulação de ar até massa constante e submetida às determinações de carboidratos, proteínas, umidade e cinzas.

Traços de coagulantes na biomassa foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Tescan Veja 3LM) acoplado à espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS) (Oxford), que produz imagens da superfície e caracteriza quimicamente a amostra.

Para as análises de carboidratos e proteínas intracelulares da microalga, as amostras foram submetidas a ruptura celular através de sonda ultrassônica, utilizando ponteira micro. Assim, 5 mg de biomassa seca foram acondicionadas em tubos com 10 mL de água destilada, levados a sonda por 5 ciclos de 60 segundos.

A determinação de carboidratos foi realizada pelo método de Dubois et al. (1956) que baseia-se no fato de que açúcares simples ou complexos, quando tratados com fenol e ácido sulfúrico, produzem compostos com coloração alaranjada com absorção máxima em 488 nm.

A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951), que consiste em adição de NaOH 1 M ao extrato, aquecimento a 100° C por 5 minutos, resfriamento, adição de solução de tartarato de sódio/potássio e sulfato de cobre para leitura em espectrofotômetro a 750 nm.

O teor de umidade foi realizado em estufa a 105 °C por 4 h (AOAC, 2005). A análise de cinzas da biomassa foi realizada através do método descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (1985).

3.4 Ruptura celular e sacarificação

A ruptura celular é indicada para liberar os carboidratos intracelulares e para isso será seguido o método de congelamento e descongelamento relatado por Rempel et al. (2018) como o mais eficiente. Foi preparada uma suspensão de *Spirulina* 10% (m/v) em tampão fosfato de sódio 0,2 M e pH 5,5. Após as amostras foram congeladas durante 24 h e descongeladas a 4 °C e submetidas a gelatinização em banho termostático a 100 °C por 10 minutos, com objetivo de hidratar o amido presente na amostra.

A sacarificação dos polissacarídeos foi realizada por enzimas livres, a α -amilase (Liquozme[®] Supra 2.2X) e amiloglicosidase (AMG[®] 300L), com adição de 1% (v/v) na suspensão de *Spirulina* após a ruptura, seguindo metodologia proposta por Rempel et al.

(2018). O ensaio ocorreu em agitador orbital a 150 rpm em erlenmeyers de 125 mL, com volume útil de 50 mL, a temperatura de 50 °C.

Amostras de 1 mL foram retiradas a cada 4 h para determinar as concentrações de açúcar redutores (AR) pelo método do ácido 3-5-dinitrossalicílico (DNS) (MILLER, 1959), precedidos de precipitação das proteínas, utilizando soluções Carrez I e II (solução 15% de ferrocianeto de potássio e solução 30% de sulfato ou acetato de zinco, respectivamente), avolumando em balão volumétrico de 10 mL com água destilada e centrifugado.

A interferência dos coagulantes na sacarificação foi avaliada pelas eficiências de sacarificação, sendo que a eficiência de 100% equivale a total hidrólise dos polissacarídeos em açúcares redutores.

A eficiência de hidrólise (EH) foi calculada a partir da Equação 2.

$$EH (\%) = \frac{AR_{\text{após hidrólise}}}{\frac{(m_{\text{biomassa}}) \times (\text{CHO}) \times 1,1}{v}} \times 100 \quad (2)$$

Sendo:

EH (%): Eficiência de hidrólise;

AR_{após hidrólise} (g.L⁻¹): Açúcares redutores obtidos após hidrólise;

m_{biomassa} (g): Massa de *Spirulina* utilizada na sacarificação;

CHO (%): Carboidratos presentes na biomassa de *Spirulina*;

1,1: Fator de conversão do amido em glicose considerado;

V (L): Volume final dos ensaios.

A velocidade máxima de hidrólise também foi avaliada para as concentrações ao longo do tempo que diferiram estatisticamente da concentração inicial de açúcar redutor (tempo=0), através da Equação 3.

$$V_{\text{max}} = \frac{ARh - AR_{\text{inicial}}}{t} \quad (3)$$

Sendo:

V_{max} (g.L⁻¹.h⁻¹): velocidade máxima de hidrólise;

ARh (g/L): concentração de açúcar redutor no tempo final;

AR inicial (g/L): concentração de açúcar redutor inicial;

t (h): tempo de hidrólise para alcançar a ARh.

3.5 Hidrólise proteica

Com o objetivo de utilizar o teor de proteínas que constitui a composição da biomassa e testar o comportamento mediante outra enzima, foi realizada uma hidrólise proteica, utilizando a enzima protease (Protemax[®] 580L).

Foram seguidos parâmetros de Lisboa et al. (2014) e Silva (2017), preparando uma suspensão de *Spirulina* contendo 2% de proteínas em 50 mL de tampão bicarbonato-carbonato de sódio, pH 9,5. Para o rompimento da parede celular, novamente foi utilizado o método de congelamento e descongelamento, relatado por Rempel et al. (2018). Assim, as amostras foram congeladas durante 24 h e descongeladas a 4 °C. Foram utilizadas 5 U.mL⁻¹ da enzima protease para cada ensaio, sendo que 1 U de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µg de tirosina por minuto, expressa em U. mL⁻¹.

Os ensaios foram incubados em agitador orbital a 180 rpm em temperatura ótima de atividade da enzima, que é 60°C. Alíquotas foram retiradas no tempo inicial e no tempo final, que foi definido em 4 horas de reação.

Para a determinação do grau de hidrólise (GH) amostras de 1 mL do hidrolisado foram adicionadas de 9 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 6,25% e deixadas em repouso por 10 min. Após, foram centrifugadas por 5 min a 5000 rpm para remoção do material insolúvel precipitado pelo TCA. Determinou-se o teor de proteínas solúveis do sobrenadante utilizando o método de Lowry et al. (1951) expresso em mg de albumina.

O grau de hidrólise foi estimado segundo o método descrito por Hoyle e Merrit (1994) com modificações, sendo expresso pela quantidade de proteínas solúveis no TCA antes e após a adição da enzima em relação à quantidade de proteína total presente na amostra e calculado segundo a Equação 3.

$$GH (\%) = \left(\frac{(PS_t - PS_{t0})}{P_{total}} \right) \cdot 100 \quad (3)$$

Sendo:

PS_{t0}: quantidade de proteína solúvel em TCA 6,25 % antes da adição da enzima;

PS_t: quantidade de proteína solúvel em determinado tempo após a adição da enzima;

P_{total}: quantidade de proteína total na amostra.

3.6 Análise dos dados

As análises dos dados foram realizadas através de análise de variância e teste de Tukey, com 5% de nível de significância, com o intuito de examinar as diferenças entre as médias de cada ensaio, que foram realizados em triplicata. Para avaliar os resultados do Delineamento Composto Central foi utilizada a metodologia de planejamento de experimentos, que avalia os efeitos das variáveis de estudo (independentes) sobre a resposta (variáveis dependentes). Foram calculados os efeitos das variáveis, efeito da interação das variáveis e significância estatística (valor p). Para a análise dos dados foi utilizado o software *Statistica 7*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Estudo das condições de colheita utilizando coagulantes

Os primeiros ensaios de colheita das microalgas dos tanques abertos (raceway 1 e raceway 2) foram realizados quando os cultivos alcançaram a fase estacionária de crescimento celular. Com esses cultivos foram realizados testes de coagulação mantendo-se pH natural dos cultivos (pH 10), obtendo resultados preliminares que não serão apresentados, já que a remoção não foi considerada. Como a colheita não pode ser realizada neste momento, as células remanescentes foram utilizadas como inóculo para a obtenção de novos cultivos, mantendo os cultivos como modo semi-contínuo, a fim de que se pudesse obter biomassa para dar continuidade aos ensaios de coagulação, através dos delineamentos compostos centrais, para avaliar o efeito de pH e concentração de coagulante sobre a eficiência de coagulação. Os cultivos semi-contínuos são caracterizados pela retirada de um volume parcial de meio de cultivo contendo o produto do reator e adição de mesma quantidade de volume de meio novo, sendo que o meio retirado é então encaminhado para os processos de downstream, neste caso, de coagulação da biomassa para posterior aplicação.

Os cultivos foram sendo mantidos com adição de água e nutrientes quando necessário, provendo desta forma a biomassa de boa qualidade para realização dos ensaios previstos nos delineamentos compostos centrais. A concentração celular dos cultivos utilizados nos testes de coagulação manteve-se em torno de 1,30 g/L.

A Tabela 4 apresenta as eficiências médias de remoção obtidas a partir dos ensaios dos DCCs realizados para os 11 coagulantes testados. Verificou-se que alguns coagulantes se destacaram, com eficiências superiores a 99%, enquanto que outros obtiveram resultados em torno de 5% de eficiência de separação das células de *Spirulina*.

Tabela 4 - Eficiências médias da colheita de *Spirulina* utilizando coagulantes

Coagulante	Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3		Ensaio 4		Ensaio 5		Ensaio 6	
	pH	Conc.	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1
AM			40,05±24,65 ^{abc}	5,76±9,97 ^c	39,21±12,71 ^{abc}	15,35±16,67 ^{bc}	60,19±16,56 ^a					51,32±8,40 ^{ab}
Mo			70,25±18,68 ^a	35,65±18,36 ^{ab}	62,03±19,15 ^{ab}	26,58±7,30 ^b	66,24±3,65 ^a					73,63±8,01 ^a
SA			74,01±9,06 ^b	14,41±0,84 ^c	99,54±0,15 ^a	37,57±18,69 ^c	38,98±5,08 ^c					35,31±5,17 ^c
CF			83,20±7,57 ^a	22,57±3,72 ^c	74,28±6,87 ^{ab}	62,47±7,96 ^{ab}	61,68±7,96 ^{ab}					59,06±14,70 ^b
B1			40,65±21,55 ^b	24,66±6,15 ^b	93,22±5,53 ^a	28,46±17,59 ^b	58,81±9,70 ^{ab}					49,32±13,41 ^b
B2			90,08±4,04 ^a	45,29±8,58 ^b	88,03±16,29 ^a	97,22±2,96 ^a	92,37±1,53 ^a					92,90±1,20 ^a
SAIFe			71,53±9,03 ^a	28,94±8,28 ^b	91,90±8,04 ^a	26,39±9,84 ^b	46,06±5,99 ^b					31,02±2,63 ^b
P1			38,98±6,39 ^b	9,04±5,76 ^c	92,09±5,64 ^a	16,67±0,49 ^c	14,41±1,46 ^c					16,10±1,69 ^c
P2			64,01±2,84 ^b	12,39±0,00 ^d	97,02±4,33 ^a	26,25±17,46 ^{cd}	41,00±9,75 ^{bc}					33,63±0,88 ^{cd}
SAFe			64,49±2,64 ^a	41,39±19,08 ^a	75,38±9,45 ^a	50,98±21,50 ^a	55,56±1,31 ^a					50,11±5,28 ^a
Tanino			45,05±6,68 ^b	26,74±3,36 ^c	76,56±3,53 ^a	30,04±3,17 ^d	66,41±5,12 ^a					52,34±5,47 ^b

AM: amido; Mo: *Moringa oleifera*; SA: Sulfato de Alumínio; CF: cloreto férrico; B1: Blend 1; B2: Blend 2; SAIFe: Sulfato de alumínio isento de ferro; P1: PAC 1; P2: PAC 2; SAFe: Sulfato de alumínio férrico.

Letras iguais nas linhas indicam que não há diferença estatística entre as médias dos ensaios, $p > 0,05$.

Os efeitos das variáveis pH e concentração de coagulante utilizados, bem como o nível de significância das variáveis, estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Efeitos calculados e níveis de significância (p) das variáveis pH e concentração de coagulante sobre a eficiência de coagulação, para cada coagulante testado.

Coagulante		pH	Concentração	Interação
Amido	Efeito	-31,53	+6,83	+2,76
	p	0,0387	0,6268	0,8435
<i>Moringa oleífera</i>	Efeito	-35,02	-8,64	-0,42
	p	0,0037	0,4052	0,9671
Sulfato de Al	Efeito	-60,79	+24,34	-1,18
	p	0,0000	0,0067	0,8797
Cloreto férrico	Efeito	-36,22	+15,49	+24,41
	p	0,0000	0,0054	0,0001
Blend 1	Efeito	-40,38	+28,18	-24,39
	p	0,0001	0,0029	0,0076
Blend 2	Efeito	-17,79	+24,98	+26,29
	p	0,0074	0,0006	0,0003
Sulfato de Al isento Fe	Efeito	-54,05	+8,91	-11,46
	p	0,0000	0,2272	0,1267
PAC 1	Efeito	-52,68	+30,36	-22,74
	p	0,0000	0,0015	0,0108
PAC 2	Efeito	-61,19	+23,44	-9,57
	p	0,0000	0,0018	0,1400
Sulfato de Al férrico	Efeito	-23,75	+10,23	-0,65
	p	0,0044	0,1657	0,9269
Tanino	Efeito	-32,41	+17,40	-14,10
	p	0,0000	0,0100	0,0303

Fatores foram considerados significativos quando $p < 0,05$. p=nível de significância.

Somente o pH foi significativo ($p < 0,05$) sobre a eficiência de coagulação para os coagulantes amido, *Moringa*, sulfato de alumínio isento de ferro e sulfato de alumínio férrico. A *Moringa oleífera* apresentou redução de 35% na eficiência de coagulação quando o pH foi alterado de 6,0 para 9,0. O sulfato de alumínio isento de ferro apresentou decréscimo de 54%; o sulfato de alumínio férrico, decréscimo de 23,75% e o amido, decréscimo de 31,53%. Como a concentração do coagulante não foi significativa sobre eficiência de coagulação ($p > 0,05$) deve-se escolher a concentração mais baixa de coagulante, o que ocasiona diretamente em uma diminuição de custos no processo.

Para esse grupo de coagulantes foi selecionada a condição dos ensaios 1, sendo de pH 6,0 e as menores concentrações testadas: 500 mg/g para o amido, 200 mg/g para a *Moringa* e o sulfato de alumínio isento de ferro e 450 mg/g para o sulfato de alumínio férrico.

As variáveis pH e a concentração influenciaram a eficiência de coagulação de forma significativa ($p < 0,05$) para os coagulantes sulfato de alumínio e PAC 2.

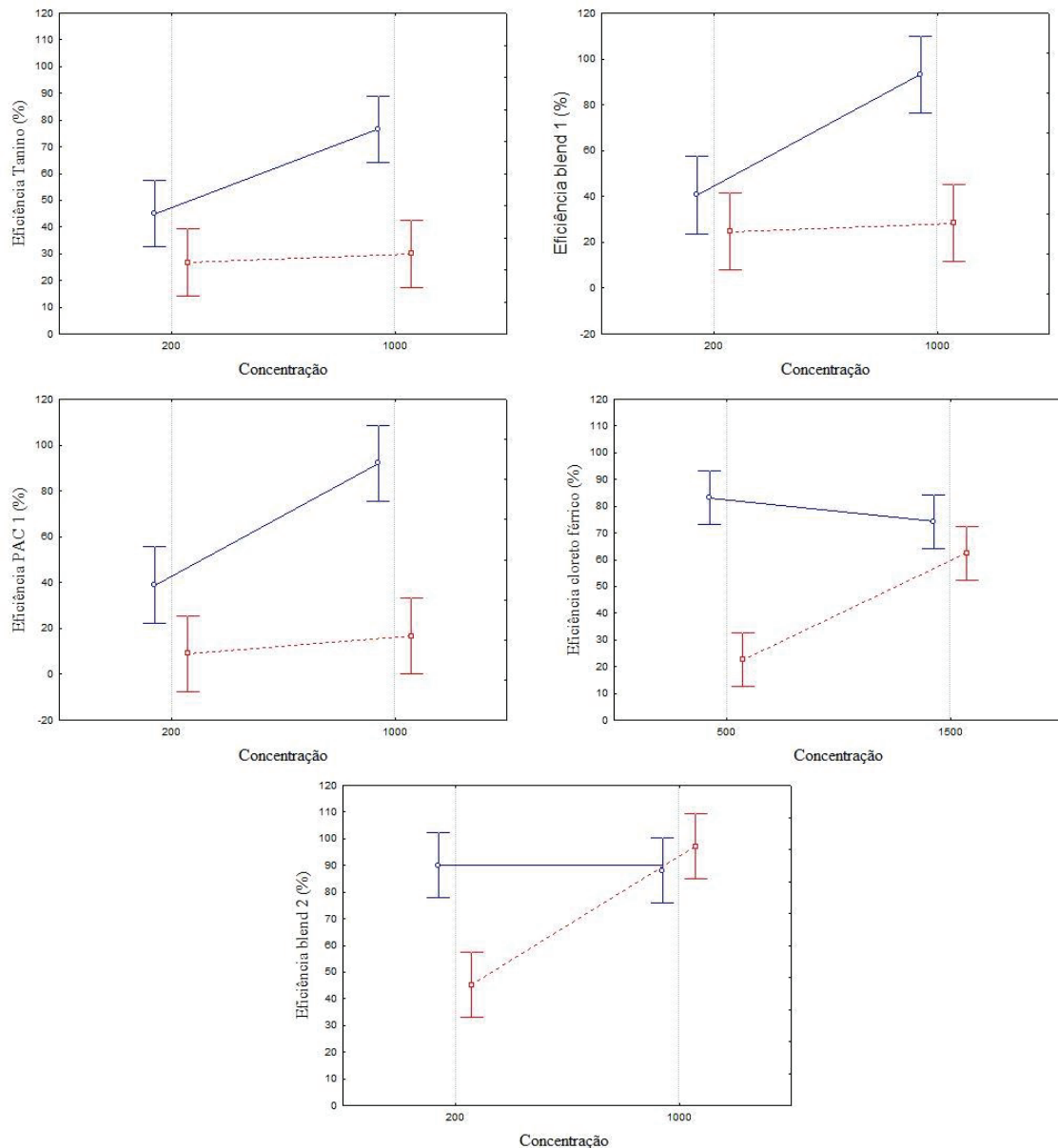
Ficou evidenciado para o sulfato de alumínio que o aumento do pH do nível inferior (pH 6,0) para o nível superior (pH 9,0) ocasionou um decréscimo de cerca de 60% na eficiência de coagulação. A concentração apresentou efeito contrário, mostrando que quando a concentração é aumentada do nível inferior (-1) para o nível superior (+1), resulta em um acréscimo de 24,34% na eficiência de colheita. Então, é aconselhável o uso de pHs 6,0 na colheita de *Spirulina platensis* quando utilizado o sulfato de alumínio e concentração de 1250 mg/g de biomassa.

Quando utilizado o coagulante PAC 2, a mudança do nível inferior para o superior do pH acarretou redução de 61,19% na eficiência de coagulação, enquanto a concentração teve efeito positivo de 23,44%. Assim, a condição de colheita para o PAC 2 utilizada foi pH 6,0 e concentração 1250 mg/g de biomassa.

Os coagulantes blend 1, blend 2, cloreto férrico, tanino e PAC 1 obtiveram comportamento semelhante quanto aos fatores que apresentaram efeitos significativos. Todos indicam que a interação entre pH e concentração são significativas para a eficiência de coagulação ($p < 0,05$).

A Figura 9 apresenta os gráficos de interação de médias das variáveis que apresentaram interação significativa sobre a eficiência de coagulação para os diferentes coagulantes usados.

Figura 9 – Efeitos de pH e concentração na colheita de *Spirulina* utilizando tanino, blend 1, PAC 1, cloreto férrico e blend 2



Na cor vermelha está representada o pH do nível +1 e a coloração azul representa o pH do nível -1.

Os coagulantes tanino, blend 1 e o PAC 1 apresentam o mesmo perfil, podendo concluir que a eficiência é superior quando o pH está no nível -1 (pH 6,0) e a concentração está no nível +1 (1000 mg/g de biomassa).

Observa-se para o cloreto férrico e para o blend 2, quando o pH está no nível inferior (linha azul), as eficiências foram semelhantes para ambos valores de concentração. Com o pH no nível superior (linha vermelha), a eficiência foi elevada quando a concentração alta foi testada. Então, pode-se utilizar o cultivo com o pH no nível +1 (pH 9,0), desde que se utilize a concentração alta de coagulante, e com pH 6,0, podendo utilizar assim a concentração mais

baixa de coagulante. Para o cloreto férrico foi escolhido o pH 6,0 e a concentração 500 mg/g de biomassa e para o blend 2, também pH 6,0 e concentração de coagulante 200 mg/g de biomassa.

Lama et al. (2016) concluíram que os mecanismos de coagulação podem explicar as eficiências de separação mesmo quando utilizadas concentrações baixas. No mecanismo de varredura, a dosagem de coagulante tende a ser independente das características da superfície da partícula, mas deve ser elevada pois as partículas coloidais devem ser envolvidas formando grandes massas de precipitados.

Em geral, o mecanismo de formação de pontes é observado com o uso de polieletrólitos e no caso da *Moringa oleifera*, que possui a fração ativa responsável pela coagulação semelhante aos polieletrólitos, nesse caso as frações ativas e os coloides são aglomerados. O pH tem grande influência na separação de sólidos. Kapse, Patoliya e Samadder (2017) ao estudarem o tratamento de um efluente pelo processo de coagulação/floculação utilizando a *Moringa oleifera* observaram que apenas a alteração do pH, em um experimento sem adição do coagulante, já foi capaz de reduzir a turbidez do efluente em 12%.

No mecanismo de neutralização, observado geralmente com coagulantes inorgânicos, a concentração de coagulante necessária é altamente dependente do número de cargas que precisam ser neutralizadas, que por sua vez são uma função da densidade de carga da superfície da célula, bem como a relação superfície-volume das células, parâmetros que diferem fortemente entre espécies de microalgas (LAMA et al., 2016), então nesse estudo é natural que os coagulantes inorgânicos sejam mais eficientes nas altas dosagens, já que o cultivo de *Spirulina* apresenta um elevado número de cargas negativas a serem neutralizadas.

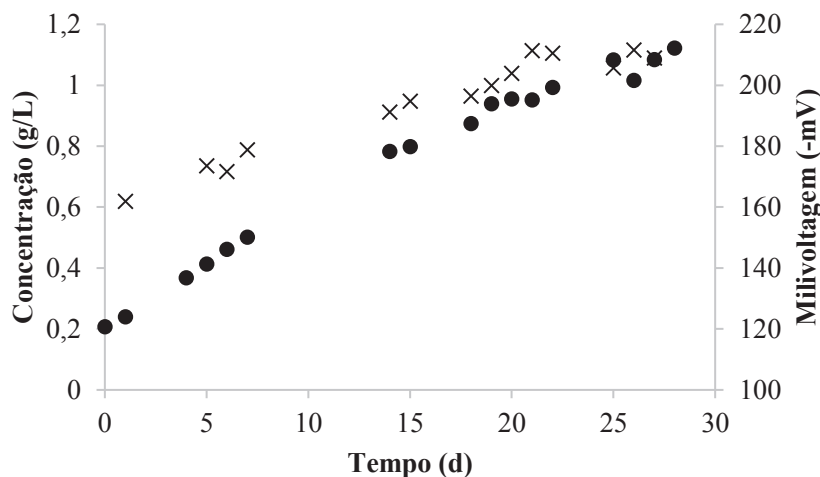
Alguns trabalhos, como o de Fontoura (2017), indicam que para a colheita das microalgas *Scenedesmus sp.* e *Chlorella sp.* não foi necessária a mudança do pH e utilizaram concentrações inferiores de cloreto férrico e taninos. No entanto, cada microalga possui características particulares, e por isso é importante observar que outros fatores também podem afetar na eficiência do processo.

Brennan e Owende (2010) apontam o tamanho da célula como o principal fator para a facilidade ou dificuldade na colheita. Se fosse considerado apenas o tamanho da célula, no caso a *Spirulina*, que possui uma forma longa em espiral com aproximadamente 20 a 100 μm de comprimento, poderia ser considerada uma microalga fácil de separar em comparação à *Chlorella* que possui dimensões de $< 30 \mu\text{m}$. No entanto, na coagulação e floculação que

funciona desestabilizando cargas e agregando as células, a carga do cultivo também deve ser considerada.

A Figura 10 traz a média das concentrações celulares (g/L) e as milivoltagens (-mV) medidas no decorrer de 30 dias de um cultivo de *Spirulina platensis* LEB 52, utilizado nos ensaios de coagulação.

Figura 10 - Média das concentrações celulares dos cultivos (•) e milivoltagens (×) dos cultivos



Verificou-se que à medida que a concentração celular aumentava, o valor de milivoltagem (-mV) também aumentava. O consumo dos sais do meio de cultivo como nutrientes para o crescimento algal indicaria uma tendência de diminuição das cargas que dificultam a separação. Entretanto, o aumento da concentração celular faz com que se observe um aumento no número de cargas negativas, demonstrando que as células são carregadas negativamente de acordo com seu crescimento. Isso confirma que mesmo a separação de uma mesma espécie pode ser facilitada ou dificultada quando realizada em condições diferentes, como por exemplo, concentração celular ou fase de cultivo distinta, já que terá menos ou mais cargas a serem desestabilizadas.

Vandamme et al. (2015) observaram na coagulação alcalina da *Chlorella vulgaris* e *Phaeodactylum tricorutum*, que para a *Chlorella* foi necessária uma menor concentração de hidróxido de magnésio. As observações realizadas no trabalho foram de que é improvável que essa diferença seja justificada pela concentração de biomassa, pois as concentrações eram muito semelhantes (0,4 mg/L e 0,3 mg/L), assim uma explicação plausível é de que as células

possuem propriedades diferentes que interferem no processo de separação, como por exemplo potencial zeta, pH e força iônica do meio de cultivo.

Henderson, Parsons e Jefferson (2008) observaram que apesar da similaridade de áreas superficiais (tamanho) das células de *M. aeruginosa* e *C. vulgaris*, a colheita da *C. vulgaris* demandou 3 vezes mais coagulante em comparação com a *M. aeruginosa*. Trabalhando com *A. formosa* e *Melosira sp.*, que apresentam células relativamente maiores que a *M. aeruginosa*, foi necessário 22 e 207 vezes mais coagulante, respectivamente, do que para a *M. aeruginosa*. Isso é mais um indicativo que a demanda de coagulante está relacionada a carga do cultivo e não ao tamanho celular, como indicam alguns estudos. Se a eficiência de separação estivesse relacionada ao tamanho, as células maiores demandariam menos coagulante em comparação às menores.

Outra informação trazida por Henderson, Parsons e Jefferson (2008) que se encaixa no presente trabalho é de que a microalga que mais demandou coagulante, a *Melosira sp.* é uma diatomácea grande e filamentosa, mais semelhante a *Spirulina platensis*, e é especificamente identificada pelas empresas de tratamento de água como uma espécie problemática e difícil de remover.

Segundo Lama et al. (2016) um método de floculação que é eficaz para uma espécie, pode não ser bem sucedido para outras espécies de microalgas, diante da grande diversificação de tamanhos, formas e propriedades da superfície celular. A comparação entre diferentes estudos torna-se complicada também pelas condições experimentais que inevitavelmente são diferentes. No entanto, os autores notaram que a floculação é bastante previsível para a mesma espécie, se observadas as mesmas condições de cultivo e a colheita for realizada na fase certa. Os estudos de coagulação, entretanto, são necessários, independente da aplicação que se deseje dar à biomassa.

4.2 Coagulação em maior escala

As condições dos ensaios de coagulação em maior escala estão apresentadas na Tabela 6. Essa etapa teve duração de aproximadamente 45 dias, sendo que o principal objetivo era acumular biomassa para as etapas subsequentes.

Tabela 6 - Condições de concentração celular, pH e milivoltagem dos cultivos

Concentração cultivo (g/L)	pH do meio	Milivoltagem (mV)	Milivoltagem após ajuste de pH para 6,0 (mV)
1,31±0,22	9,73±0,21	-193,99±7,18	36,74±4,53

A concentração média de células de *Spirulina platensis* de 1,31 g/L é considerada uma concentração alta se comparada a alguns estudos. Um exemplo é o trabalho de Wyatt et al. (2011) que avaliou a coagulação utilizando cloreto férrico da *Chlorella zofingiensis* variando a concentração celular em 0,05, 0,10 e 0,12 g/L.

A alta densidade garante mais colisões célula-célula, já que estão próximas, o que facilitaria o processo de separação (SCHLESINGIR et al., 2012). Porém, no trabalho de Chatsungnoen e Chisti (2016), a espécie de microalga (tamanho, morfologia e carga superficial) foi a influência mais forte na coagulação e floculação e a dose do coagulante necessária para remover 95% da biomassa aumentou linearmente com a concentração da biomassa do meio. Isso justifica a utilização de concentrações celulares na ordem de 1,30 g/L para este estudo.

Alguns coagulantes apresentaram baixas eficiências na separação, o que dificultou o acúmulo de biomassa. As eficiências médias podem ser avaliadas pela Tabela 7.

Tabela 7 - Eficiências médias para cada coagulante no acúmulo de biomassa em aproximadamente 45 dias de ensaio

Coagulante	Concentração do coagulante (mg/g de biomassa)	Remoção média (%)
AM	500	37,72±25,99 ^b
Mo	200	24,33±17,71 ^b
SA	1250	97,80±6,00 ^a
CF	500	40,62±17,53 ^b
B1	1000	99,40±1,23 ^a
B2	200	96,19±6,57 ^a
SAIFe	200	42,91±28,45 ^b
P1	1000	95,68±11,97 ^a
P2	1250	98,77±3,50 ^a
SAFe	450	80,27±23,79 ^a
Tanino	1000	99,50±0,62 ^a

AM: amido; Mo: Moringa oleifera; SA: Sulfato de Alumínio; CF: cloreto férrico; B1: Blend 1; B2: Blend 2; SAIFe: Sulfato de alumínio isento de ferro; P1: PAC 1; P2: PAC 2; SAFe: Sulfato de alumínio férrico. Letras iguais nas colunas indicam que não há diferença estatística entre as médias dos ensaios, $p > 0,05$.

Os resultados inferiores foram obtidos com os coagulantes amido, *Moringa oleifera*, cloreto férrico e sulfato de alumínio isento de ferro. O amido e a *Moringa oleifera*, por serem dois coagulantes naturais, devem ser preparados diariamente, o que pode ter sido uma variável não controlada do processo. Além do mais, existem outras formas de preparo relatadas na literatura que podem ser mais efetivas.

Acredita-se que o mau estado de conservação da *Moringa oleifera* é responsável pela degradação de sua proteína responsável pela coagulação e embora haja uma ampla gama de

pesquisas relatando o alto potencial das sementes, ainda há muito que ser estudado sobre o isolamento e identificação da proteína ativa responsável pela coagulação (CHOUDHARY e NEOGI, 2017).

Os quatro coagulantes que obtiveram resultados inferiores de eficiência de coagulação (amido, *Moringa*, cloreto férrico e sulfato de alumínio isento de ferro) também tiveram dosagens baixas quando comparados aos demais, assim, apesar da baixa eficiência, a dosagem representou menores custos.

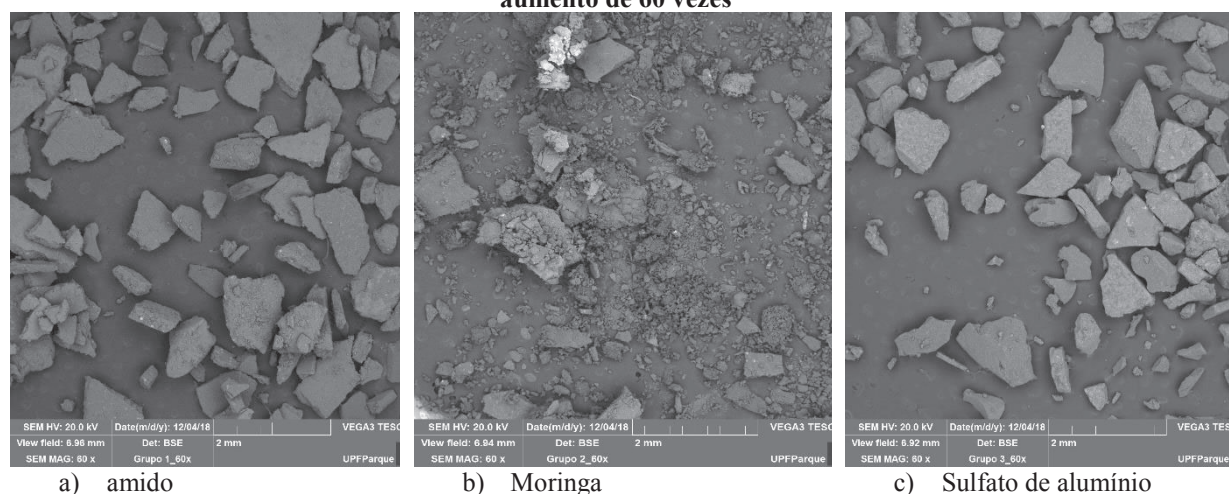
Diferindo estatisticamente do primeiro grupo ($p < 0,05$) e com eficiências superiores estão os coagulantes sulfato de alumínio, blend 1, blend 2, pac 1, pac 2, sulfato de alumínio férrico e tanino. Quanto à concentração de coagulante, as dosagens do blend 2 e sulfato de alumínio férrico foram menores, o que implica em uma economia de recursos.

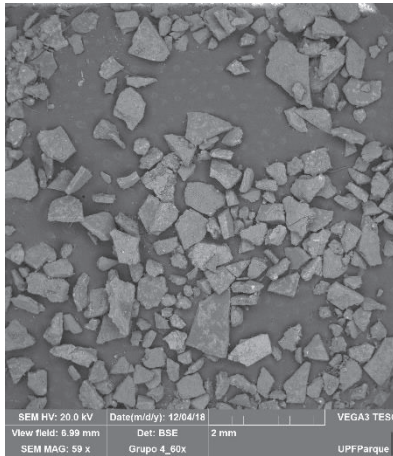
No trabalho de Chatsungnoen e Chisti (2016), trabalhando com *Chlorella vulgaris*, *Choricystis minor*, *Cylindrotheca fusiformis*, *Neochloris sp.*, *Nannochloropsis salina* em quase todos os casos o sulfato de alumínio foi o coagulante mais eficaz quando comparado ao cloreto férrico, exigindo uma dosagem inferior devido à densidade de carga do íon Al^{3+} ser relativamente mais alta que do Fe^{3+} , além do sulfato de alumínio ser mais barato.

4.3 Caracterização das biomassas

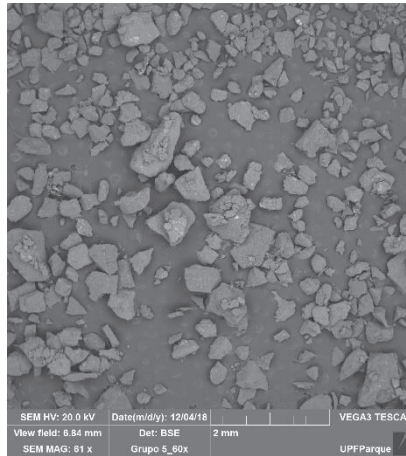
Para melhor compreensão da composição das biomassas que foram separadas, a Figura 11 apresenta a microscopia eletrônica de varredura das biomassas em aumento de 60 vezes.

Figura 11 – Microscopia eletrônica de varredura das biomassas separadas com os coagulantes em aumento de 60 vezes

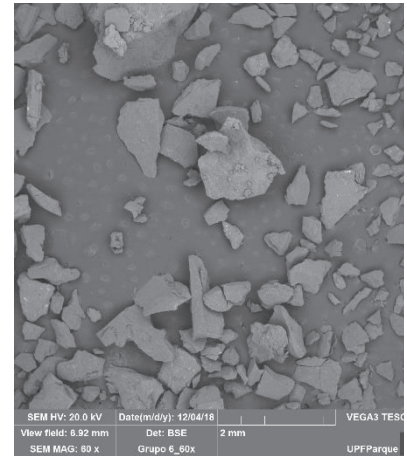




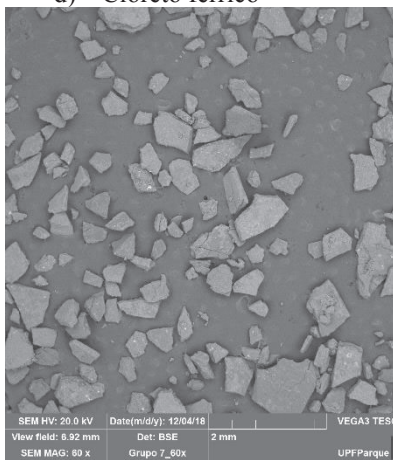
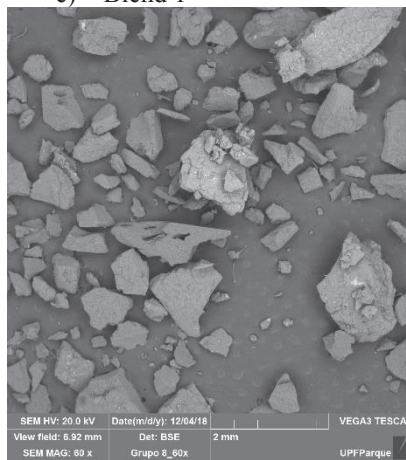
d) Cloreto fêrrico



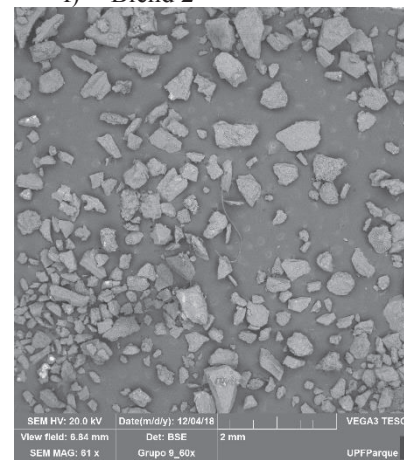
e) Blend 1



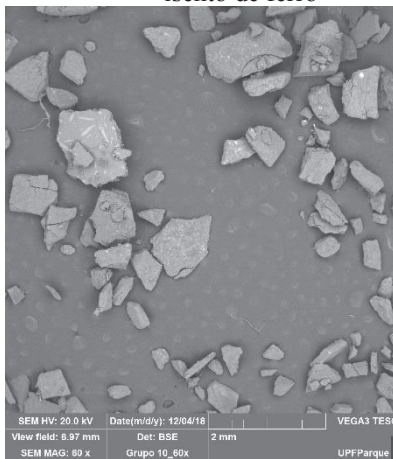
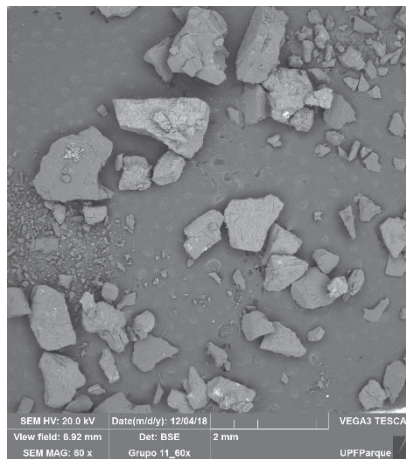
f) Blend 2

g) Sulfato de alumínio
isento de ferro

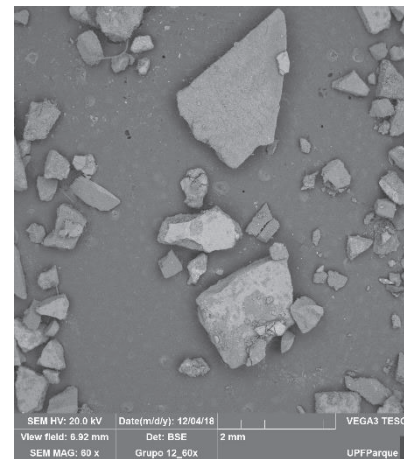
h) PAC 1



i) PAC 2

j) Sulfato de alumínio
fêrrico

k) Tanino



l) Centrifugada

Visualmente as formas das biomassas diferem de um método de colheita e outro, já que as ligações formadas entre coagulante e célula são diferentes. Com o auxílio da espectroscopia por energia dispersiva (EDS) foi possível realizar determinação da composição a partir de cinco a dez espectros para cada coagulante.

Entre os cinco espectros realizados para o amido, quatro deles mostram predominantemente a presença de sódio (43,2% a 50,2%), oxigênio (39,6% a 40,9%) e potássio (3,3% a 7,0%), seguido de outros nutrientes como enxofre, silício, fósforo, cálcio, magnésio, entre outros. Um dos espectros mostra a maior composição de boro, o que é curioso, já que não está presente na composição do meio de cultivo Zarrouk.

Os espectros da *Moringa oleifera* apresentam, em três deles, majoritariamente carbono (47,7% a 56,3%), oxigênio (29,1% a 38,0%) e sódio (10,5% a 20,5%), explicados pela composição da *Moringa* e meio de cultivo utilizado. Em dois outros espectros a maior parte é composta por oxigênio (37,9% e 43,3%), sódio (36,6% e 46,5%), silício (3,8%), potássio, enxofre e outros.

O sulfato de alumínio apresentou maior homogeneidade nos espectros, sendo predominante em todos o oxigênio (36,9% a 45,5%), sódio (6,1% a 31,6%) e alumínio (4,8% a 15,8%), variando em seguida potássio, magnésio, enxofre, cloro e fósforo.

Para o cloreto férrico, a composição predominante dos espectros é oxigênio (27,9% a 50,1%), sódio (28,3% a 45,0%) e ferro. A composição de ferro é bem variante, estando entre 4,5% e 23,6%, o que pode indicar uma heterogeneidade na amostra.

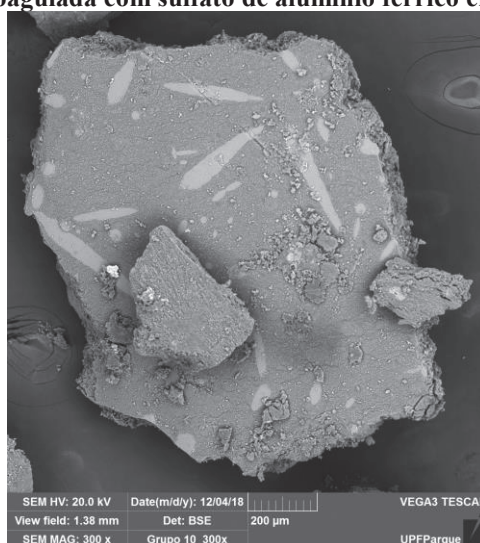
No blend 1 e no blend 2 se destacam os elementos oxigênio, sódio e cloro. Alguns traços de alumínio também foram observados já que a composição dos coagulantes contém sulfato de alumínio e cloretos, por reunirem características inorgânicas e orgânicas.

O sulfato de alumínio isento de ferro nos seus espectros destaca a presença de oxigênio (36,6% a 43,9%), sódio (23,3% a 56,6%) e potássio (1,2% a 16,1%). A presença de enxofre e alumínio é mínima e há ausência de ferro, como era esperado.

Os espectros para o pac 1 e pac 2 foram semelhantes, principalmente porque a diferença apresentada na composição dos dois é apenas a concentração dos compostos. Se destacaram os elementos oxigênio, sódio, alumínio e cloro.

Sódio (31,6% a 53,2%), oxigênio (36,2% a 41,8%), potássio (1,4% a 5,8%), alumínio e cloro se destacam nos espectros do sulfato de alumínio férrico. A presença de ferro detectada foi mínima, entre 0,4% e 1,4%. Nessa amostra realizou-se um aumento em 300 vezes, detectando a presença de sulfatos na forma de manchas na superfície da amostra que podem ser observados na Figura 12.

Figura 12 - Amostra coagulada com sulfato de alumínio férrico em aumento de 300 vezes



A biomassa que foi coagulada com o auxílio do tanino apresenta majoritariamente oxigênio (40,4% a 48,8%), sódio (8,7% a 38,0%) e carbono (7,3% a 26%), seguido de potássio, cloro, fósforo, enxofre, entre outros. Alguns espectros identificaram a presença de alumínio em baixo teor. Quanto à presença de carbono, deve-se ao fato do coagulante ser orgânico.

Por fim, a biomassa separada por centrifugação compõe-se basicamente de oxigênio (38,6% a 48,7%), sódio (14,6% a 36,5%), potássio (5,3% a 15,3%), cloro, fósforo, enxofre, magnésio, silício e cálcio, que são nutrientes utilizados no meio de cultivo Zarrouk.

A composição química das biomassas está apresentada na Tabela 8.

Tabela 8 - Composição química das biomassas secas separadas por diferentes métodos

Amostra	Carboidratos (%)	Proteínas (%)	Cinzas (%)	Umidade (%)
AM	10,29±0,59 ^{ac}	27,32±1,80 ^g	42,35±1,27 ^{ab}	11,26±0,37 ^{ab}
Mo	7,00±1,11 ^{bcd}	39,38±1,85 ^{dg}	36,74±0,19 ^{bcd}	9,29±0,27 ^{abc}
S.A	5,93±0,67 ^{bd}	55,47±3,77 ^{bc}	30,66±0,29 ^{cdef}	7,30±0,26 ^c
CF	3,46±0,70 ^b	28,23±3,28 ^g	47,04±0,72 ^a	8,48±0,30 ^{abc}
B1	7,55±0,78 ^{cd}	67,37±6,29 ^{ef}	29,15±0,78 ^{def}	10,30±0,28 ^{abc}
B2	10,49±1,66 ^{ac}	70,44±5,25 ^{ef}	23,60±1,69 ^f	7,82±1,53 ^{bc}
SAIFe	5,48±1,52 ^{bd}	45,08±0,73 ^{bd}	37,50±1,79 ^{bc}	12,33±15 ^a
P1	6,99±1,64 ^{bcd}	63,27±1,58 ^{cf}	30,54±2,12 ^{cdef}	9,54±0,82 ^{abc}
P2	6,88±1,28 ^{bcd}	36,23±0,65 ^{df}	34,26±4,07 ^{ced}	8,24±0,72 ^{bc}
SAFe	8,05±1,16 ^{cd}	69,49±5,05 ^{ef}	32,09±0,98 ^{cde}	8,84±0,23 ^{abc}
Tanino	12,09±2,32 ^a	87,68±5,43 ^a	24,27±3,13 ^f	8,41±0,41 ^{abc}
Centrifuga	9,00±0,64 ^{acd}	78,68±6,96 ^{ae}	27,79±2,20 ^{ef}	10,79±3,11 ^{abc}

AM: amido; Mo: *Moringa oleifera*; SA: Sulfato de Alumínio; CF: cloreto férrico; B1: Blend 1; B2: Blend 2; SAIFe: Sulfato de alumínio isento de ferro; P1: PAC 1; P2: PAC 2; SAFe: Sulfato de alumínio férrico. Letras iguais nas colunas indicam que não há diferença estatística entre as médias dos ensaios, $p > 0,05$.

O alto teor de cinzas para todas as amostras indica a presença do coagulante e dos sais do meio de cultivo que também foram precipitados. Normalmente, o teor de cinzas da biomassa de *Spirulina* fica em torno de 10% (HABIB et al., 2008). Mesmo a biomassa separada por centrifugação apresentou teor elevado de cinzas, o que pode ser explicado em função da obtenção de biomassa pelo modo semi-contínuo realizado no cultivo da microalga. Assim, quando ocorreram os ensaios de separação, no meio líquido havia uma considerável concentração de nutrientes que foram carregados para as etapas posteriores de downstream e permaneceram aderidos à biomassa.

A presença dos coagulantes e dos sais do meio cultivo na biomassa não seria desejável, porém para excluir essa parcela seriam necessários outros processos que adicionariam custo à produção de biomassa e diminuiriam a viabilidade ambiental, já que o processo mais utilizado é a lavagem da biomassa com água ou outros solventes. Além disso, um dos objetivos do trabalho é avaliar a aplicação da hidrólise enzimática nesse tipo de biomassa.

O alto teor de cinzas interferiu nas determinações de carboidratos e proteínas, visto que mesmo sem a determinação de lipídios da biomassa, algumas biomassas apresentaram somatório superior a 100% na composição química. O teor de cinzas apesar de elevado, não tem probabilidade de estar equivocado, partindo-se do pressuposto que as determinações de cinzas e umidade são gravimétricas. Assim, a explicação mais adequada é que este teor elevado teria interferido nas determinações físico-químicas (carboidratos e proteínas).

Diante desses resultados, as determinações de carboidratos e proteínas foram repetidas por pelo menos cinco vezes, pois julgava-se que os resultados estavam equivocados, obtendo-se os mesmos resultados. Além da sonda ultrassônica, outros métodos de ruptura celular foram testados, como o método de autoclavagem, obtendo-se os mesmos resultados, que confirma a interferência que os sais e os resíduos de coagulante têm na determinação físico-química das biomassas, superestimando ou subestimando seus teores.

No estudo de Laurens et al. (2012), grandes diferenças foram encontradas entre métodos de determinação de proteínas por métodos colorimétricos. Segundo os autores, o procedimento colorimétrico tem sido amplamente utilizado, mas é preciso cautela quando a acessibilidade das proteínas para reação do reagente de Folin, a aplicabilidade da proteína padrão utilizada para calibração e a ausência de substâncias interferentes na biomassa.

A lista de substâncias interferentes no método de Lowry é extensa e foi publicada por Peterson (1979). Os sais estão relatados como alguns dos responsáveis pela interferência, aumentando a cor devido ao branco, diminuindo a cor devido a proteína ou ambos.

A determinação de carboidratos de microalgas é uma das principais barreiras na caracterização da composição química das microalgas. Até mesmo os componentes lipídicos, proteicos e pigmentos encontrados nas microalgas são suscetíveis de interferir o teor de carboidratos pelo método fenol-sulfúrico, subestimando ou superestimando o teor de carboidratos total (TEMPLETON et al., 2012).

De qualquer forma, esperava-se baixo teor de carboidratos em comparação ao teor de proteínas, o que se deve ao fato de que o cultivo foi realizado em modo semi-contínuo, ou seja, com adição periódica de nutrientes ao meio, mantendo assim o cultivo sempre em fase exponencial de crescimento. É esperado que o maior acúmulo de carboidratos, que são compostos de reserva nutricional pela microalga, ocorra nas fases de declínio (MARKOU et al., 2012).

Apesar da necessidade de uso de 1g de tanino por g de biomassa, a biomassa separada teve menor teor de cinzas e maiores teores de carboidratos e proteínas, diferindo estatisticamente dos demais. Isso é explicado pela composição orgânica, assim, o coagulante pode possuir frações proteicas e de carboidratos que conferiram essas características à biomassa.

A biomassa coagulada com 500 mg/g de cloreto férrico apresentou o maior teor de cinzas e menor teor de carboidratos, diferindo estatisticamente dos demais. A dosagem não foi alta, porém para este coagulante a eficiência baixa de coagulação, a caracterização e até mesmo a coloração alaranjada da biomassa indicam que a presença do coagulante é destacada perante as células de *Spirulina*. Com o sulfato de alumínio isento de ferro ocorreu o mesmo, como pode ser observado na Figura 13.

Figura 13 - Biomassa separada com cloreto férrico, sulfato de alumínio isento de ferro e centrifugada, respectivamente



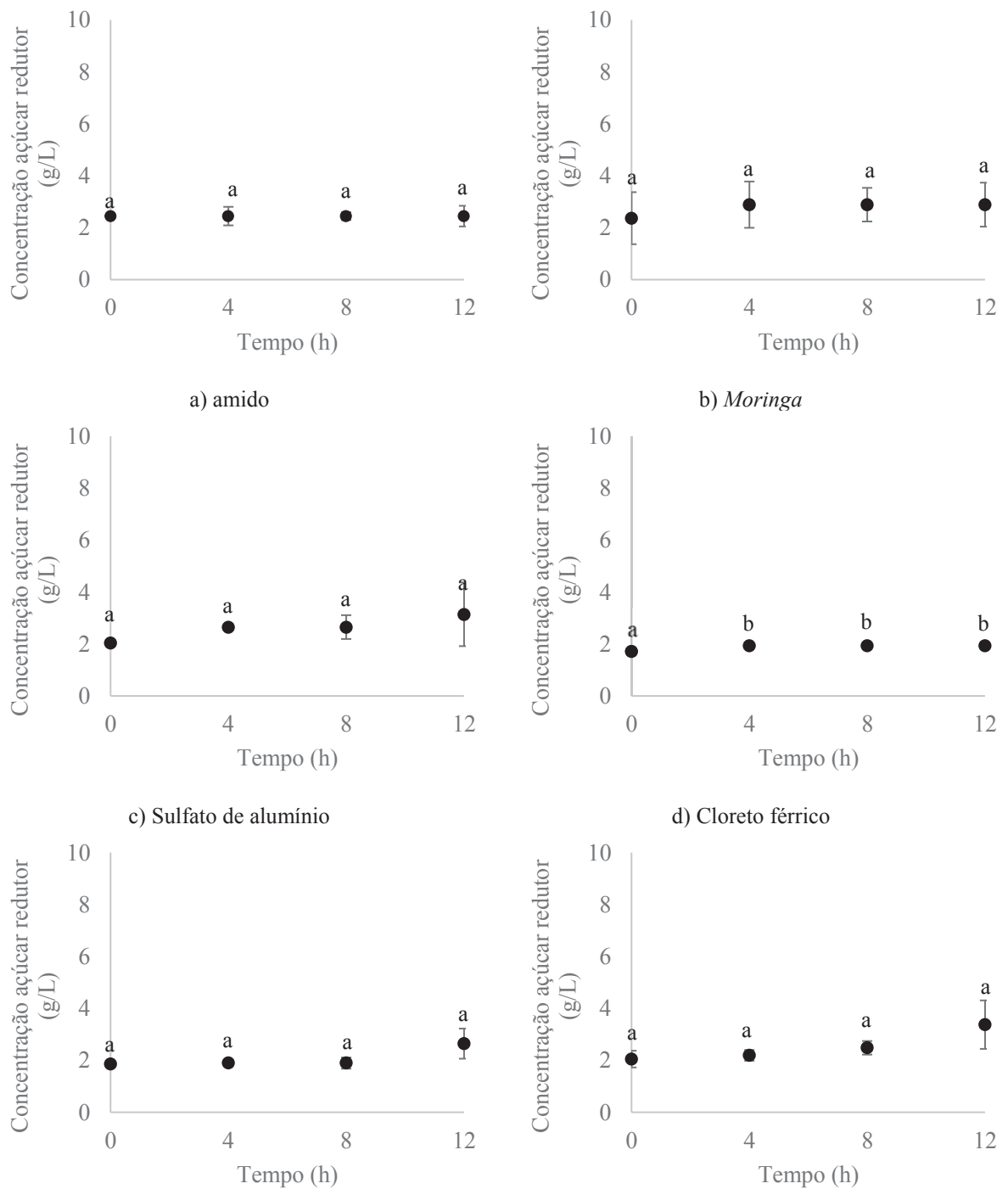
O amido, apesar de ter apresentado teor de carboidratos levemente superior aos demais, também apresentou um alto teor de cinzas. Durante os ensaios de coagulação e floculação utilizando o amido, era formada uma pasta esbranquiçada e com baixa eficiência

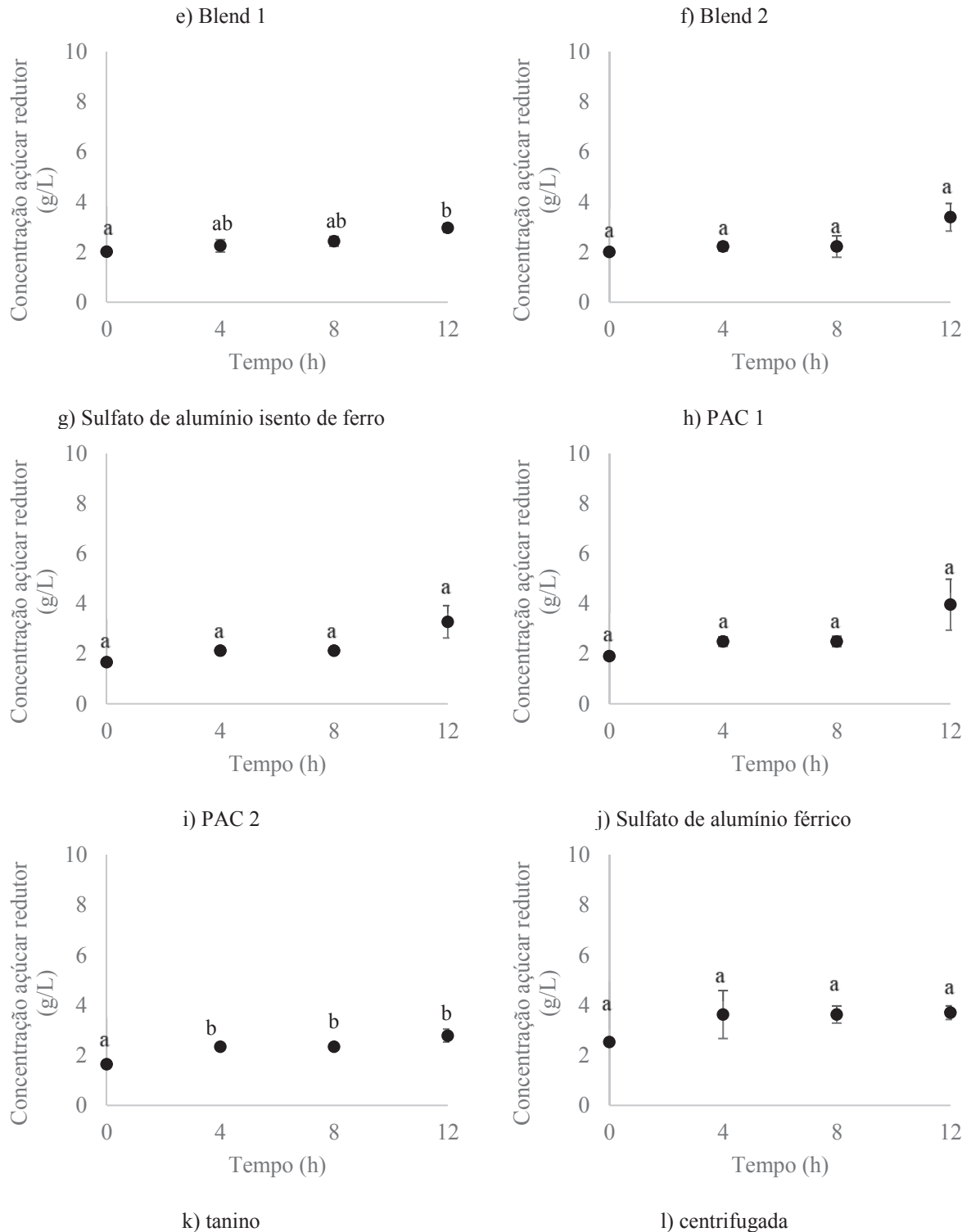
na separação das células da *Spirulina*, provavelmente acabou acumulando em maior quantidade os sais do meio.

4.4 Efeitos dos coagulantes na hidrólise enzimática de carboidratos

A Figura 14 apresenta as concentrações de açúcar redutor ao longo do tempo no processo de sacarificação, que foi monitorado por 12 horas.

Figura 14 - Açúcar redutor formado (g/L) ao longo do tempo para cada método de separação





Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre as médias dos ensaios, $p > 0,05$.

É possível observar que a biomassa proveniente de separação por amido, *Moringa*, sulfato de alumínio, blend 1, blend 2, pac 1, pac 2, sulfato de alumínio férrico e centrifugada não diferiram estatisticamente em nenhum ponto. Já o cloreto férrico, sulfato de alumínio isento de ferro e tanino apresentaram diferença estatística entre os pontos amostrados. Para

todos os ensaios, com 12 horas foram alcançadas as máximas concentrações de açúcar redutor.

Possivelmente, o alto teor de cinzas das amostras e, conseqüentemente, o baixo teor de carboidratos foram responsáveis pela baixa conversão em açúcar redutor. A quantidade de enzima utilizada não foi responsável pela baixa conversão, já que as mesmas condições (1% para cada enzima) foram utilizadas por Rempel et al. (2018) em uma biomassa com aproximadamente 56% de carboidratos, alcançando uma eficiência de hidrólise de 99%. Neste estudo a mesma concentração de enzimas foi utilizada, porém para uma concentração de substrato inferior.

Para melhor compreensão e comparação, a Tabela 9 apresenta a quantidade de açúcares redutores formados em 12 h de ensaio e a eficiência de hidrólise.

Tabela 9 - Eficiência de conversão dos carboidratos em açúcar redutor para cada coagulante (média±desvio padrão)

Amostra	Açúcar redutor formado em 12 horas de ensaio (g/L)	Eficiência (%)	Velocidade máxima de hidrólise (g/L.h)
AM	2,45±0,05	18,14±0,39 ^a	-
Mo	2,89±0,89	31,49±9,72 ^a	-
SA	3,14±1,22	40,46±15,77 ^a	0,15
CF	1,94±0,01	42,66±0,23 ^a	0,05
B1	2,64±0,58	26,73±5,86 ^a	-
B2	3,37±0,93	24,56±6,79 ^a	-
SAIFe	2,97±0,18	41,28±2,46 ^a	0,08
P1	3,39±0,55	37,01±6,02 ^a	-
P2	3,27±1,64	36,31±18,25 ^a	0,12
SAFe	3,95±1,01	37,52±9,65 ^a	-
Tanino	2,79±0,26	17,60±1,64 ^a	0,18
Centrifuga	3,70±0,27	31,38±2,31 ^a	0,10

AM: amido; Mo: *Moringa oleifera*; SA: Sulfato de Alumínio; CF: cloreto férrico; B1: Blend 1; B2: Blend 2; SAIFe: Sulfato de alumínio isento de ferro; P1: PAC 1; P2: PAC 2; SAFe: Sulfato de alumínio férrico. Letras iguais nas colunas indicam que não há diferença estatística entre as médias dos ensaios, $p > 0,05$.

Não houve diferença significativa entre os valores de eficiência de hidrólise, em função dos altos desvios padrão de alguns ensaios. Embora as amostragens tenham sido realizadas sempre pelo mesmo operador, existe um erro associado já que as suspensões de biomassa após gelatinizadas são viscosas, o que acaba colmatando o pipetador com os sólidos.

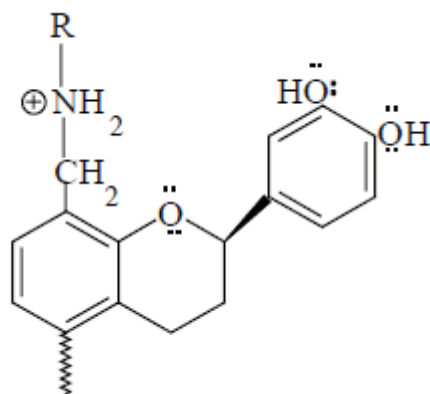
Destacam-se nas maiores eficiências e menores desvios padrão o cloreto férrico, sulfato de alumínio férrico, PAC 1 e o sulfato de alumínio isento de ferro. Deste grupo, o

sulfato de alumínio férrico apresentou eficiência satisfatória na colheita de biomassa, mesmo com dosagem inferior de 450 mg/g de biomassa, tais fatores corroboram para que se destaque dos demais.

O amido e o tanino, por apresentarem características orgânicas e os maiores teores de carboidratos, esperava-se eficiências superiores aos demais, o que não ocorreu. O amido na colheita de biomassa se mostrou um coagulante ineficiente, tornando difícil o acúmulo de *Spirulina* e acumulando em sua maior porção sais providos do meio de cultivo que aparentemente atrapalharam a ação das enzimas.

O tanino apresentou eficiência de quase 100% na colheita da biomassa, se destacando na etapa de coagulação. Esta eficiência, no entanto, não se repetiu na sacarificação, quando não alcançou 20% de eficiência. Os taninos, em geral, podem ser caracterizados como biofenóis com excelentes propriedades antioxidantes, o que pode ter causado inatividade das enzimas, como pode ser observada na Figura 15. São considerados potentes inibidores de enzimas, devido a sua complexação com proteínas enzimáticas (SHIRMOHAMMADLI, EFHAMISISI e PIZZI, 2018; REITZER et al., 2018).

Figura 15 - Estrutura química da substância ativa do tanino



Fonte: Vanacôr (2005).

A *Moringa* apresentou valores médios de eficiência de sacarificação, porém na etapa de colheita de biomassa demonstra que ainda necessita de mais estudos sobre sua preparação. A biomassa separada com auxílio de sulfato de alumínio teve eficiência de 40,46% na sacarificação, e apesar de sua alta eficiência de separação, de cerca de 98%, a alta dosagem requerida adiciona custos no processo que podem ser otimizados.

Os blends e PACs utilizados também obtiveram eficiências medianas, sendo que o blend 2 foi utilizado na separação em concentração 200 mg/g de biomassa, enquanto o blend

1, 1000 mg/g de biomassa, sendo que os coagulantes têm diferenças sutis na composição, variando apenas a proporção dos componentes. Isso pode indicar que a diferença de concentrações entre os coagulantes não foi determinante na eficiência de sacarificação, apenas a presença do coagulante e alto teor de cinzas das amostras teriam sido responsáveis pelas baixas conversões.

4.5 Efeitos dos coagulantes na hidrólise enzimática de proteínas

Os resultados provenientes da hidrólise proteica estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Grau de hidrólise proteica (%) das suspensões de *Spirulina platensis* em 4 horas de reação

Amostra	GH (%)
Amido	3,44±0,36 ^a
<i>Moringa oleifera</i>	2,45±1,24 ^a
Sulfato de alumínio	1,84±0,12 ^a
Cloreto férrico	2,01±0,12 ^a
Blend 1	2,37±0,33 ^a
Blend 2	1,26±0,87 ^a
Sulfato de alumínio isento de ferro	1,63±0,22 ^a
PAC 1	2,17±1,13 ^a
PAC 2	4,07±0,60 ^a
Sulfato de alumínio férrico	1,53±0,91 ^a
Tanino	2,95±1,37 ^a
Centrífuga	3,57±0,02 ^a

Letras iguais nas colunas indicam que não há diferença estatística entre as médias dos ensaios, $p > 0,05$.

O grau de hidrólise não diferiu estatisticamente para nenhuma das amostras hidrolisadas. Outros estudos, como o de Lisboa et al. (2014) alcançaram 52,9% de grau de hidrólise trabalhando com a *Spirulina sp.* LEB 18. O baixo grau de hidrólise obtido para todas as amostras pode ser explicado pelo alto teor de cinzas, que assim como na etapa de sacarificação enzimática (hidrólise dos polissacarídeos) podem ter dificultado a ação das enzimas.

Alguns fatores que podem ser determinantes nos rendimentos de hidrólise são o tipo de pré-tratamento realizado no substrato, concentração de enzima e substrato presente, termoestabilidade das enzimas, pH do meio e agitação (CARVALHO et al., 2013).

O baixo grau de hidrólise pode ser também justificado pela acessibilidade da protease às proteínas. O pré-tratamento do substrato aumenta a exposição das ligações peptídicas e a adsorção das enzimas à proteína, segundo Pereira (2016), o que talvez pode não ter ocorrido

neste tipo de biomassa com o pré-tratamento de congelamento e descongelamento que foi utilizado.

Quanto a termostabilidade, pH e agitação, estes foram assegurados durante o ensaio, controlando e monitorando a temperatura e agitação do ensaio e o pH através do uso do tampão bicarbonato-carbonato.

A concentração de enzima, concentração de substrato e tempo foram testados por Lisboa et al. (2014). Neste estudo, o maior grau de hidrólise foi obtido com a concentração de enzima de 10 U.mL^{-1} (maior concentração testada), 5% de substrato (menor concentração testada) e 4 horas de reação. Os autores indicam a concentração de substrato como um dos fatores que afetam a taxa inicial, causando inibição devido ao produto formado, assim, pode-se esperar competição entre o substrato original e os peptídeos que são continuamente liberados. Nas condições testadas, quando a concentração de substrato foi aumentada, a hidrólise de proteínas foi inibida.

Neste estudo, mesmo utilizando concentração inferior de substrato (2% de proteínas) e uma concentração de enzimas de 5 U.mL^{-1} , mantendo uma proporção semelhante entre enzima e substrato, mesmo tempo de reação, os resultados foram muito inferiores, destacando que a biomassa que é separada por processos de coagulação e floculação e conseqüentemente com alto teor de cinzas, demanda de estudos específicos do início do cultivo até a obtenção dos produtos.

5 CONCLUSÕES

Foi possível verificar que os coagulantes são eficientes na colheita de *Spirulina*, mas em condições restritas, já que o processo se mostrou influenciado pelo pH do meio em todos os casos. Ainda, os coagulantes naturais necessitam de mais estudos quanto a sua preparação, priorizando maiores eficiências de colheita.

A composição físico-química da biomassa foi influenciada pelo coagulante utilizado, principalmente no alto índice de cinzas que foi constatado em todas as biomassas. Esse fato acarretou por consequência em baixo teor de carboidratos, o que acabou atrapalhando o processo de sacarificação.

A presença dos coagulantes influenciou negativamente a sacarificação enzimática. O melhor coagulante foi o sulfato de alumínio férrico, apresentando eficiência de 80,27% na etapa de colheita na menor dosagem testada e estando entre as maiores eficiências de sacarificação (37,52%). Na hidrólise proteica, eficiências baixas de hidrólise das proteínas destacam que este tipo de biomassa necessita de estudos específicos desde sua separação até a obtenção dos produtos, inclusive nos métodos de ruptura celular.

O processo de coagulação e floculação tem um campo de aplicação promissor, devida à facilidade de aplicação em cultivos de grande escala e altas eficiências de remoção. No entanto, para utilização em processos biotecnológicos sugerem-se estudos para separação dos coagulantes aderidos à biomassa previamente. Ainda, o modo semi-contínuo de cultivo não foi o mais apropriado uma vez que acumula alto teor de sais, dificultando as aplicações biotecnológicas.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Desenvolver outros métodos de preparo para o amido e a *Moringa*;
- Otimizar os processos de coagulação, buscando condições com menor concentração de coagulante;
- Testar a coagulação na fase de declínio, priorizando maior acúmulo de carboidratos e menor teor de cinzas;
- Realizar os cultivos em modo batelada alimentada com Zarrouk 20%, esperando-se o esgotamento dos nutrientes do meio anterior ao processo de coagulação;
- Estudar métodos de ruptura que sejam adequados a essa biomassa.

REFERÊNCIAS

- ABDELAZIZ, A. E. M.; LEITE, G. B.; HALLENBECK, P. C. Addressing the challenges for sustainable production of algal biofuels. **Environmental technology**, v. 34. 2014.
- AHMAD, A. L.; YASIN, N. H. M.; DEREK, C. J. C.; LIM, J. K. Optimization of microalgae coagulation process using chitosan. **Chemical Engineering Journal**, v. 173, n. 3, p. 879-882. 2011a.
- AHMAD, A. L.; YASIN, N. H. M.; DEREK, C. J. C.; LIM, J. K. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.584-593, 2011b.
- ALENCAR, E. M. B.; SOUZA-MOTTA, C. M.; WALTER, B. S.; SANTOS, R. M. P.; MARQUES, O. M.; QUEIROZ, L. A. Fermentation capacity of *Saccharomyces cerevisiae* cultures. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, [s.l.], v. 52, n. 4, p.819-824, 2009.
- AOAC. Official Methods of Analysis Association. **Method 923.05**, 1995, 15 p.
- BARROS, A.; GONÇALVES, A.; SIMÕES, M.; PIRES, J. Harvesting techniques applied to microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 1489 – 1500. 2015.
- BARROS, E. V. A matriz energética mundial e a competitividade das nações: bases de uma nova geopolítica. **ENGEVISTA**, v. 9, n. 1, p. 47-56, 2007.
- BILAD, M. R.; VANDAMME, D.; FOUBERT, I.; MUYLAERT, K.; VANKELECOM, I. F. J. Harvesting microalgal biomass using submerged microfiltration membranes. **Bioresourc Technology**, v. 111, p. 343-352, 2012.
- BONGIOVANI, M. C.; KONRADT-MORAES, L. C.; BERGAMASCO, R.; LOURENÇO, B. S. S.; TAVARES, C. R. G. Os benefícios da utilização de coagulantes naturais para obtenção de água potável. **Acta Scientiarum Technology**, v. 32, n. 2, p. 167-170, 2010.
- BORGES, C. B. **Biomassa de microalgas**: separação da microalga marinha *Nannochloropsis oculata* por coagulação, floculação e flotação por ar dissolvido. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Programa de Pós Graduação em Engenharia Química da Escola de Engenharia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.
- BORGES, L.; VILLARREYES, J. A. M.; 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 and Bioenergy**, v. 35, p. 4449 – 4454. 2011.
- BRASIL. Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis nos 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências. **Casa Civil**, Brasília. 2005. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm>. Acesso em: 16 jun. 2017.

BRASIL. Lei nº 13.263, de 23 de março de 2016. Altera a Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014, para dispor sobre os percentuais de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional. **Casa Civil**, Brasília. 2016. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2015-2018/2016/Lei/L13263.htm#art1>. Acesso em: 16 jun. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 75, de 05 de março de 2015. Fixa, o percentual obrigatório de adição de etanol anidro combustível à gasolina. **Diário Oficial da União**, Brasília. 2015.

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

CAMPBELL, M.K.; FARRELL, S.O. **Bioquímica: Bioquímica básica**. São Paulo. Thomson, 5ª ed., 2007.

CANCELA, A.; MACEIRAS, R.; ALFONSI, V.; SÁNCHEZ, A. A Study on Techniques for Microalgae Separation and Lipid Extraction for *Desmodesmus subspicatus*. **International Journal Of Environmental Research**, [s.l.], v. 11, n. 3, p.387-394, 2017.

CARDOSO, A. S.; VIEIRA, G. E. G. MARQUES, A. K. O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, v. 9, n. 4, p. 542-549, 2011.

CARVALHO, M. L.; JR., R. S.; RODRÍGUEZ-ZUÑIGA, U. F.; SUAREZ, C. A. G.; RODRIGUES, D. S.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C. Kinetic study of the enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 03, p. 437- 447, 2013.

CHATSUNGNOEN, T.; CHISTI, Y. Harvesting microalgae by flocculation–sedimentation. **Algal Research**, [s.l.], v. 13, p. 271-283, 2016.

CHOUDHARY, M.; NEOGI, S. A natural coagulant protein from *Moringa oleifera*: isolation, characterization, and potential use for water treatment. **Materials Research Express**, [s.l.], v. 4, n. 10, p.105-502, 2017

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

DAMASO, M. C. T.; MACHADO, C. M. M.; RODRIGUES, D. S.; BELEM, S. G.; SALUM, T. F. C. Bioprocesses for biofuels: an overview of the Brazilian case. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, n. 6, p. 1-8, 2014.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. São Paulo: editora Artmed, 2010.

- DELRUE, F.; IMBERT, Y.; FLEURY, G.; PELTIER, G.; SASSI, J. Using coagulation–flocculation to harvest *Chlamydomonas reinhardtii*: Coagulant and flocculant efficiencies, and reuse of the liquid phase as growth medium. **Algal Research**, [s.l.], v. 9, p.283-290, 2015.
- DEMIRBAS, A.; Use of algae as biofuel sources. **Energy Conversion and Management**, v. 51, p. 2738-2749, 2010.
- DIVAKARAN, R.; PILLAI, V. N. S. Flocculation of algae using chitosan. **Journal of Applied Phycology**, v. 14, n. 5, p. 419-422, 2002.
- DUBOIS, M.; GILLES. K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; MITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.
- ESCOBAR, J. C.; LORA, E. S.; VENTURINI, O. J.; YÁÑEZ, E. E.; CASTILLO, E. F.; ALMAZAN, O. Biofuels: Environment, technology and food security. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 13, n. 6-7, p.1275-1287, 2009.
- FAROOQ, W.; MOON, M.; RYU, B.; SUH, W.; SHRIVASTAV, A.; PARK, M. S.; MISHRA, S. K.; YANG, J. Effect of harvesting methods on the reusability of water for cultivation of *Chlorella vulgaris*, its lipid productivity and biodiesel quality. **Algal Research**, [s.l.], v. 8, p.1-7, 2015.
- FONTOURA, J. T. **Crescimento de microalgas em efluente de curtume: remoção de nutrientes, viabilidade de produção de biocombustíveis e utilização da biomassa residual**. 2017. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.
- FRANCO, A.; LÔBO, I.; CRUZ, R. Biodiesel de Microalgas: Avanços e Desafios. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 437-448. 2013.
- GERDE, J. A.; YAO, L.; LIO, J. Y.; WEN, Z.; WANG, T. Microalgae flocculation: Impact of flocculant type, algae species and cell concentration. **Algal Research**, v.3, p. 30-35, 2014.
- GNANSOUNOU, E.; RAMAN, J. K. Life cycle assessment of algae biodiesel and its co-products. **Applied Energy**, [s.l.], v. 161, p.300-308, 2016.
- GÓMEZ, L. Microalgas: aspectos ecológicos y biotecnológicos. **Revista Cubana de Química**, v. 19, n 2, p. 3-20, 2007.
- GOUVEIA, J. M. V. **Viabilidade do biodiesel de microalgas: otimização de técnicas de extração**. 2015. Dissertação (Mestrado em Sistemas Energéticos Sustentáveis) – Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro, 2015.
- GRAHAM, N.; GANG, F.; FOWLER, G.; WATTS, M. Characterization and coagulation performance of a tannin-based cationic polymer: A preliminary assessment. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 327, p. 9-16, 2008.

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

GUTIÉRREZ, R.; PASSOS, F.; FERRER, I.; UGGETTI, E.; GARCIA, J. Harvesting microalgae from wastewater treatment systems with natural flocculants: Effect on biomass settling and biogas production. **Algal Research**, [s.l.], v. 9, p.204-211, 2015.

HABIB, M. A. B.; PARVIN, M.; HUNTINGTON, T. C; HASAN, M. R. A review on culture, production and use of Spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish. **FAO Fisheries and Aquaculture Circular**. N° 1034. Roma, FAO. 33 p. 2008.

HANOTU, J.; BANDULASENA, H. H.; ZIMMERMAN, W. B. Microflotation performance for algal separation. **Biotechnology And Bioengineering**, [s.l.], v. 109, n. 7, p.1663-1673, 2012.

HARUN, R.; SINGH, M.; FORDE, G. M.; DANQUAH, M. K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 85, p. 199-203. 2010.

HARUN, R.; DANQUAH, M.K. Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 304 – 309. 2011.

HAUWA, A.; MOHAMED, R. M. S. R.; AL-GHEETHI, A. A.; WUROCHEKKE, A. A.; HASHIM, M. K. A. Harvesting of *Botryococcus sp.* Biomass from Greywater by Natural Coagulants. **Waste And Biomass Valorization**, 2017.

HENDERSON, R. K.; PARSONS, S. A.; JEFFERSON, B.. Successful Removal of Algae through the Control of Zeta Potential. **Separation Science And Technology**, [s.l.], v. 43, n. 7, p.1653-1666, 2008.

HOYLE, N., MERRITT, J. H. Quality of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, v. 59, p. 76–79, 1994.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3ª ed. V. 1. São Paulo, 1985.

JESUS, G. L. **Avaliação do processo combinado de coagulação e osmose direta para a concentração de biomassa algal**. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Escola de Engenharia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

JOHN, R. P.; ANISHA, G. S.; NAMPOOTHIRI, K. M.; PANDEY, A. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 186-193, 2011.

JUÁREZ, A. A.; ARAÚJO, A. M.; ROHATGI, J. S.; OLIVEIRA, O. D. Q. Development of the wind power in Brazil: Political, social and technical issues. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 39, p.828-834, 2014.

- KAPSE, G.; PATOLIYA, P.; SAMADDER, S. R.. Characterisation of coal washery effluent and optimisation of coagulation behaviour of *Moringa oleifera* seed as a coagulant. **Environmental Monitoring And Assessment**, [s.l.], v. 189, n. 3, p.1-12, 2017.
- KIM, D. Y., LEE, K., LEE, J., LEE, Y. H., HAN, J. I., PARK, J. Y., OH, Y. K. Acidified flocculation process for harvesting of microalgae: coagulant reutilization and metal-free-microalgae recovery. **Bioresource Technology**, v. 239, p. 190-196. 2017.
- KNUCKEY, R. M.; BROWN, M. R.; ROBERT, R.; FRAMPTON, D. M. F. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. **Aquacultural Engineering**, v. 35, n. 3, p. 300-313. 2006.
- KONIG, R. B.; SALES, R.; ROSELET, F.; ABREU, P. C. Harvesting of the marine microalga *Conticribra weissflogii* (Bacillariophyceae) by cationic polymeric flocculants. **Biomass and Bioenergy**, v. 68, p. 1 – 6. 2014.
- KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. **Journal of Functional Foods**, v. 1, p. 177-187, 2009.
- KWAK, D. H.; KIM, S. J.; JUNG, H.; J. KWON, S. B.; AHN, H.W.; LEE, J. W. Removal of clay and blue-green algae particles through zeta potential and particle size distribution in the dissolved air flotation process. **Water Supply**, v. 6, n. 1, p. 95-103, 2006.
- LAAMANEN, C. A.; ROSS, G. M.; SCOTT, J. A. Flotation harvesting of microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 75 – 86, 2016.
- LAMA, S.; MUYLAERT, K.; KARKI, T. B.; FOUBERT, I.; HENDERSON, R. K.; VANDAMME, D. Flocculation properties of several microalgae and a cyanobacterium species during ferric chloride, chitosan and alkaline flocculation. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 220, p.464-470, 2016.
- LAURENS, L. M. L.; DEMPSTER, T. A.; JONES, H. D. T.; WOLFRUM, E. J.; VAN WYCHEN, S.; MCALLISTER, J. S. P.; RENCENBERGER, M.; PARCHERT, K. J.; GLOE, L. M. Algal Biomass Constituent Analysis: Method Uncertainties and Investigation of the Underlying Measuring Chemistries. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 84, n. 4, p.1879-1887, 2012.
- LEE, A. K.; LEWIS, D. M.; ASHMAN, P. J. Harvesting of marine microalgae by electroflocculation: The energetics, plant design, and economics. **Applied Energy**, v. 108, p. 45 – 53. 2013.
- LEITÃO, P. F. C. **Utilização de tecnologias low cost para a produção, colheita e secagem de biomassa microalgal**: comparação com as tecnologias convencionais. 2015. Dissertação (Mestrado) – Mestrado Integrado em Engenharia da Energia e do Ambiente, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2015.
- LETTERMAN, R. D.; AMIRTHARAJAH, A.; O'MELIA, C. R. Coagulation and Flocculation. In: **Water Quality and Treatment**. 1999.

LISBOA, C. R.; PEREIRA, A. M.; FERREIRA, S. P. COSTA, J. A. V. Utilisation Of Spirulina sp. And Chlorellapyrenoidosa Biomass For The Production of Enzymatic Protein Hydrolysates. **International Journal of Engineering Research and Applications**, v. 4, n.5, p. 29-38, 2014.

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

LOURES, C. C. A. **Otimização do processo de cultivo da microalga *Chlorella minutissima* como fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel**. 2016. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá da Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2016.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenil reagent. **J. Biol. Chem.**, n. 193, p. 265-275, 1951.

MAGRO, F. G. **Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em raceways para a obtenção de matéria-prima para produção de bioetanol**. 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental da Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2016.

MAGRO, F. G.; MARGARITES, A. C.; REINEHR, C. O.; GONÇALVES, G. C.; RODIGHERI, G.; COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M. Spirulina platensis biomass composition is influenced by the light availability and harvest phase in raceway ponds. **Environmental Technology**, v. 39, n. 14, p.1868-1877, 2017.

MARKOU, G.; ANGELIDAKI, I.; GEORGAKAKIS, D. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 631-645. 2012.

MATA, T. M; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2010.

MILLER, G.L. Use of de dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MIRANDA, J. R. P. C. **Produção de Bioetanol a Partir da Microalga *Scenedesmus obliquus***. 2011. Dissertação (Mestrado em Energia e Bioenergia) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2011.

MIRANDA, J. R.; PASSARINHO, P. C; GOUVEIA, L. Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 342 – 348. 2012.

MOHAMED, R. M. S. R.; MANIAM, H.; APANDI, N.; AL-GHEETHI, A. A. S.; KASSIM, A. H. M. Microalgae Biomass Recovery Grown in Wet Market Wastewater via Flocculation Method Using *Moringa oleifera*. **Key Engineering Materials**, [s.l.], v. 744, p.542-545, 2017.

- MORUZZI, R. B.; NAKADA, L. Y. K. Coleta e tratamento de água pluvial para fins não potáveis com emprego de amigo de milho como coagulante primário em filtração cíclica em escala de laboratório. **Revista de estudos ambientais**, v.11, n. 1, p. 51-60, 2009.
- MOTTA, V. T.; **Bioquímica**. São Paulo: MedBook, 2011.
- MURAKAMI, M. F.; MORUZZI, R. B. Avaliação do amigo natural como alternativa simples para tratamento de águas pluviais para fins de aproveitamento não potável. **Teoria e Prática na Engenharia Civil**, n. 20, p. 1-13, 2012.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. São Paulo. Artmed, 5ª Ed., 2011.
- NIGAM, P.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, n. 1, p. 52-68. 2011.
- NUNES, J. A. **Tratamento Físico-Químico de Águas Residuárias Industriais**. Aracaju: Gráfica Editora J. Andrade Ltda. 4 ed. 2004.
- PAPAZI, A.; MAKRIDIS, P.; DIVANACH, P. Harvesting *Chlorella minutissima* using cell coagulants. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, n. 3, p. 349-355. 2010.
- PAVANELLI, G. **Eficiência de diferentes tipos de coagulantes na coagulação, floculação e sedimentação de água com cor ou turbidez elevada**. 2001. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.
- PEREIRA, A. M. **Obtenção de concentrado, isolado e hidrolisado proteico a partir de biomassa de Spirulina**. 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2016.
- PETERSON, G. Review of the Folin Phenol Protein Quantitation Method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. **Analytical Biochemistry**, v. 100, p 201-220, 1979.
- POURZOLFAGHAR, H.; ABNISA, F.; DAUD, W. M. A. W.; AROUA, M. K. A review of the enzymatic hydroesterification process for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 61, p. 245-257, 2016.
- RAMALHO, F. M. P. **Avaliação Ambiental do uso de Microalgas na Produção de Biodiesel**: Revisão Bibliográfica Sistemática. 2013. Dissertação (Mestrado em Energia e Bioenergia) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2013.
- RAWAT, I.; KUMAR, R. R.; MUTANDA, T.; BUX, F. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. **Applied Energy**, [s.l.], v. 103, p.444-467, 2013.
- REBELO, R. **Produção de Biodiesel a partir de Microalgas**. Revisão Bibliográfica e Contribuição para a sua Produção em Portugal. 2014. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Engenharia do Ambiente. Universidade Nova de Lisboa, 2014.

- REGULY, J. C. **Biotecnologia dos processos fermentativos: Fundamentos, matérias-primas agrícolas, produtos e processos**. Pelotas: Editora Universitária UFPel, v. 1, 1996.
- REITZER, F.; ALLAIS, M.; BALL, V.; MEYER, F. Polyphenols at interfaces. **Advances In Colloid And Interface Science**, [s.l.], v. 257, p.31-41, 2018.
- REMPEL, A.; MACHADO, T.; TREICHEL, H.; COLLA, E.; MARGARITES, A. C.; COLLA, L. M. Saccharification of *Spirulina platensis* biomass using free and immobilized amyolytic enzymes. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 263, p.163-171, 2018.
- RENAULT, F.; SANCEY, B.; BADOT, P. M.; CRINI, G. Chitosan for coagulation/flocculation processes: An eco-friendly approach. **European Polymer Journal**, v. 45, p. 1337-1348, 2009.
- RENEWABLE ENERGY POLICY NETWORK FOR THE 21st CENTURY (REN21). 2018. Disponível em: < <http://www.ren21.net/>>. Acesso em: 20 fev. 2018.
- RENEWABLE FUELS ASSOCIATION (RFA). 2016. Disponível em: < <http://www.ethanolrfa.org/>>. Acesso em 20 set. 2017.
- ROSELET, F.; BURKERT, J.; ABREU, P. C. Flocculation of *Nannochloropsis oculata* using a tannin-based polymer: Bench scale optimization and pilot scale reproducibility. **Biomass And Bioenergy**, [s.l.], v. 87, p.55-60, 2016.
- SALLA, A.C.V., MARGARITES, A.C., SEIBEL, F.I., HOLZ, L.C., BRIÃO, V.B., BERTOLIN, T.E., COLLA, L.M., COSTA, J.A.V. Increase in the carbohydrate content of the microalgae *Spirulina* in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate. **Bioresource Technology**, v. 209, p. 180-186, 2016.
- SAMARAKOON, Y., JEON, J. Bio-functionalities of proteins derived from marine algae - A review. **Food Research International**, v. 48 p. 948–960, 2012.
- SANTOS, M. **Novas tecnologias de colheita de microalgas para a produção de biodiesel**. 2013. Dissertação (Mestrado) - Programa de Mestrado Integrado em Engenharia de Energia e do Ambiente, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2013.
- SCHLESINGER, A.; EISENSTADT, D.; BAR-GILL, A.; CARMELY, H.; EINBINDER, S.; GRESSEL, J. Inexpensive non-toxic flocculation of microalgae contradicts theories; overcoming a major hurdle to bulk algal production. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 30, n. 5, p.1023-1030, 2012.
- SHIRMOHAMMADLI, Y.; EFHAMISISI, D.; PIZZI, A. Tannins as a sustainable raw material for green chemistry: A review. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v. 126, p. 316-332, 2018.
- SHOW, K.; LEE, D. Algal Biomass Harvesting. **Biofuels from Algae**, p. 85-110, 2014.
- SILVA, C. P. **Peptídeos bioativos da microalga *Spirulina* e sua aplicação em um alimento extrusado tipo snack**. 2017. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em

Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2017.

SINGH, J.; GU, S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 2596-2619, 2010.

SOUZA, M. P.; BJERK, T. R.; GRESSLER, P. D.; SCHNEIDER, R. C. S.; CORBELLINI, V. A.; MORAES, M. S. A. As microalgas como uma alternativa para a produção de biocombustíveis, parte I: Bioetanol. **TECNO-LÓGICA**, v. 16, n. 2, p. 108-116, 2012.

TEMPLETON, D. W.; QUINN, M.; VAN WYCHEN, S.; HYMAN, D.; LAURENS, L. M. L. Separation and quantification of microalgal carbohydrates. **Journal Of Chromatography A**, v. 1270, p.225-234, 2012.

TRAN, D. T., LE, B. H., LEE, D. J., CHEN, C. L., WANG, H. Y., CHANG, J. S. Microalgae harvesting and subsequent biodiesel conversion, **Bioresource Technology**, v. 140, p. 179-186, 2013.

UDUMAN, N.; QI, Y.; DANQUAH, M. K.; FORDE, G. M.; HOADLEY, A. Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. **Journal of Renewable and Sustainable Energy**, v. 2, 2010.

VANDAMME, D.; POHL, P. I.; FOUBERT, I.; BRADY, P. V.; HEWSON, J. C.; MUYLAERT, K. Alkaline flocculation of *Phaeodactylum tricornutum* induced by brucite and calcite. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 196, p.656-661, 2015.

VENDRUSCOLO, L. P. **Cultivo de microalgas com efluente de maltaria para obtenção de biocombustíveis**. 2016. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2016.

VIEIRA, M. C.; LELIS, R. C. C.; RODRIGUES, N. D. Propriedades químicas de extratos tânicos da casca de *Pinus oocarpa* e avaliação de seu emprego como adesivo. **CERNE**, v. 20, n. 1, p. 47 – 54, 2014.

WAN, C.; ALAM, M. A.; ZHAO, X.; ZHANG, X.; GUO, S.; HO, S.; CHANG, J.; BAI, F. Current progress and future prospect of microalgal biomass harvest using various flocculation technologies. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 184, p.251-257, 2015.

WANG, B.; LAN, C. Q.; HORSMAN, M. Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 4, 2012.

WANG, J.; YUAN, S.; WANG, Y.; YU, H. Synthesis, characterization and application of a novel starch-based flocculant with high flocculation and dewatering properties. **Water Research**, v. 47, p. 2643-2648, 2013.

WILEY, P. E.; BRENNEMAN, K. J.; JACOBSON, A. E. Improved microalgal harvesting using suspended air flotation. **Water Environment Research**, v. 81, p. 702-708, 2009.

WYATT, N. B.; GLOE, L. M.; BRADY, P. V.; HEWSON, J. C.; GRILLET, A. M.; HANKINS, M. G.; POHL, P. I. Critical conditions for ferric chloride-induced flocculation of freshwater algae. **Biotechnology And Bioengineering**, [s.l.], v. 109, n. 2, p.493-501, 2011.

XIA, L.; HUANG, R.; SONG, S. Effective harvesting of microalgae by coagulation–flotation. **Royal Society Open Science**, [s.l.], v. 4, n. 11, p.1-12, 2017.

YUNOS, F. H. M.; NASIR, N. M.; JUSOH, H. H. W.; KHATOON, H.; LAM, S. S.; JUSOH, A. Harvesting of microalgae (*Chlorella sp*) from aquaculture bioflocs using an environmental-friendly chitosan-based bio-coagulant. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [s.l.], v. 124, p.243-249, 2017.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une cyanophycée**: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima*. 1966. Tese (Ph.D), Universidade de Paris, Paris, 1966.

ZHANG, X.; HEWSON, J. C.; AMENDOLA, P.; REYNOSO, M.; SOMMERFELD, M.; CHEN, Y.; HU, Q. Critical evaluation and modeling of microalgal harvesting using dissolved air flotation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, p. 2477-2485, 2014.

ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 2, p. 51-68, 2009.