

# O DUELO SOJA *versus* MICRO-ALGAS no BIODIESEL BRASILEIRO e INTERNACIONAL

**José Domingos Fontana**

Professor emérito da UFPR (2005),  
pesquisador DTEI do CNPq e 11º Prêmio  
Paranaense em C&T (1996).

[jfontana@ufpr.br](mailto:jfontana@ufpr.br)

## 1. Introdução

Cabe inicialmente resgatar três posições expressas em “BiodieselBR Revista”, ano 4, nº. 20, de dez/2010-jan/2011. De Frederico Durães (EMBRAPA): *“Não temos como criar conhecimento, domínio tecnológico e logística semelhantes à da soja em cinco ou dez anos. Não temos como tirar isto da cartola (comparando a soja e micro-algas enquanto fontes oleaginosas)”*. De João Norberto Noschang Neto (PETROBRAS Biocombustíveis) : *“Podemos dizer seis anos, para uma perspectiva otimista, e dez, para uma negativa (analisando resultados práticos com algas)*. Do Prof. Paulo Suarez (IQ-UnB): *“Foi-me impossível conseguir (alguns litros) óleo de microalga para ensaios laboratoriais, salvo uma promessa”*. Diferentes dizeres, mesmo e preciso diagnóstico. Aliás, o último autor, em forma concisa mas não menos eloquente, resgata as 3 maiores vantagens dos biocombustíveis de micro-algas (a alta produtividade, o ciclo curtíssimo de produção e a não competição com os grãos alimentícios), cotejando também os aspectos restritivos da dificuldade de colheita e extração, além do pouco conhecimento da qualidade combustível (alta insaturação e teor elevado de acidez).

O parque fabril biodieselizador brasileiro tem repousado em 78% de óleo de soja para sua notável produção de > 2 bilhões de litros / 2010 (Odacir Klein, UBRABIO – União dos Produtores de Biodiesel, “Dinheiro Rural”, Ed. 75, Ano 7, Jan/2011). Situação similar tem ocorrido na indústria de biodiesel dos USA por conta da forte articulação do duo ASA – American Soybean Association e NBB – National Biodiesel Board. Tem havido muitos apelos acadêmicos nacionais em prol do dendê e pinhão-mansão (defendidos, por ex., pelo especialista em óleoquímica de biocombustíveis, Prof. Donato Aranda, da UFRJ e pelo assessor da Presidência República para Assuntos Estratégicos, Eng. Agr. Décio Gazzoni), mas a 2ª. fonte em volume, segue sendo, ainda que modestamente (< 16%), o sebo bovino, mais à distância seguido por 3% com caroço de algodão”. Logo, há muito espaço para o duelo (futuro) entre a soja e as micro-algas e as vertentes de consideração são bastante variadas. O tema é candente, a discussão progressiva em bases científicas se impõe e esta é a intenção desta revisão, então inevitavelmente longa e permeada de considerações de cunho argumentativo.

As (micro)algas constituem um ramo industrial já bem definido no que toca às suas aplicações não-combustíveis [1]. A lista vai de biopolímeros (alginatos, ágar, carragenanas) / bioplásticos, alimentação (ração) humana e animal, produtos farmacêuticos (cosméticos, nutracêuticos) até o controle da poluição (sequestro de CO<sub>2</sub>, urânio, plutônio; tratamento de águas servidas). Como um exemplo isolado, somente na exploração de carotenóides (nutracêuticos anti-oxidantes e combatedores de radicais livres pró-envelhecimento), segundo

a BBC Research, os subtipos astaxantina e cantaxantina (amplamente empregados na aquicultura de espécies laranja-avermelhadas como a lagosta, camarão e salmão) o porte de mercado (2007) de, respectivamente, US\$ 220 e 110 milhões, elevar-se-á para (2015) US\$ 252 e 117 milhões. São mercadorias na base de US\$ 2.000 / kg. Como o biodiesel e/ou um neo-diesel de micro-algas tem valor agregado muito mais baixo (US\$ 1.00 – 2.00 / kg) , esta nova fatia de mercado somente pode se impor pelo volume de fabricação, qualidade combustível inquestionável e preço competitivo com os derivados de petróleo. Ou seja, adoção de uma mudança cultural profunda no que tange às matrizes energéticas combustíveis.

Mas o horizonte científico-tecnológico é animador para os biocombustíveis de micro-algas. De acordo com o “Oilgae Comprehensive Report / 2010” o número de empresas diretamente envolvidas nos USA na produção de biocombustíveis de algas saltou de 1 (2001) para > 200 (meados de 2010). Em paralelo > 40 Universidades (a maioria nos USA como o MIT - Massachusetts Institute of Technology ) conduzem pesquisas em ritmo intenso no mesmo tema. Grandes companhias de investimento (e.g., Arch Venture Partners, Blue Crest, Access Private Equity) tem direcionado seus recursos financiando empresas novatas em (micro)algas (Sapphire Energy, Solazyme, GreenFuel Technologies). Apareceram como indicadores progressos da vitalidade do novo setor [2] : a) os dois primeiros veículos automotores de passeio abastecidos com uma B-20 à base de biodiesel de microalga (produzidos pela Solazyme) rodaram no “2008 Sundance Film Festival” abrilhantando o documentário “Fields of Fuel”, de JoshTickell, um dos patronos do biodiesel nos USA; 21.Jan.2008; b) A PetroSun iniciou a operação da 1ª. planta de biodiesel de microalgas do mundo, em 1º.abril.2008, localizada em Rio Hondo (sudeste do Texas, USA), a qual se estende por 445 ha (16,6 milhões de litros de óleo de alga / ano), sendo que 5% da área está reservada para a produção de um novo combustível para jatos (JP8); c) aprovado num teste B-100 em uma camioneta Ford F-450, o biodiesel de micro-algas da Solazyme, com propriedades superiores de desempenho a frio, foi aprovado para testes e uso na Marinha dos USA em motores pesados do ciclo Diesel; 17.Abr.2008.

Em vista dos questionamentos levantados por algumas autoridades na questão controversa do desvio de plantas superiores oleaginosas alimentícias (e.g., soja) para fins biocombustíveis (biodiesel) como o caso de Jacques Diouf, Diretor-General da Food Agriculture Organization of the United Nations (FAO / ONU) \* e do Prof. Francelino J.L.M. Grando, ecologista da UFSCar – Universidade Federal de São Carlos, então Secretário de Política de Informática e Tecnologia do MCT – Ministério da Ciência e Tecnologia (2003) \*\*, cabe lembrar o apelo mais consistente do cultivo de micro-algas para fins biocombustíveis : elas não competem com a agricultura tradicional fornecedora de alimentos humanos e animais, pois não há demanda de terras férteis e/ou aráveis.

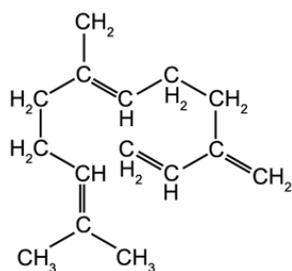
(\*) *“Ninguém compreende como 11 a 12 bilhões de US\$ em subsídios de 2006 e a edição de políticas de proteção tarifária têm tido o efeito de desviar 100 milhões de toneladas de cereais do consumo humano, a maioria para satisfazer a sede de combustível veicular”* (Reunião da FAO, em Roma, Junho de 2008).

(\*\*): *“Há um risco sério de que um programa de biodiesel, mal estruturado, possa implicar em “canibalização da soja”.*

## **2. OUTRAS TECNOLOGIAS ENERGÉTICAS COMPETITIVAS DE ÚLTIMA GERAÇÃO**

Antes da abordagem propriamente dita do “duelo soja versus micro-algas” convém descortinar alguns exemplos das (bio)tecnologias em emergência que geram competitividade alternativa às micro-algas (e mesmo à soja) por conta de seu ousado nível de inovação. A companhia LS9, clonando genes estratégicos de cianobactérias (antes algas azul-esverdeadas) na bactéria *E. coli*, desenvolveu inicialmente uma biotecnologia pioneira de conversão direta de açúcares de biomassa em alcanos, componentes nobres da gasolina, diesel e querosene de aviação. A tecnologia fermentativa dispensa etapas caras como a destilação e hidrogenação e o produto, secretado pela bactéria, por uma questão de menor densidade, flutua e pode ser facilmente recolhido. Como soe acontecer, a LS9, fechou estratégicas parcerias com gigantes como a Chevron e Procter & Gamble [3]. Segundo informação pessoal que nos foi prestada por Jon Ballesteros, Diretor de Assuntos Externos da LS9, um dos outros produtos do arrojado *portfólio* da companhia é o “Ultra Clean Diesel”, um éster metílico que preenche todas as especificações da D-6751 (USA) e da ANP-7 (Brasil). Segundo Décio Gazzoni, assessor da SAE – Secretaria de Assuntos Estratégicos da Presidência da República, foi a capacidade inovadora da jovem LS9 que lhe garantiu o cobiçado prêmio “Presidential Green Chemistry Challenge Award / 2010” do Governo dos Estados Unidos, concessão coordenada pela EPA - Environmental Protection Agency em favor do “Renewable Petroleum-<sup>TM</sup>”. Segundo a LS9, este particular produto, provê na combustão, uma redução de 85% nos componentes poluentes quando comparado ao óleo diesel.

A Amyris Biotechnologies, de Emeryville, California (USA) desenvolveu uma levedura geneticamente modificada capaz de converter açúcares livres de biomassa (sacarose do caldo de cana; glucose de celulose de bagaço de cana) em sesquiterpenos estratégicos como o *-trans*-farneseno e seus isômeros (uma molécula relativamente bem hidrogenada e então facilmente combustível): [4]



A idéia seguinte é converter o farneseno em algum tipo de diesel (e.g., farnesano, mais rico em hidrogênio, através de hidrogenação) além de detergentes, cosméticos, perfumes e lubrificantes. A Amyris já opera uma planta piloto em Emeryville (USA) e uma planta maior, de demonstração, em Campinas-SP. Há também uma parceria já estabelecida com a gigante sucro-alcooleira São Martinho de Pradópolis-SP para uma planta comercial com investimentos de R\$ 100 milhões e operável em 2012 que poderá consumir cerca de 2 milhões de toneladas de açúcar / ano.

Através da energia da eletricidade de plasma, Albin Czernichowski, da Universidade de Orleans, França, por ocasião do 239º. encontro da ACS- American Chemical Society, em São Francisco, California, USA anunciou uma nova tecnologia para a produção de um tipo de

*neo-diesel* menos poluente a partir de glicerina bruta e resíduos agrícolas, pois a composição média é de 50% alcanos lineares e 48% de monociclo-alcanos saturados, ausentes os hidrocarbonetos policíclicos (uma das desqualificações do óleo diesel). O custo do equipamento é mínimo (US\$ 10,000). Em pauta também uma nova variante do processo Fischer-Tropsch com um catalisador à base de ferro para a conversão de gás de síntese (H<sub>2</sub>, CO) em hidrocarbonetos líquidos. [5]

Na mesma linha, a empresa NGBF depositou patente em conversão de glicerina em outro *neo-diesel* menos poluente, de baixo ponto de escoamento e baixa viscosidade [6].

Quanto a diversificação crescente na direção de *neo-biocombustíveis*, o biobutanol surge como o mais novo concorrente, através da Cobalt Technologies e da Gevo (Califórnia; resíduos agrícolas), além da Butamax (UK; milho e sacarose de cana de açúcar) e do consórcio DuPont / Bio Architecture Lab (carboidratos poliméricos de algas) [7]. Um ciclo auxiliar é biobutanol -> buteno -> oligomerização até análogos de querosene de aviação e diesel ou mais simplesmente, a adição de um isômero, isobutanol, à gasolina como aditivo alternativo ao etanol.

No que tange à tecnologia de exploração mais convencional de (micro)algas para biodiesel ASTM-especificado um exemplo é Aurora Algae Inc. de Alameda, Califórnia, USA e o segredo de seu sucesso repousa numa parceria estratégica com University of California @ Bekerley onde uma micro-alga foi geneticamente modificada a fim de propiciar teores mais elevados de lipídeos e um resíduo carboidrato-proteico apropriado à alimentação animal.

Em favor da soja surgiu outra inovação tecnológica que tende a alcançar intensa repercussão nos transportes metropolitanos e não urbanos qual seja o desenvolvimento de um selante para asfalto, baseado em 88% da oleaginosa mas cuja composição, obviamente, não é divulgada (ainda) pela empresa produtora em função da proteção da propriedade intelectual submetida a patenteamento. A empresa produtora, BioSpan Technologies, Inc. argumenta que a aplicação do produto (RePLAY) sobre a camada de asfalto, o que atinge até cerca de 2,5 cm de profundidade, permite alongar a vida útil do asfalto e o produto tem um tempo de cura rápido (15 a 30 min) e não altera a resistência do piso asfáltico para derrapagem (<http://www.biobasednews.com/node/28262>; acesso em 12.Jan.2011).

### **3. VANTAGENS E DESVANTAGENS DAS MICRO-ALGAS COMO FONTES DE BIOCOMBUSTÍVEIS**

As vantagens em favor das micro-algas são numerosas, a começar pela produtividade média : soja = 450 litros de óleo / hectare / ano e micro-algas = 17.300 (média de hidrofazendas fluviais ou marinhas em fase industrial). O difícil é traduzi-las em efeitos com resultados práticos, mesmo confinando a discussão comparativa apenas à micro-algas marinhas, em média mais produtivas para o fim de acumulação de lipídeos (TAGs – triacilgliceróis ou triglicerídeos e/ou hidrocarbonetos). As tecnologias devem ser necessariamente integradas ou seja, uma micro-alga de eleição deve facultar o aproveitamento idealizado de toda sua biomassa : lipídeos para biocombustíveis, carboidratos poliméricos hidrolizáveis para fins fermentativos como o (bio)etanol e/ou (bio)butanol e proteína residual nutritiva e altamente digestível para fins de ração humana e/ou animal (tal

qual a soja provendo o óleo e torta\* / farelo\*\*)

(\*) Torta = resíduo protéico “gordo” (40% do óleo original) do grão de soja após retirada de ca. 60% do óleo por extrusão (prensagem expeller) com a concomitante desnaturação das proteínas enzimáticas e alguns inibidores; mais recomendada para ruminantes (animais poligástricos). (\*\*) Farelo = resíduo protéico “magro” do grão (pré-prensado ou não) após extração com organossolvente a quente (hexano), portanto com apenas 2% de óleo residual, mais destinado à alimentação de animais não ruminantes (monogástricos).

Muitos gêneros e espécies de micro-organismos são soberbamente superiores à soja na acumulação de lipídeos para fins energéticos. Alguns exemplos constam da Tabela 1.

Tabela 1 – CONTEÚDO LIPÍDICO, PROTÉICO E GLICÍDICO DAS DIVERSAS FONTES OLEAGINOSAS [8]			
Fonte oleaginosa	Lipídeos %	Proteínas %	Carboidratos sol. e insolúveis %
<b>(plantas superiores)</b>			
soja	18 - 21	36 - 40	31 - 36
<b>(micro-algas)</b>			
<i>Botryococcus braunii</i>	25 - 75	18 - 23	15 - 19
<i>Chlorella vulgaris</i>	40 - 60	51 - 58	12 - 26
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31 - 68	35	8
<i>Nitzia</i> sp.	45 - 47	26	10
<i>Isochrysis</i> sp.	23 - 33	20 - 23	13
<i>Nannochloris</i> sp.	20 - 35	---	---
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35 - 54	---	---
<i>Schizochytrium</i> sp.	50 - 77	---	---
<i>Spirulina máxima</i> (macro)*	6 - 8	60 - 70	15 - 25
<b>(bactérias)</b>			
<i>Arthrobacter</i> sp.	> 40	---	50 - 70%
<b>(leveduras)</b>			
<i>Candida curvata</i>	58 <sup>@</sup>	66 <sup>#</sup>	41-46 <sup>@</sup>
<b>(fungos filamentosos)</b>			
<i>Aspergillus oryzae</i>	57	32 - 40	---

(\*) unicelular mas formando filamentos alongados espiralados ou tricomas; (#) suco de abacaxi como fonte de C; (%) principalmente glicogênio (reserva polimérica de glucose); (@) meio e condições de cultura otimizados para tal fim.

Contemplando a variabilidade lipídica encontrada nas milhares de espécies de micro-algas, os principais componentes podem ser classificados em:

Tabela 2 – NATUREZA QUÍMICA DOS PRINCIPAIS LIPÍDEOS DE MICROALGAS		
	Lipídeos polares	
Lipídeos neutros	Fosfolipídeos	Glicolipídeos
Triacilgliceróis (ou TAGs; triglicerídeos) Hidrocarbonetos	Lecitinas (fosfatidilcolina, fosfatidilserina,	Monogalactosil-diglicerídeos; digalactosil-diglicerídeos; sulfoquinosil-diglicerídeos

Ácidos graxos livres esteróis Ésteres cerosos	fosfatidiletanolamina); fosfatidilglicerol; fosfatidilinositol	
---	--	--

O diferencial químico composicional entre a soja e uma micro-alga pode ser assaz complexo:

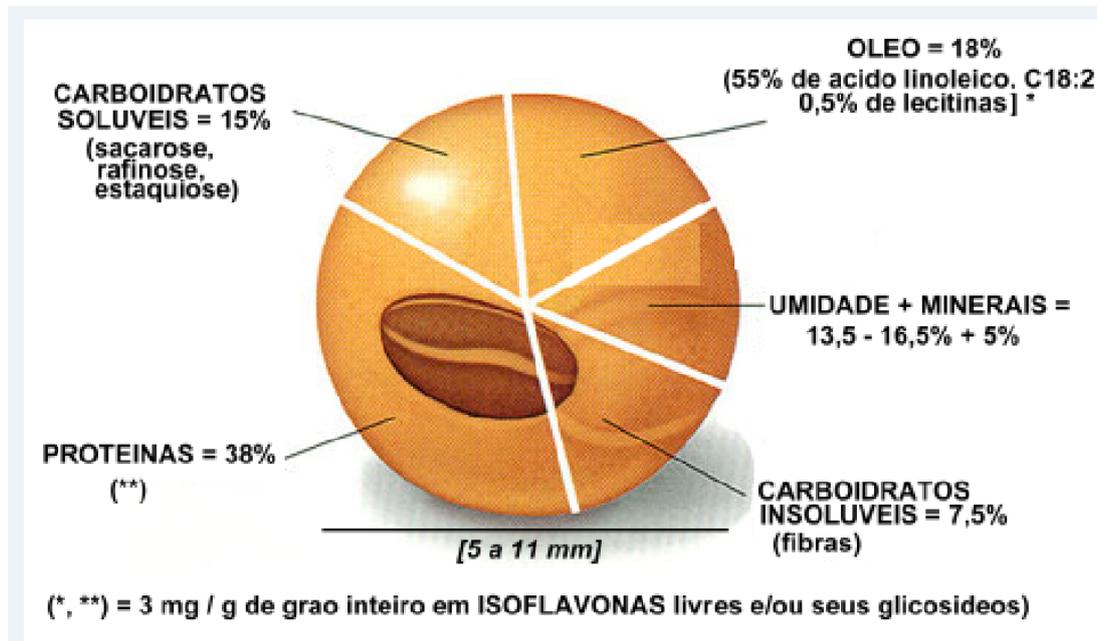


Figura 1 – Composição química média da soja (*Glycine max*)

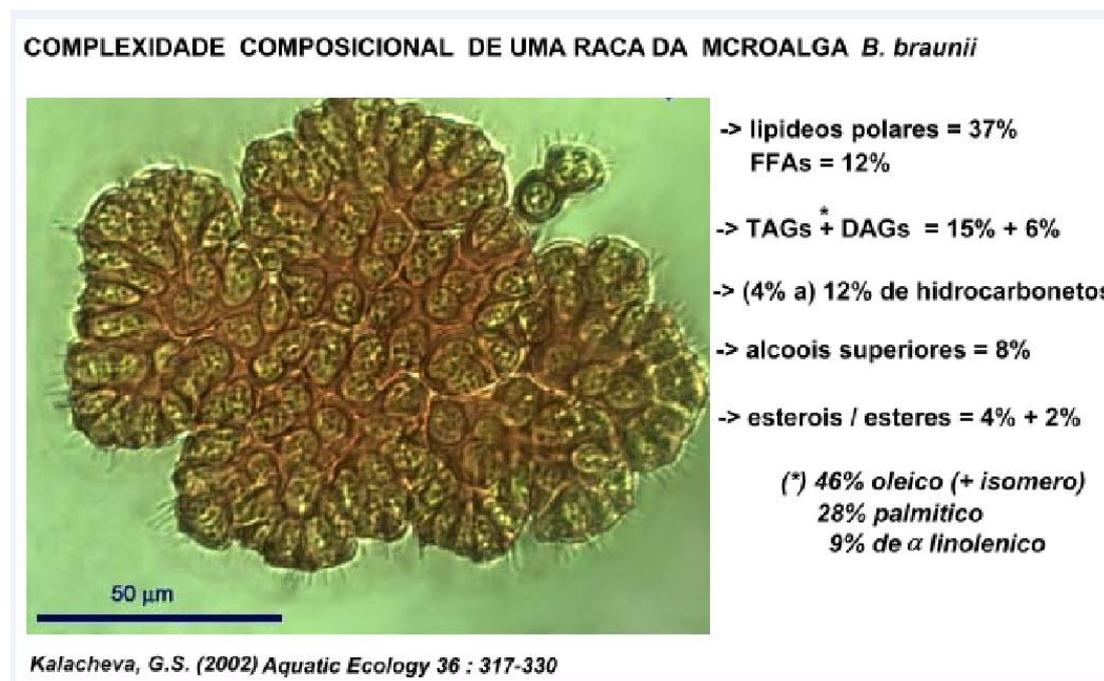
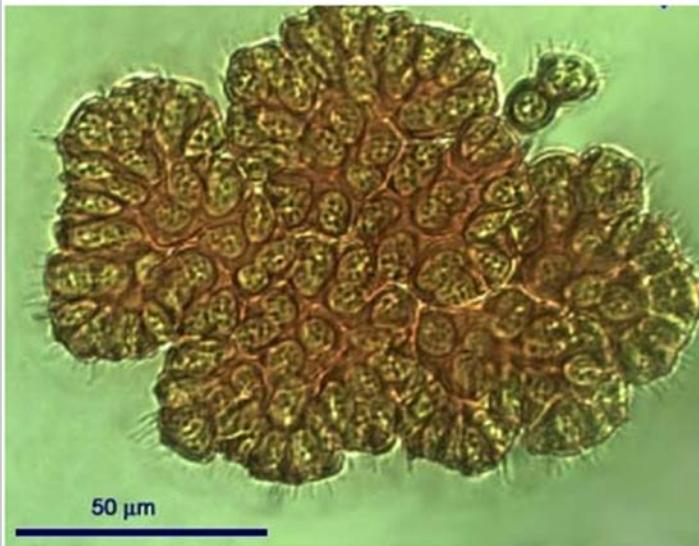


Figura 2 - Colônia de *Botryococcus braunii* (o padrão de pigmentação varia em função do conteúdo de clorofila e carotenóides) e sua composição química

COMPLEXIDADE COMPOSICIONAL de uma RAÇA da MICRO-ALGA *B. braunii*



- > lipídeos polares = 37%
- FFAs = 12%
- > TAGs + DAGs = 15% + 6%
- > (4% a) 12% de hidrocarbonetos
- > alcoóis superiores = 8%
- > esteróis / esterés = 4% + 2%

(\*) 46% oleico (+ isomero)  
28% palmítico  
9% de  $\alpha$  linolenico

Kalacheva, G.S. (2002) *Aquatic Ecology* 36 : 317-330

Com respeito à exploração de áreas de solos e águas fluviais, lacustres ou marinhas para fins energéticos a variação de rendimento / hectare é pronunciada :

Tabela 3 – PRODUTIVIDADE COMPARATIVA [8, 9] DE ALGUMAS FONTES OLEAGINOSAS PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL E / OU HIDROCARBONETOS #, ##

Fonte	Rendimento em óleo (L / ha)	Área de produção necessária * (Mha)
soja	450	846
canola	1.190	122
Pinhão-manso ( <i>Jatropha</i> )	1.890	140
Dendê (palma)	5.950	24
Microalgas #	58.700	2,5
Microalgas ##	137.000	1,1

(\*) como exemplificação, Mega-hectares teoricamente necessários para suprir ½ de toda demanda de combustíveis para transporte nos USA / ano

(#) assumindo 30% de óleo na base seca da biomassa

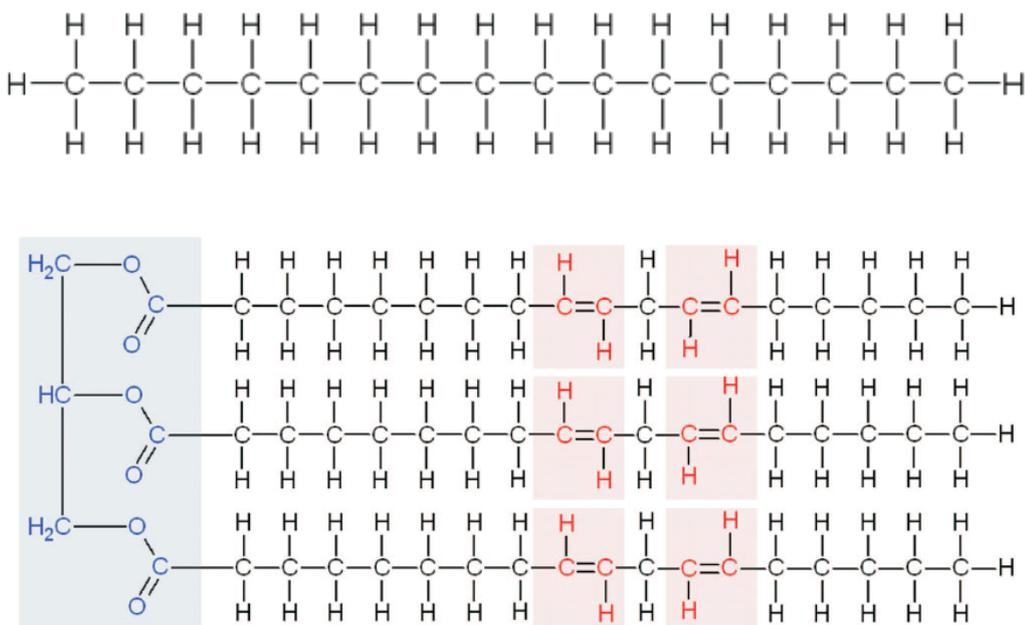
(##) assumindo 70% de óleo na base seca da biomassa

Segundo dados da FAO – Food and Agriculture Organization [10], mais de 40 variedades de micro-algas são intensivamente cultivadas para fins de aquacultura (principalmente marinha) de moluscos bivalvos, crustáceos (camarões, lagostas, caranguejos e *krill*) e peixes. As principais são: as diatomáceas (Bacilariofíceas; carapaça silicosa) *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana*, *Chaetoceros gracilis*, e *C. calcitrans*; as flageladas (móveis) *Isochrysis galbana* (Haptofíceas), *Tetraselmis suecica* e *Monochrysis lutheri* (Crisofíceas) e a clorococcaleana *Chlorella* spp.

#### 4. VARIABILIDADE QUÍMICA DOS LIPÍDEOS DE MICRO-ALGAS E ASPECTOS CULTURAIS

Os reduzidos 20% de lipídeos da soja invariavelmente se referem aos oxigenados TAGs (combinações de ácidos graxos, a maior parte insaturados, com glicerol) na ordem linoléico > oléico > linolênico > saturados. Na média na **micro-alga planktônica clorofícea *Botryococcus braunii*** (de reduzida dimensão celular, .3 – 11 micra mas formando associações de 0,05 a 0,5 mm) o acúmulo de lipídeos ultrapassa 50% do peso seco mas com a fundamental diferença de que a composição lipídica é diferenciada tanto topologicamente (inclusões intracelulares e glóbulos no espaço extracelular de agregação) quanto quimicamente pois se trata, além de um baixo teor de TAGs, de hidrocarbonetos (não oxigenados), cuja composição varia bastante em função de condições culturais. Como exemplo:  $C_{36}H_{62}$  (darwineno; v; 34%) >  $C_{37}H_{64}$  (20%) > botryococceno + iso—botryococceno (13%) >  $C_{34}H_{58}$  (11%) >  $C_{36}H_{62}$  (4%) > hidrocarbonetos “minor” > TAGs de palmítico e oléico [11, 12, 13, 14]. Estes hidrocarbonetos podem ser hidrocraqueados para se obter gasolina (67%), querosene de aviação (15%), óleo diesel (15%) e óleo residual (3%). No total de biomassa seca, *Botryococcus spp.* sob limitação de nitrogênio ou não e microaerofilia, computa-se, após 10 dias de cultivo: proteínas (23 ou 14%), carboidratos (15 ou 17%) e lipídeos totais (37 ou 61%). O teor lipídico de uma espécie alternativa, *B. protuberans*, é afetado com menor intensidade se a cultura tem ou não limitação de nitrogênio: 35 para 52% [14]. Pesquisadores japoneses foram bem sucedidos cultivando *Botryococcus braunii* em água de esgoto secundária tanto em batelada quanto em reator alimentado. Os cultivos entre 9 e 32 dias atingiram um conteúdo de 49 a 53% de hidrocarbonetos, em comparação com 58% para um cultivo em meio sintético definido e de alto custo [15].

Uma visão da diferenciação bioquímica que os lipídeos combustíveis apresentam pode ser apreciada na comparação entre espécies químicas dominantes nas fontes naturais originais ou quimicamente processadas:



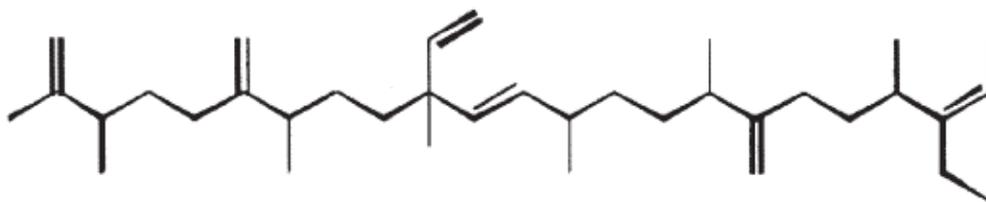


Figura 3. Estruturas químicas comparativas entre o cetano (componente nobre do óleo diesel; C<sub>16</sub>H<sub>34</sub>), os lipídeos dominantes na soja (um TAG hexa-insaturado, tri-linoléina; C<sub>57</sub>H<sub>98</sub>O<sub>6</sub>) e o darwineno (C<sub>36</sub>H<sub>62</sub>), um hidrocarboneto insaturado e ramificado da raça “B” da micro-alga *Botryococcus braunii*.

Mesmo no caso de exploração comercial de *Botryococcus* para fins de *neo*-diesel (e não propriamente biodiesel), há que se ter em consideração que a espécie *braunii* é subdividida em 3 raças (A, B e L) cuja variabilidade composicional em hidrocarbonetos é extremamente acentuada, conforme Tabela 4.

Tabela 4 - ASPECTOS COMPOSICIONAIS FINOS das RAÇAS da MICRO-ALGA <i>Botryococcus braunii</i> * [13]			
	Raça A	Raça B	Raça L
hidrocarbonetos	C <sub>25</sub> a C <sub>31</sub> ; <i>n</i> -alcadienos e alcatrienos ímpares	Botryococenos (triterpenos C <sub>n</sub> H <sub>2n-10</sub> de C <sub>30</sub> a 37)	Licopadienos (tetraterpenos tipo C <sub>40</sub> H <sub>78</sub> )
cor da colônia	amarela / verde pálidas	alaranjada-avermelhada ou alaranjada-marrom (dependendo dos carotenóides)	
fenóis do tipo alcenílico de cadeia longa	presentes	Ausentes	
biopolímeros lipídicos	Cadeias alifáticas longas interligadas como éteres e contendo ésteres		Tetraterpenos intercusados por éteres

(\*) os demais lipídeos de *B. braunii* (triacilgliceróis, fosfolipídeos e glicolipídeos são explicitados no texto)

Embora *B. braunii* tenha sido obtida de água doce, a mesma se cresce em meio salino (0,7 M de NaCl, ca. 2/3 da salinidade marinha normal) [16], apresenta uma forte redução no crescimento (50% da biomassa, uma redução de 25% no teor lipídico total, um discreto aumento do teor específico de TAGs – triacilgliceróis de 28 para 31% dos lipídeos totais e uma marcada redução no teor de ácidos graxos poli-insaturados (68% para apenas 13%), acompanhada da elevação relativa de ácido palmítico de 23 para 31 – 36%, mas sem qualquer alteração significativa no teor ou perfil qualitativo dos hidrocarbonetos.

Já outro relato bibliográfico, apresenta resultados conflitantes, pois ensaiando uma faixa maior de salinidade [17], encontrou aumento de biomassa, carboidratos, hidrocarbonetos e pigmentos (luteína), progressivamente proporcionais entre 0,34 e 0,85 M de NaCl. O conteúdo específico dos ácidos palmítico e oléico cresceu, em função da salinidade, em 1,7 e 2,25 vezes. O teor de lipídeos totais aumentou entre 4 e 8% mas com forte redução do teor relativo de ácido esteárico (em torno de 60-66%). O perfil de hidrocarbonetos (até 28% dos lipídeos totais) restou inalterado.

A literatura sobre *Botryococcus* é aliás bastante controversa no que diz respeito ao perfil quali e quantitativo de lipídeos, provavelmente por conta de que as raças (A,B e L) do mesmo gênero e espécie (*Botryococcus braunii*) tem um bioquimismo anabólico completamente diferenciado. Assim, a comparação entre uma cepa de coleção (strain Kutz No LB 807/1 Droop 1950 – 252, de Cambridge, UK) e um isolado selvagem (“wild type”) do lago Shira, Khakasia, Sibéria [18], acusou um teor de 39% de lipídeos polares combinados a 6 + 15% de DAGs / TAGs além de 12% de AGLs ou FFAs e ainda 4 + 2% de esteróis e seus ésteres, 8% de alcoóis superiores e apenas 4 a 12% de hidrocarbonetos para a cepa-padrão. Os ácidos graxos dominantes foram o oléico e seu isômero (46%), palmítico (28%) e  $\alpha$ -linolênico (9%). No isolado, um aspecto diferencial foi a leve dominância de ácido palmítico (27 a 39%) sobre o oléico (25 a 37%), teores sempre referidos a ácidos graxos totais.

Em *Botryococcus braunii*, o teor total de lipídeos varia bastante entre as raças A (62 – 63%; 43%), B (53%) e L (35%) [19]. Somente a raça B foi considerada rica em hidrocarbonetos (32%), enquanto os éteres lipídicos predominaram na raça A (35%). A ocorrência de TAGs foi determinada em apenas 1 das raças (“A”; 6%). Epóxidos e esteróis foram detectados em %s bem reduzidas (4% e 0,2%, respectivamente).

Ainda no que tange à natureza química da matéria lipídica, cada micro-alga é um caso à parte. Destarte, exemplifica-se mais 3 casos:

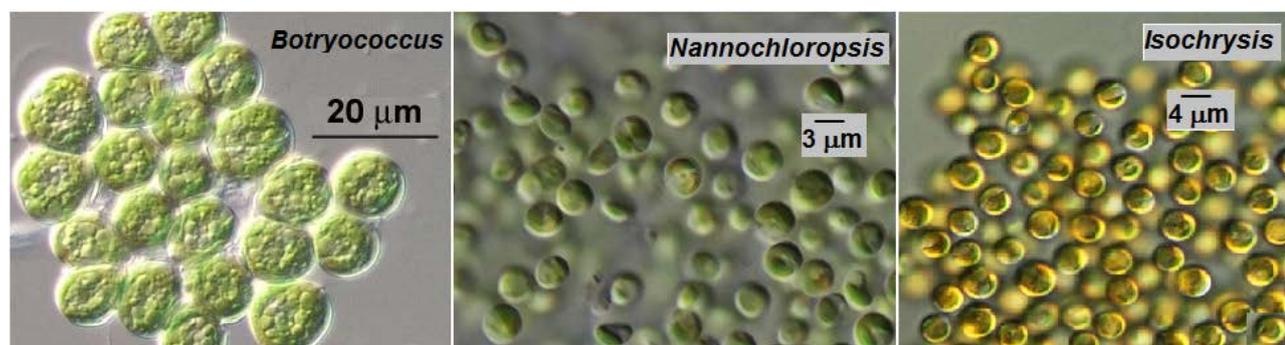


Figura 4. Exemplos de imagens de microscopia de 3 micro-algas propícias para biocombustíveis

#### (A)- Micro-alga *Nannochloropsis oculata* (eustigmatofícea; marinha)

Não contém as clorofilas b e c (apenas a), em parte compensadas por 3 pigmentos carotenóides (cantaxantina, zeaxantina e astaxantina; potentes antioxidantes). Tamanho reduzido (ca. 2 micra), o que dificulta sobremaneira a operacionalidade de coleta por centrifugação e/ou filtração. O gênero apresenta outras 5 espécies (*N. gaditana*, *granulata*, *limnetica*, *oceanica* e *salina*) com potencial para exploração comercial. A composição média da espécie *oculata*, embora também diferenciada, se aproxima mais de plantas oleaginosas superiores. Quantitativamente o óleo alcança > 50% do peso seco. Qualitativamente, na fase *lag* de crescimento (até 18 h) corresponde a uma mescla de TAGs (triacilgliceróis ou triglicerídeos) 20%, galactolipídeos (combinação de ácidos graxos como monossacarídeo galactose) 25% e fosfolipídeos 18%, os 2 últimos componentes de aparente menor utilidade para fins de biodieselização do óleo [20], embora também possam ser processados para tal

fim. A composição fina das 3 classes lipídicas (fase *lag* de crescimento) mostra dominância de palmitoléico (C18:1 n-7; invariavelmente em 25% do total), ácido palmítico (C18:0; 16 a 24%), e EPA – eicosapentaenóico (C20:5 n-3) (28 a 34%), de tal forma que as subpopulações de ácidos graxos variam entre 19 e 29% de saturados, 29 e 30% de mono-insaturados e 36 a 42% de poli-insaturados ou PUFAs. Esta distribuição se altera em fases mais avançadas do crescimento celular (entre 50 e 276 h; sempre na presença de excesso de nitrato e fosfato como suplementes salinos) : palmitoléico (entre 24 a 32%), palmítico (entre 14 a 27%) e EPA (entre 19 a 32%). A relação de sub-famílias também se altera: saturados (entre 18 e 31%), mono-insaturados (entre 27 e 37%) e PUFAs (entre 28 e 47%). Cabe registrar que a fração PUFAs é excelente para fins de ração para rotíferas (alimento de camarões) e alevinos de peixes marinhos e moluscos bivalvos (ostras) e embora possa produzir biodiesel de alta fluidez, as barreiras de alto índice de iodo e maior instabilidade redox frente ao ar atmosférico e luz são óbices à especificação como biodiesel. A fisiologia e o anabolismo bioquímico de *Nannochloropsis* são fortemente influenciados pelo grau de salinidade e nutrientes: o conteúdo lipídico não varia entre 22 e 49 g/L de NaCl no meio de cultura mas aumenta em 60% em condição hipersalina (64 g/L); nitrato de sódio (150 e 600  $\mu$ M) incrementa a biomassa em 39% mas reduz os lipídeos totais de 62 para apenas 23% e a proteína cresce de 23 para 30%; fosfato diácido de sódio (6 para 25  $\mu$ M) aumenta a biomassa em 34% e a proteína de 39 para 50% mas deprime os lipídeos em 24% [21].

### **B) - Micro-alga *Neochloropsis oleoabundans* (clorofíceia de água doce)**

Testada em fotobioreator com limitação da fonte de N, atinge um conteúdo de 37% de lipídeos totais sendo 18% em TAGs (triacilgliceróis). A produtividade volumétrica é 65 g / m<sup>3</sup> / dia [22]. Em condições similares de cultivo o conteúdo lipídico variou de 35 a 54% sendo que 80% era de TAGs os restantes 20% se distribuindo entre fosfolipídeos, glicolipídeos, esteróis, hidrocarbonetos e pigmentos. Dos TAGs, cerca de 50% compreendeu ácidos graxos saturados, mono-insaturados e di-insaturados [23]. Outro ensaio variando a natureza das fontes de nitrogênio, indicou para *N. abundans* um conteúdo de 37,5 ou 17,0 ou 18,5% de lipídeos (g/g, base seca) quando a respectivamente nitrato ou urea ou amônia atuaram como fontes alternativas de N mas com muito maior produtividade volumétrica (também 37,5 g de lipídeos / litro / dia) apenas na 1ª. fonte nitrogenada [24].

Ainda com respeito à qualidade e quantidade relativa dos ácidos graxos (AGLs de C14 a C20) presentes nos TAGs, DAGs, MAGs (acil-gliceróis), fosfolipídeos e glicolipídeos nos óleos de algas, está reportado que distribuição entre os ácidos graxos saturados e insaturados (o que afeta diretamente parâmetros para biodielização e especificação tais como número de cetano, índice de iodo, estabilidade à oxidação e ponto de entupimento a frio de filtro) é a seguinte: *Nannochloropsis* sp. (31 : 59), *Neochloris oleoabundans* (21 : 65) comparativamente a outras algas menos ou não indicadas para biocombustíveis: *Spirulina (Arthrobaacter) máxima* (42 : 52), *Chlorella vulgaris* (29 : 52), *Scenedesmus obliquus* (24 : 55) e *Dunaliella tertiolecta* (18 : 63). [25]. Os ácidos graxos principais de *Nannochloropsis* são os palmitoléico e palmítico e (27 e 23%) enquanto em *Neochloris* são os oléico, palmítico e linolênico (20, 19 e 17%).

### **(C)- Micro-alga *Isochrysis galbana* (primnesiofíceia; marinha) :**

Este 3º modelo de micro-alga apresentaria a vantagem de acumular lipídeos nos quais

predominam ácidos graxos mono- (C18:1 n-9) e tetra-insaturados (C18:4 n-3; ocatdecatetraenóico), rendendo pois biodiesel de alta resistência à cristalização / congelamento, mas por outro lado mais sujeitos à oxidação. [26]. O conteúdo lipídico variou entre 11 e 39%, dependendo da salinidade e outros parâmetros culturais.

## 5. ENERGIA SOLAR E FOTOSÍNTESE

A Terra é brindada com 178.000 TeraWatts de energia / ano ou seja 15.000 vezes mais do que toda energia que ela consome anualmente. Uma ínfima parte desta energia é, presentemente, capturada pelos vegetais superiores e fitoplancton (algas) através da fotossíntese [27]

São poucas as plantas ditas C4 {fixadoras de carbono ou CO<sub>2</sub> na forma de oxaloacetato (4 C) com ação concertada das enzimas RuBisCo, ribulose-bisfosfato-carboxilase/oxigenase e PEP-case, fosfoenolpiruvato carboxilase} mas em compensação, 4 delas, trigo, milho, milheto e cana-de-açúcar respondem por cerca de 20% de toda colheita mundial. A soja (e também a canola e girassol, além da mandioca e batata) é uma planta C3 {fica CO<sub>2</sub> na forma de ácido 3-fosfo-glicérico (3 C)} através apenas da enzima RuBisCo}. Este é o mesmo caso de algas. A fotossíntese é menos eficiente em C3 do que em C4 por conta da fotorrespiração (FR) mais acentuada (perda de volta do CO<sub>2</sub> fixado para a atmosfera), a qual então se soma à respiração normal (R; que também perde C como CO<sub>2</sub>). Somente há crescimento e acúmulo de reservas (e.g., amido; lipídeos) quando há fotossíntese líquida (FL) ou seja a fotossíntese bruta (FB) é muito maior do que a soma (FR +R), tendo-se em conta que os 2 processos são exata e bioquimicamente inversos: [28]

Fotossíntese => CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O + energia solar + clorofila -> (CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub> + O<sub>2</sub>

Respiração => (CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub> + O<sub>2</sub> -> CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O + energia química (ATP)

O ponto de compensação (PC) é aquela concentração particular de CO<sub>2</sub> em ppm para cada planta na qual FB iguala R (+FR) ou seja o resultado líquido da fotossíntese (FL) se torna nulo. Na cana-de-açúcar e milho (C4) o PC anda em torno de 0,0 e 1,0 ppm, no girassol (C3) se situa em 53 ppm e na (micro)alga *Chlorella* é > 3. Se as (micro)algas atuam como C3 como se explica o baixo valor de PC ? A razão para isso é que elas são capazes de concentrar o CO<sub>2</sub> no sítio de fixação de carbono, nesse caso absorvendo carbono inorgânico da água como íon bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e liberando CO<sub>2</sub> dentro da célula. Essa reação é catalisada pela enzima anidrase carbônica: HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> + H<sup>+</sup> -> H<sub>2</sub>O + CO<sub>2</sub> e isso pode elevar os níveis intracelulares de CO<sub>2</sub> por mais de 1000 vezes do que a quantidade normal. [29]. Por conta deste e outros truques metabólicos, uma micro-alga acelera seu crescimento, multiplicação celular e anabolismo construtivo de biomoléculas estratégicas como os lipídeos, os quais podem então passar de 10 a 30% e mesmo alcançar 50 a 70% se for imposta uma dieta com privação de fonte nitrogenada. Ou seja o ciclo fotossintético Calvin-Benson direciona o C (CO<sub>2</sub>) inicial preferencialmente para um tipo de espécie química mais facilmente estocável, dada sua hidrofobicidade.

A discussão entre os benefícios do CO<sub>2</sub> atmosférico (hoje já em torno de 450 ppm) como verdadeiro fertilizante aéreo e marinho (como defendido em “*Global temperature change and terrestrial Ecology*” na “*Encyclopedia of Water Science*”, CRC Press 2007) *versus* seus malefícios enquanto um dos gases do efeito estufa no aquecimento global pode ser mais profunda do que aparenta. A estimativa é de que um incremento de 150 ppm no CO<sub>2</sub> atmosférico (ou seja para 600 ppm), aliado a algum aumento da temperatura, elevaria a produção de grãos em 30% (concomitantemente às cifras semelhantes em quaisquer hidrofazendas abertas de micro-algas que já fossem operacionais). Controvertidamente, não há estimativa precisa em quanto o nível do mar se elevaria com o correspondente degelo dos pólos e outras elevações ora nevadas. Uma idéia comparativa [30] da eficiência fotossintética (EF; real e atual) de um vegetal superior oleaginoso (soja com EF = 4,6% e provavelmente há aproximação para o que acontece em micro-algas) *versus* um vegetal sucrogênico (EF = 6,0%; cana-de-açúcar) é mostrada na Figura 5 . O engenho humano pode intervir em vários níveis para melhorar a EF : pressão (concentração) ambiente de CO<sub>2</sub>; eficiência fotônica (já que luz avermelhada é muito mais eficiente para a fotossíntese do que azulada), termostatização, criação de híbridos através de genética convencional, engenharia genética (DNA recombinante e transgênese plena), dentre outros.

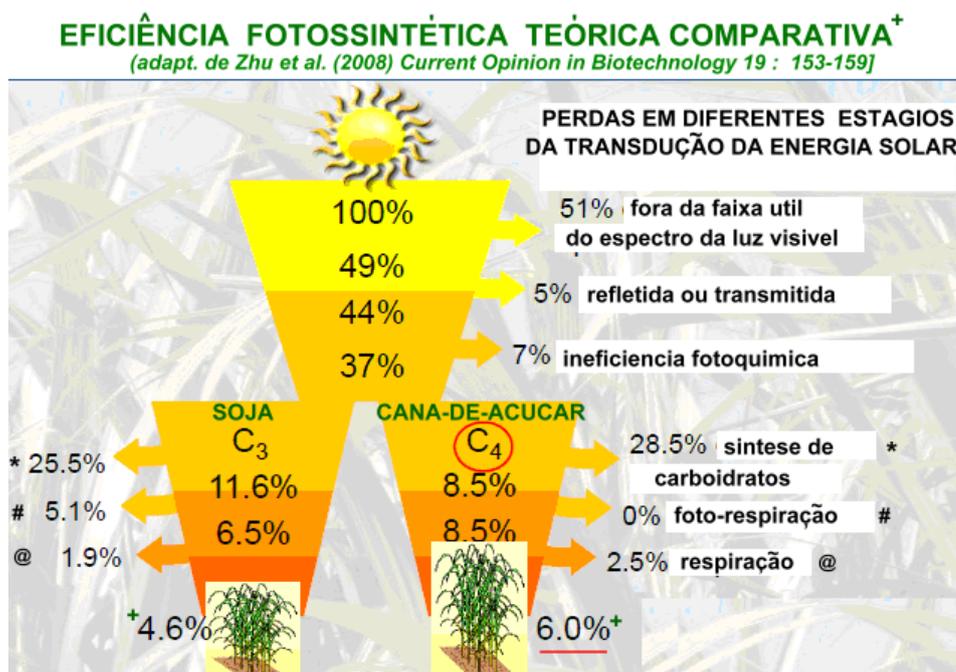


Figura 5 – As grandes perdas e poucos ganhos no aproveitamento da energia solar

Um grande filão a ser modernamente explorado para a melhoria produtiva de micro-algas é a eficiência fotossintética {PAR; radiação fotossinteticamente ativa; luz visível de 400 a 700 nm de comprimento de onda ; cerca de 45-50% do *totum* emitido pelo Sol; ou mais precisamente o Q<sub>PAR</sub> (quantidade de energia estocada como biomassa / unidade de energia incidente luminosa)}, que atualmente não excede os 5% ou seja, 95% da energia luminosa aportada pelo Sol se dissipa por outros caminhos que não a fotossíntese fixadora de CO<sub>2</sub> [31]. Trata-se de um desafio difícil para a Botânica Aplicada (Ficologia), FotoFísica, Engenharia Genética / Transgênese.

Para um cultivo diluído de micro-algas na base de 1 milhão de células / mL, a medida que se aprofunda a lamina de água para 1 cm, o  $Q_{PAR}$  decresce em 60%. Se a densidade celular é grande, na ordem de 100 milhões / mL (idealizada para um cultivo industrial), o decréscimo do  $Q_{PAR}$  é total (99,95%). O custo da agitação (turbilhão), para a desejável reversão, é alto. Translade-se, então, esta limitação para o cenário real de uma hidrofazenda de micro-algas de um lago calmo de água doce em relação a um ambiente marinho mais agitado (produtivamente) pelas ondas e movimento de marés. O  $Q_{PAR}$  de diversos tipos de micro-algas (*Haematococcus pluvialis*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Athorospira platensis*, *Chlorella vulgaris* e *Tetraselmis suecica*), segundo vários autores, oscila entre 2 e 7%. Para a soja (vegetal C3) a estimativa está em torno de apenas 1%. A cana de açúcar (C4) é uma campeã: cerca de 8% para um máximo teórico de 11%. Em comparação, um painel solar tem eficiência de 6 a 20% ou mesmo de 40%, caso de experimentação otimizada dentro de um laboratório especializado.

[adapt. de TTIW wetsus; <http://net2client.hscg.net/ZZZ/08/08200/algae.htm>]

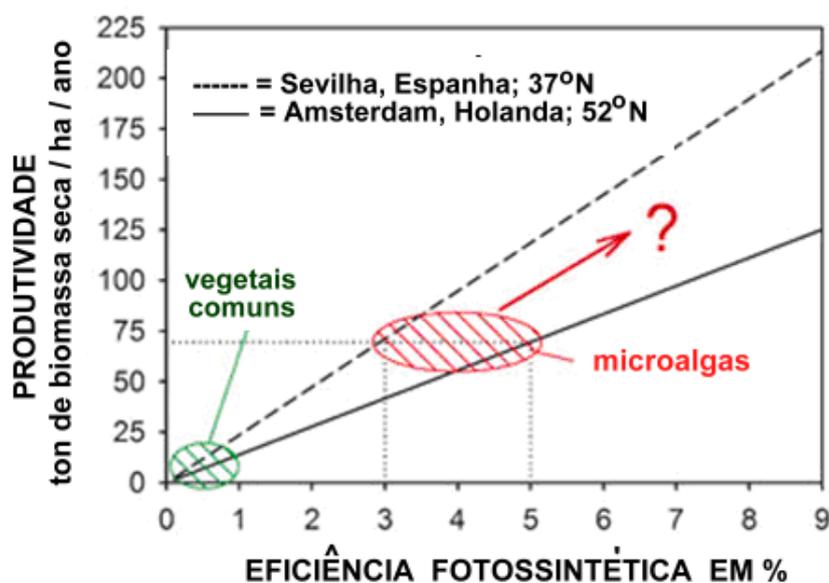


Figura 6 – Interrelação entre a eficiência fotossintética e produtividade de organismos fotossintetizadores

Bem conhecida a planilha de custos para se obter um litro de óleo de soja, alguns estudos mais recentes se concentram na redução do custo correspondente para a produção de lipídeos em micro-algas. Os resultados variam muito em função do gênero e espécie e condições culturais: US\$ 39 a 69 / barril (159 L) de óleo ou US\$ 52 a 91 (computada a inflação cumulativa) para uma hidrofazenda aberta (400 ha), usando CO<sub>2</sub> concentrado a partir de uma planta anexa geradora de eletricidade a partir de carvão e a assunção de uma produtividade de 30 a 60 g de biomassa / m<sup>2</sup> / dia e um conteúdo (base seca) de 50% de lipídeos. Outro estudo subsequente confirmou um valor aproximado de US\$ 89 / barril mas a partir de uma produtividade de biomassa de 70,4 g / m<sup>2</sup> / dia e um conteúdo lipídico de

apenas 35%. A empresa israelita Seambiotic Ltd, já em base comercial, divulgou que o preço de 1 kg de microalga seca lhe custou US\$ 0,34 a partir de uma produtividade de apenas 20 g / m<sup>2</sup> / dia e um conteúdo lipídico muito variado entre 8 até 40%. Com base nestas estimativas de 2006 e 2007, o preço de um barril de petróleo oscilou, no mesmo período entre US\$ 60 e 75, atingindo um pico especulativo de US\$ 145 / barril em julho de 2008, sendo que no Natal / 2010, nos USA, a cotação esteve em US\$ 91,4 / barril. Tendo em conta que o gasto adicional de refino (craqueamento / destilação fracionada do petróleo é superior ao de processamento de lipídeos de micro-algas (excetuando, talvez, o gasto de coleta e extração da 2<sup>a</sup>. fonte), não haveria mistério tecnológico e financeiro em viabilizar o óleo de micro-algas para torná-lo efetiva e viavelmente comercial. Cada 1,57 g de CO<sub>2</sub> produzem 1,0 g de glucose, metabolicamente conversível a lipídeos e / ou outras carbonadas. Este é o milagre bioquímico da fotossíntese. Graças à paralela fotólise da água, a verdadeira energia, o hidrogênio (H<sub>2</sub>) é eficientemente incorporado na forma mais oxidada do carbono ou seja, o CO<sub>2</sub>. Como o destino do C fixado se dissemina para outros metabólitos (e.g., lipídeos; carboidratos complexos como amido), o cálculo final indica, para uma micro-alga crescendo em hidrofazenda aberta, uma capacidade de fixar 1 ton de CO<sub>2</sub> / hectare de lâmina de água. Explorando a disponibilidade atual de CO<sub>2</sub> atmosférico (na faixa de 455 ppm) ou seja sem hiper-alimentação a partir de outras fontes como usinas a carvão e cervejarias, a estimativa é que a capacidade máxima de crescimento de micro-algas seria de 100 g / m<sup>2</sup> / dia ou 365 ton de biomassa (base seca) / hectare / ano. Comparativamente, a produtividade (real) de algumas algas mais bem estudadas em escala industrial tais como *Haematococcus pluvialis* e *Chlorella vulgaris* (2001 a 2007), se situa na ordem de 20-30 e 40-150 t / ha / ano. A 1<sup>a</sup>. (Hawaí e Israel) é fonte do carotenóide estável e anti-oxidante astaxantina; a 2<sup>a</sup>. é secularmente consumida no Ásia (Japão, Taiwan e outros países) como alimento (20% de lipídeos, 20% de carboidratos, 60% de proteína contendo 18 dos 22 aminoácidos, incluídos os 8 essenciais). A soja brasileira tem as maiores produtividades nos Estados de MT e PR: respectivamente 3,08 e 2,3 ton / ha / ano (13% de umidade; 1 só colheita; na média, 45 sacas de 60 Kg / ha / ciclo de 90-160 dias). A diferença é marcante. Mas a soja é uma das mais bens estabelecidas tecnologias agrícolas do mundo. Dados do USDA-USA, CONAB e CNPSO/EMBRAPA indicaram para o ano-colheita 2008/2009 uma produção mundial de 210,6 milhões de toneladas para 41,5 milhões de hectares plantados (57,1 milhões de toneladas / 21,7 milhões de ha no Brasil, com uma produtividade média de 2,7 ton/ha) um custo estimativo de produção / ha entre R\$ 1.541 a 1.586,00. Segundo a ASA – American Soybean Association, são conhecidos mais de 1 centena de usos para o grão de soja inteiro, seu óleo e suas proteínas [32].

A produtividade de micro-algas é bastante afetada pelo desenho do fotobiorreator do tipo fechado (PBRs) e, mais obviamente, pelo gênero / espécie selecionados. Assim, baixíssimas produtividades (0,05 – 0,27 g / L / dia) são observadas em fotobiorreatores tubular-paralelo e bolha-em-coluna com *Haematococcus pluvialis*. Média produtividade (0,69 a 1,47 g / L / dia) foram obtidas em fotobiorreatores em coluna vertical, espiral vertical, prato inclinado, tubular em ar soprado para cima (air-lift) e tubular inclinado operados com *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis Chui* e *Porphyridium cruentum*. Alta produtividade (2,70 a 4,30 g / L / dia) foi atingida em fotobiorreatores tubulares do tipo *undular row*, tubular horizontal, tubular

inclinado e de prato inclinado crescendo *Arthrospira platensis* (*Spirulina* sp.), *Chlorella pyrenoidosa* e *Phaeodactylum* sp. [ 33].

Obviamente não se pode descartar o cultivo massivo de micro-algas em hidrofazendas abertas (“open ponds”; água doce fluvial, lagoas, alga salobra e água marinha) tendo em conta os custos mais reduzidos e uma produtividade média (ton métricas de biomassa nativa / ha / ano) das mais atrativas em comparação com as plantas superiores oleaginosas: micro-algas, 14 a 255 > palma (dendê), 19 > *Jatropha curcas* (pinhão-manso), 7,5 – 10,0 > canola, 3 > soja, 1,0 a 2,5 [34], além do que a biomassa de micro-algas duplica entre 1 a 3 dias de cultivo, o que torna o rendimento muito ágil, se mantida uma taxa de inóculo e re-inóculo satisfatoriamente elevadas. Quanto ao aproveitamento de águas inservíveis para outros fins (consumo humano e animal; irrigação), há que se considerar que a água do mar (além da salinidade dominante dada por 3,5% de NaCl) é fonte satisfatória de outros medi- e micro-nutrientes estratégicos para o cultivo de micro-algas já que para os cerca de 35 – 36 g de sais dissolvidos em cada litro de água marinha o balanço de íons é : Cl<sup>-</sup> (cloreto) 56% e Na<sup>+</sup> (sódio) 28%; SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (sulfato) 8%; Mg<sup>2+</sup> (magnésio) 4% ; Ca<sup>2+</sup> (cálcio) 1.5%; K<sup>+</sup> (potássio) 1% e HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (bicarbonato) 0.5%.

Dependendo das fases *lag* (crescimento exponencial inicial) e estacionária (sem multiplicação celular mas com acúmulo de metabólitos e catabólitos estratégicos) o suprimento de formas nitrogenadas oxidadas pode afetar negativamente a acumulação de lipídeos em micro-algas. Assim, a FAO (Corporate Document Repository – *Renewable biological systems for alternative energy production – Chapter 6 – Oil production*) relata que o aumento do suprimento exógeno de KNO<sub>3</sub> de 0.9 para 9.9 mM resulta em notável aumento da biomassa (de 0,39 para 2,5 g / L) mas com uma paralela redução no teor de lipídeos totais (de 42,4 para 32,9% da base seca).

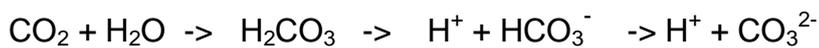
## 6. CAPTAÇÃO de CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub> POR ORGANISMOS OLEAGINOSOS; SUPRIMENTO DE NITROGÊNIO E FÓSFORO EXÓGENOS (SAIS SINTÉTICOS)

A soja (*Glycine max*) capta com eficiência dois elementos nutricionais em forma originalmente gasosa na atmosfera, CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>, respectivamente através do equipamento fotossintético (clorofilas e enzima Rubisco) e do de fixação de nitrogênio (conversão a amônia através da enzima nitrogenase da bactéria *Bradyrhizobium japonicum* que cria nódulos intrarradiculares na soja). O desempenho da soja, mediante adubação acessória ou não, fica por conta das condições climáticas e pluviométricas. A água das chuvas (ou eventualmente de irrigação fluvial) é completamente disponível para a soja.

Comparativamente, micro-algas igualmente captam CO<sub>2</sub> e até com eficiência superior, mas apenas as cianobactérias (antes ditas micro-algas azul esverdeadas) são aptas à fixação do N<sub>2</sub> atmosférico. Diversas variedades de cianobactérias fixam eficientemente N<sub>2</sub> : : cianobactérias heterocísticas (*Cylindrospermum*); cianobactérias filamentosas não heterocísticas (*Phormidium*, *Oscillatoria*, *Pleconema*, *Lyngbya*, *Raphidiopsis*) e cianobactérias unicelulares (*Oloeocapsa alpicola*). Muitas fixadoras de N<sub>2</sub> são de ambiente marinho ou algas salgadas: *Calothrix scopulorum*, *Nostoc entophyllum*, *Anabaena torulosa*, *Anabaena variabilis*, *Calothrix aeruginea*, *Microchaete* sp., *Nodularia spumigena*, *Rivularia atra*, *Rivularia biasoletiana*, *Calothrix crustacea* [35]. Não há registro bibliográfico de que as

espécies mais recomendadas de micro-algas verdadeiras (e.g., clorófitas e diatomáceas) para o fabrico de biodiesel e *neo*-diesel tenham a aptidão bioquímica de fixar N<sub>2</sub> atmosférico.

A química básica indica que o anidrido carbônico, gasoso na atmosfera, assume outras formas salinas interconversíveis quando em contato com a água (e.g., no mar), inicialmente na forma de ácido carbônico (muito fraco e com pKa = 6.4), seguido de bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e carbonato (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) [36] :



Abaixo de pH 7 a forma química dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) prevalece enquanto acima de pH 10.0 (uma alcalinidade incompatível para a maioria dos seres vivos) predomina o carbonato (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>). No mar o pH oscila entre pH 7,4 e e 8,5. Mais precisamente, CO<sub>2</sub> corresponde a 100% em pHs abaixo de 5 e inexistente acima de pH 8.7. O bicarbonato está presente em quaisquer pHs mas em pH 7,5 é praticamente dominante e o carbonato inexistente em pH 6,1 ou menor e corresponde a praticamente a todo C acima de pH 11.

Como a biomassa de algas é aproximadamente 50% de carbono (C) em base seca, são necessários 1,8 Kg de CO<sub>2</sub> para produzir 1,0 Kg de alga.

Esta judiciosa investigação [36] foi feita com a micro-alga verde (clorofícea) *Chlorella* no que tange ao suprimento exógeno de fosfatos e nitratos, já que a mesma pode alcançar até 58% de acúmulo de lipídeos, com produtividade entre 11,2 a 40,0 mg lipídeos / L / dia e produtividade de biomassa de 0,02 até 0,20 g / L / dia (37). Para esta micro-alga, cultivada em microbiorreatores no meio basal de Bold, o máximo crescimento foi obtido com uma concentração de N de 137 mg / L (não podendo ser menor do que 69 mg / L) e a relação N : P deve ser no mínimo 3 : 1 (23 a 45 mg / L), a 22°C sob constante fotoperíodo. Com a maior concentração de N, a máxima produtividade volumétrica atingida foi de 1,1 g / L ou 0,14 g / L / dia. O suprimento de nitrogênio pode ser qualitativamente variado : nitrato, amônia, uréia e mesmo nitrito. No caso da fonte mais comum, nitrato, a micro-alga procede a conveniente e progressiva conversão bioquímica : NO<sub>3</sub><sup>-</sup> → NO<sub>2</sub><sup>-</sup> → NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Os dados confirmaram, em parte, os achados anteriores otimizados [38] de N (5 a 59 mM) e P (50 µg até 25 mg / L). A natureza quanti e qualitativa dos lipídeos de *Chlorella* (predominância de ácidos palmítico, C16:0 e olêico, C18:1) é influenciada tanto pela concentração quanto pela natureza química da fonte de nitrogênio. Assim, cloreto de amônio de 0,0003 até 0,1% decresce progressivamente o teor de lipídeos de 52,8 % (base seca) até 18,8% enquanto nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub>) tem um ótimo de 0,001% (62,9 % de lipídeos) decrescente até 0,1% (22,6% de lipídeos). [39]

As algas (incluídas as micro) são organismos fotoautotróficos obrigatórias (dependência direta da luz solar para crescimento) e algumas tem crescimento autotrófico baseado em fontes orgânicas de carbono (e.g., açúcares). Podem ser cultivadas de várias maneiras: a) sistema heterotrófico em reator não iluminado, baseado em açúcares e ácidos orgânicos como substratos para fins mais nobres tais como a produção do ácido graxo poli-insaturado EPA.; b) fotobiorreator exposto ao Sol ou abrigado em edificação; c) sistema autototrófico de hidrofazenda (lacustre) aberta de baixa profundidade onde o risco de contaminação é maior bem como a perda de CO<sub>2</sub> (se injetado) e mais economicamente indicado para produto de menor valor agregado (óleo bruto para biodiesel ou *neo*-diesel direto). As micro-algas são tolerantes ao potencial hidrogeniônico do meio de cultivo (pH 7 até 9), embora a faixa ótima

seja mais estreita (pH 8,2 a 8,7). A soja requer um solo levemente ácido com extremos de pH de 5,2 a 7,0. No nível laboratorial (*in vitro* e em fotobiorreatores) o crescimento e produtividade lipídica de micro-algas é ensaiado normalmente em meios aperfeiçoados e de acentuada complexidade. Como exemplos, o de Guillard F/2 que envolve 10 diferentes sais e 3 vitaminas. Em alguns casos restritos, a composição salina pode ser simplificada com o emprego de adubos agrícolas da série N-P-K.

Outra alternativa [40] para “água marinha sintética” é a formulação de McLachlan (1965) em que o condicionador salino (NaCl a 28g / L) é adicionado de menores concentrações de outros macro-nutrientes (cloretos, sulfatos, bicarbonatos e silicatos) dos cátions  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$  e  $Na^+$  desde 7 até 0,2g%, além de um agente tamponante mais caro (HEPES a 1,2%) e micro-nutrientes (boro, fósforo, ferro, amônio) contendo o quelante EDTA e ainda elementos-traço como  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  e  $Mo^{2+}$ , estes na faixa de microgramas / litro). Uma composição mais simplificada de água de mar sintética [41], originalmente aplicada para outros fins (cultivo do micro-crustáceo *Artemia salina*, alimento de camarões e ferramenta para bioensaio de toxicidade de fitoquímicos) poderia ser testada também para o cultivo de micro-algas (fase *lag*).

Uma abordagem extremamente prática foi feita no cultivo da micro-alga *Nannochloropsis*. Rotíferos são micro-animais pseudo-celomados ou zooplankton que se alimentam de detritos orgânicos e bactérias mortas. São uma interessante ferramenta para manter hidrofazendas de piscicultura, mantendo-as mais limpas e inclusive servindo de alimentação para os peixes. A água fresca de descarte do cultivo de rotíferos foi então ensaiada com bons resultados para a cultura de *Nannochloropsis*, com resultados superiores a 23% em relação à água do mar enriquecida com os sais de Provasoli (EPS). A concentração ideal de nutrientes encontradas na água servida de rotíferos foi de 364 e 179  $\mu g$  / L de nitrogênio e fósforo, respectivamente [42].

Genericamente, o cultivo de micro-algas repousa em 3 vertentes energético-nutricionais: energia luminosa, macro-nutrientes (C, N e P) e micro-nutrientes que podem ser globalmente representados pelo “Triângulo Dourado”:



Fig. 7 – O triângulo gestor da eficiência no cultivo de micro-algas

Um parâmetro de bastante utilidade na administração do cultivo eficiente de micro-algas é a “razão ou estequiometria de Redfield” [43] ou seja a relação molecular entre o carbono : nitrogênio : fósforo presente no fitoplankton : C : N : P = 106 : 16 : 1. Em relação a esta disposição mais freqüente N : P = 16 : 1, observa-se que valores de N abaixo de 10 favorecem o crescimento de cianobactérias (“micro-algas azul esverdeadas”) e acima de 22 favorecem as micro-algas verdes ou verdadeiras, recordando que a pH 8,1 (comumente encontrado no mar) a distribuição das espécies de fosfatos são : diácido ( $H_2PO_4^-$ ) = 0,5%, monoácido ( $HPO_4^{2-}$ ) = 79% e tribásico ( $PO_4^{3-}$ ) = 20%.

Ainda neste sentido, foi encontrado que em 9 macro-algas marinhas a distribuição de nitrogênio e fósforo totais oscila entre 148,7 : 1,0 e 48,3 : 1,0, o que deve refletir bem qual a composição ótima que estes nutrientes devem apresentar no meio de cultivo [44]. Outra detalhada interpretação da razão de Redfield foi elaborada para cianobactérias [45]. Uma análise crítica se a razão de Redfield reflete apenas o aspecto composicional de fitoplankton ou também a concentração ótima de N e P no próprio meio de cultivo (e.g., o mar) foi relatada na mais reputada revista científica do mundo [46]. Este modelo prediz que o ótimo de N e P para fins de cultivo pode variar entre 8, 2 e 45,0 : 1 dependendo das condições ecológicas de cada ambiente marinho e que o valor canônico de Redfield (N : P = 16 : 1) não tem validade universal, refletindo apenas uma ocorrência particular das espécies estudadas.

O truque biotecnológico para uma eficiente produção de lipídeos em micro-algas envolve uma judiciosa administração das fontes nutricionais menores já que o crescimento sempre será proporcionalizado para a efetiva concentração de  $CO_2$ , o principal nutriente. Assim, o produtor encontrar-se-á com 2 fases: a) a *lag*, onde a micro-alga experimenta crescimento exponencial por conta do adequado suprimento de nitrogenio (N) e fósforo (P) seja pela ocorrência natural como os ânions nitrato ( $NO_3^-$ ) e fosfato ( $PO_4^{2-}$ ) em águas servidas seja pela adição de sais industriais (e.g., os de adubação agrícola) em meio de cultivo sintético de fotobiorreatores (PBR) ou mesmo, mais limitadamente, na ocorrência natural em água do mar; b) a fase estacionária, quando o crescimento pára e pode se dar o acúmulo de metabólitos desejáveis (e.g., lipídeos). Esta última condição normalmente é bastante favorecida pela privação de N e de P. Assim, *Nannochloropsis*, pode atingir a produção de 30 a 90 kg / hectare / dia se o cultivo é administrado em 2 fases, a inicial com concentração mais elevada de nutrientes (N e P) e a segunda, sob privação dos mesmos ([www.oilgae.com / algae / oil / biod / res / res.html](http://www.oilgae.com/algae/oil/biod/res/res.html); com dados baseados no Departamento di Biotecnologie Agrarie da Università degli Studi di Firenze).

## 7. TAXONOMIA das ALGAS e PRODUTOS DE MAIOR VALOR AGREGADO

As algas e microalgas de interesse para fins biocombustíveis integram um gigantesco universo de micro-organismos fotoautotróficos aquático-terrestres ou marinho geneticamente subdivido em Eucarióticos (unicelulares, às vezes formando agregados maiores e pluricelulares) e também as Eubactérias e Archeobactérias (procarióticas). Com respeito à dimensões celulares algumas são diminutas (cianobactérias como *Synechococcus* e picoplankton eucariótico como *Micromonas*). As microalgas diatomáceas de mares mais frios são as mais abundantes com > 20.000 espécies e caracterizadas pela frústula (carapaça silicosa) como *Nannochloris pelliculosa* a qual pode acumular até 60% do peso seco em lipídeos quando sob privação de silício. Seguem-se as dinoflageladas (com 2 flagelos natatórios) de

mares mais tropicais, como ex., *Scrippsiella trochoidea* que é rica em ácidos graxos na ordem relativa palmítico (25,7%) > oléico (15,6%) > PUFA 22:6  $\Delta^3$  (12,5%) > mirístico (10,3%) > PUFA 18:4  $\Delta^5$ , além de esteróis e álcoois superiores. Outra dinoflagelada rica em lipídeos saturados é *Karlodinium veneficum*. Na visão de exploração integrada de microalgas, as diatomáceas oferecem um interessante atrativo de biomassa residual: o esqueleto silicoso poroso dito terra diatomácea, diatomita e kieselghur (uma forma de óxido de silício dopada com alguma alumina) a qual tem variada aplicação industrial tais como suporte para a TNG – trinitroglicerina no preparo e transporte seguro de dinamite e purificação de águas de piscinas. Já algumas dinoflageladas como *Karenia brevis* oferecem em ambiente marinho ocorrências danosas conhecidas como “maré vermelha”, altamente tóxica para peixes e outros animais marinhos (paralisa do sistema nervoso e morte). Algumas espécies de nanoplankton unicelular (e.g., *Thalassiosira minuscula*) tem a reduzida dimensão unicelular entre apenas 2 a 20 micra ou milésimos de milímetro. Por outro lado, macro-algas pluricelulares tais como *Laminaria* podem atingir dimensões > 1 m.

As algas podem ainda ser melhor enquadradas, taxonomicamente, em Eucarióticas (dotadas de aparato membranoso nuclear) e suas 12 divisões, das quais as mais conhecidas são as diatomáceas (*Bacillariophyceae*), algas verdes (*Chlorophyceae*), algas vermelhas (*Rhodophyceae*), yellow-green algas amarelo-esverdeadas (*Xanthophyceae*), algas douradas (*Chrysophyceae*), algas marrons (*Phaeophyceae*) e as euglenóides. Um outro lote era o das algas azul-esverdeadas hoje mais corretamente designadas de cianobactérias (reino Monera, Divisão Cyanophyta) pois carecem de compartimentalização membranosa para o material nuclear (DNA) e para outras organelas (os cloroplastos estão apegados a tilacóides), sendo portanto Procarióticas ou evolutivamente mais rudimentares. Do ponto de vista estratégico para biocombustíveis seu conteúdo lipídico não é considerado economicamente viável (< 10% da biomassa seca), além de se concentrarem em espécies químicas ligadas ao glicerol mas alternativas aos tradicionais TAGs: galactosil-gliceróis, fosfatidil-gliceróis, e outros [47] e isto mesmo sob privação de fontes nitrogenadas [48].

Os produtos de alto valor agregado derivados de micro-algas é bioquimicamente muito variado incluindo lipídeos, carboidratos poliméricos, vitaminas e proteínas comestíveis, conforme detalhado na Tabela 5.

Tabela 5 - PRODUTOS DE ALTO VALOR AGREGADO ORIUNDOS DE MICRO-ALGAS E APLICAÇÕES [ 33]		
Espécies / grupos	Produto(s)	Áreas de aplicação
<i>Dunaliella salina</i> / Chlorophyta	$\beta$ -caroteno e outros carotenoides	Alimento saudável; suplemento alimentício; ração humana e animal
<i>Haematococcus pluvialis</i> / Chlorophyta	Astaxantina (oxi-carotenóide)	Alimentação humana e animal (aquacultura de peixes e crustáceos avermelhados); produtos farmacêuticos
<i>Porphyridum cruentum</i> / Rhodophyta	polissacarídeos	Cosméticos; alimentação infantil
<i>Odontella aurita</i> / Bacillariophyta	Ácidos graxos especiais	Produtos farmacêuticos;

		alimentação de neonatos
<i>Isochrysis galbana</i> / Chlorophyta	Ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs)	Suplemento alimentício > fabricação de biocombustíveis
<i>Phaedactylum tricornutum</i> / Bacillariophyta	Idem; 20-30% de 20:5 ω3 EPA	idem
Cianobactéria (antes micro-alga azul-esverdeada)		
<i>Lyngbya majuscula</i> / Cyanobacteria	Moduladores imunológicos	Produtos médico-farmacêuticos
<i>Spirulina</i> sp ( <i>Arthrospira</i> sp.) / Cyanophyta *	Proteínas (6-70%), vitaminas (10), carotenóides	Alimentação humana e animal; suplemento alimentício

(\*) filamentosa, espiralada, não heterocística; uma cianobactéria

## 8. RESTRIÇÕES POTENCIAIS AO USO COMBUSTÍVEL DE LIPÍDEOS DE ALGAS

Por conta dos ensaios históricos e estóricos com biodiesel não especificado (e.g., contendo sabões ou ácidos graxos livres) na década ou lustro anteriores, muitas restrições foram levantadas contra este tipo de *neo*-combustível por parte das fabricantes de motores do ciclo Diesel (Volvo, Scania, Cummins, Ford, GM, dentre outros) e dos sistemas injetores (Bosch, Delphi), em função do entupimento, desgaste e corrosão de peças. A muito custo, atendidas as especificações, mais ainda dentro da cultura “adaptação do biodiesel aos motores / injetores (*e não o inverso, como defende o INMETRO*), o biodiesel (metílico) foi aceito, na base de B-20, para os veículos automotores, sem a necessidade de qualquer alteração do desenho original destinado exclusivamente ao óleo diesel. Quando se examina a plethora de moléculas carbono-hidrogenadas (parcialmente oxigenadas ou não) produzidas pelas micro-algas (e.g., gênero *Botryococcus*) fica a dúvida de quanto tardará a anuência dos fabricantes para o uso pleno (B-100 ao invés de simplesmente B-20) quando o biocombustível (biodiesel e *neo*-diesel) for oriundo de (micro)-algas

Por outro lado, a exploração comercial de novos modelos de micro-organismos como as cianobactérias azul-esverdeadas (antes: micro-algas azul-esverdeadas), deve se revestir de alguns cuidados em vista de componentes altamente tóxicos biossintetizados e/ou excretados por algumas espécies, embora alguns apresentem interessante potencial médico-farmacêutico. Como exemplos: 1. Cyanovirina-N (proteína virucida de *Nostoc ellipsosporum*), bloqueia irreversivelmente o vírus da AIDS (HIV); 2. Borophycina (metabolito boratado de *Nostoc linckia* e *Nostoc spongiaeforme* var. *tênue*) bioativa contra adenocarcinoma; 3. Cryptophycina (isolada de *Nostoc* sp. ATCC 53789), potente fungicida; 4. Lipopeptídeos com atividade anti-câncer e antibiótica; 5. alcalóide (+)-8-hidroximanzamina A do gênero *Petrosiidae* é uma droga anti-tuberculose; 6. espirulina cálcica de *Spirulina fusiformis* impede a invasão tumoral e a metástase. Todavia algumas cianobactérias contêm 7. potentes toxinas como os ciclopeptídeos microcistina e nodularina de *Microcystis aeruginosa* e *Nodularia spumigena* que destroem as células hepáticas e ainda a neurotoxina kalkitoxina, bloqueadora dos canais de sódio dos nervos [49]. Mas como “*nada se cria na Natureza e tudo se transforma*” (Antoine Lavoisier, pai da Química Moderna, 1743-1794), prestigiosas

instituições como o NREL – National Renewable Laboratory do DOE – Department of Energy – USA estão geneticamente modificando cianobactérias alterando seu usual padrão bioquímico de acumulação de carboidratos em favor de lipídeos. Como já são naturalmente boas fixadoras tanto de C quanto de N haverão de ser fortes concorrentes das verdadeiras micro-algas na corrida do biodiesel futuro.

## 9. EXPLORAÇÃO INTEGRADA DOS COMPONENTES QUÍMICOS DE ALGAS

Ainda dentro da visão de uma exploração integrada de algas fluviais ou marinhas (tal qual secularmente se faz com a soja : óleo alimentício ou *pro-combustível*; proteína *fedder* ou *fodder*; carboidratos fermentescíveis; isoflavonas *hormone-like*, etc) há que se considerar que, além de lipídeos pró-combustíveis (TAGs e/ou hidrocarbonetos), alguns tipos como os gêneros da Feofíceia *Sargassum* (fonte de ágar) e das Rodofíceas *Gracillaria*, *Kappaphicus* e *Eucheuma* (fontes de outros carboidratos poliméricos como alginatos e carragenanas) contem entre 35 e 48% de carboidratos (base seca), comercialmente exploráveis ou passíveis de hidrólise ácida ou enzimática para açúcares simples e fermentescíveis até etanol (caso do Vietnam)\* [50, 51]. De fato e alternativamente, empresas como a israelense Seambiotic cultivam micro-algas dos gêneros *Nannochloropsis*, *Phaedactylum*, *Tetraselmis* e *Dunaliella* para o duplo propósito de fabricação tanto de biodiesel / neo-diesel quanto de (bio)etanol. Adicionalmente, algas (micro e macro) podem se prestar à produção de hidrogênio (combustível ideal do futuro mais distante) seja através de equipamento enzimático aprimorado pela engenharia genérica seja através de pirólise (decomposição química de materiais carbonados a altas temperaturas e na ausência de oxigênio gerando *syngas* ou mistura de hidrogênio e monóxido de carbono; H<sub>2</sub> e CO) ou ainda através da “reforma a vapor” do metano, por sua vez um produto básico na decomposição da biomassa de algas por vários outros micro-organismos (e.g., bactérias).

(\*) gastos em insumos como enzimas ou inconvenientes oriundos da hidrólise ácida mineral convencional (e.g., sulfúrica e clorídrica que normalmente requerem desalinização dos hidrolisados antes da etapa fermentativa subsequente) podem ser evitados com o emprego de ácidos não convencionais que não precisam ser eliminados na etapa pós-hidrólise (e.g., ácidos fosfórico e cítrico) [50], [51].

## 10. CUSTOS OPERACIONAIS E VIABILIDADE ECONÔMICA DE PROCESSOS APLICADOS A MICRO-ALGAS

Componentes importantes no cotejamento de custos para a produção de biodiesel de micro-algas (como sucedâneo ao biodiesel de soja) são a coleta da biomassa e a eliminação da água (umidade natural) ou secagem. No caso da soja (quando o grão verde evolui para maduro, o conteúdo de água desce de 65% para apenas 13%) o grão de lavoura pré-descascado na própria colheitadeira está pronto para o esmagamento (prensagem; para fins de biodiesel) ou retirada dos lipídeos mediante extração com hexano a quente (para fins alimentares). No caso das algas o fator complicador é múltiplo, pois o micro-organismo colhido (pasta de micro-algas) por centrifugação, filtração, flotação ou floculação vem acompanhado de um teor elevado de água na faixa dos 80-90%, o que requer, para quaisquer fins e preservação da qualidade dos componentes, uma secagem em equipamentos próprios, ou excepcional e artesanalmente ao sol. Centrifugas de alta velocidade (> 10 krpm) tem alto custo \* e podem corresponder a > 35% do investimento para coleta de micro-algas além de > 45% do consumo de energia do processo. De fato, uma

análise em escala laboratorial apontou que pode se lograr uma economia de US\$ 3.62 para apenas US\$ 0.93 / kg de biomassa processada de micro-alga quando se pré-concentra (através de floculação / flotação / sedimentação) a suspensão unicelular de 0,3 g / L para 100 g / L (10% na base seca) em vista da marcada redução no consumo de eletricidade de 4,76 kWh / kg para apenas 0,5 kWh / kg [52] .

(\*) *algumas empresas da Índia são bem conhecidas pela capacidade de fornecimento de equipamentos industriais robustos e de menor custo. P.ex., a SHARPEX Filters PVT. Ltd., de Mumbai cota, em Janeiro de 2011, suas centrífugas tubulares para 13.500xg (SA-16) e 16.000xg (SA-26) (campos gravitacionais) respectivamente por US\$ 16,200.00 e 20,700,00 (preços FOB, Porto de Navi, Mumbai, Índia). São acionadas por motores de 2 e 4 HP, respectivamente e podem separar óleo e água continuamente (desde que as densidades difiram no mínimo em 0,2) e o equipamento mais robusto (SA-26), dependendo das viscosidades e temperaturas em jogo pode operar na base de 1.500 a 2.000 litros / hora.*

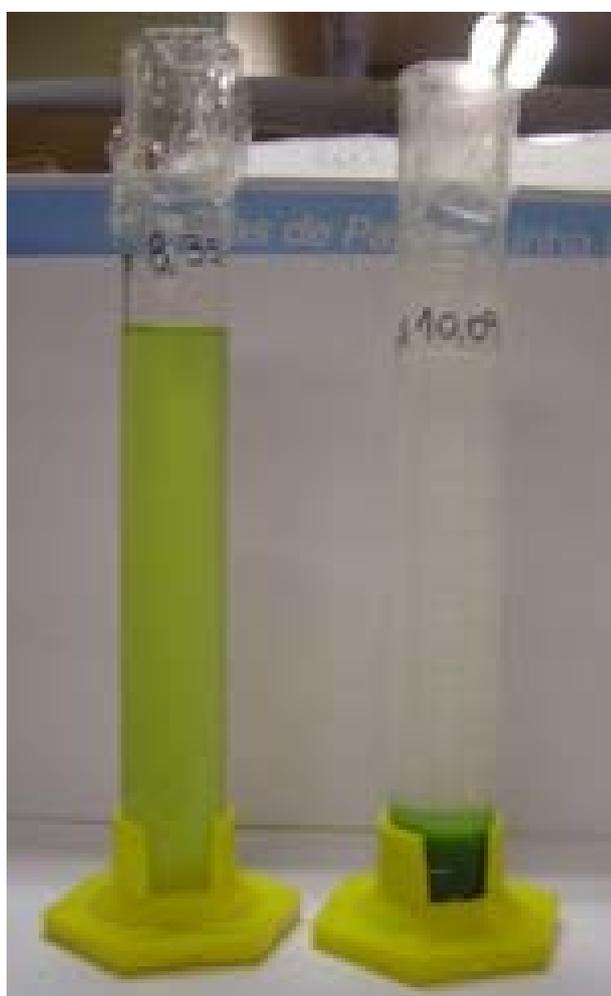


Figura 8 - *Nannochloropsis oculata* (macrocultivo em tanque do GIA - Setor de Ciências Agrárias da UFPR – Antonio Ostrenski, Bruno Miyawaki e Alexandre Guilherme Becker) (esq.) cultivo original, pH 8,35 ; (dir.) floculação após 15 min do ajuste do pH para 10,09 com NaOH (LQBB – Depto. de Farmácia da UFPR).

Como o método de colheita de micro-algas frescas por centrifugação padece das restrições antes apontadas (embora possa elevar a suspensão diluída de uma fração de g/L para um pasta de 20 g / L) talvez sua adaptação mediante um passo combinado e precedente de homogeneização da biomassa possa vir a viabilizar esta variante operacional pois a fração lipídica facilmente se destacaria das demais e, por ter menor densidade relativa, flutuaria sob ação do campo centrífugo e constituiria a 1ª. camada (“creme”). Uma outra dificuldade a considerar no uso da centrifugação é que algumas espécies de micro-algas, além da dimensão diminuta, são móveis (flageladas).

O 2º. método de colheita de micro-algas frescas é o de flotação espumígena (“*froth flotation*”) que requer também um ajuste do pH e borbulhamento de ar de modo a criar uma espuma de baixa densidade que flutua e contém (a maior parte das) micro-algas sendo recolhida por sucção. [53]. Uma variante é a flotação por ar dissolvido em que a flotação é combinada com um co-floculante químico (alum) [54].

O 3º. método de colheita de micro-algas frescas é o de floculação e que engloba variantes operacionais : a) autofloculação (caso em que a manipulação interrompe o fluxo de alimentação com CO<sub>2</sub> e micro-alga então auto-flocula) ; b) floculação química (e.g., pH alcalino para a diminuta *Nannochloropsis oculata*; adição de floculantes tais como alum ou sulfato de alumínio , cloreto férrico, quitosana); c) eletrofloculação; d) bio-cofloculação (caso do uso da micro-alga diatomácea unicelular-em-cadeia *Skeletonema* para bioflocular a outra micro-alga *Nannochloropsis*) e e) floculação induzida por ultra-som.

A floculação forçada por meios químicos é razoavelmente bem estudada. Por ex., a concentração eficiente dos agentes floculantes e pHs ótimos é: alum (8-250 mg/ L e pH = 5,3 a 5,6); Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> (50 – 90 mg/L e pH = 3,0 até 9,0), quitosana (100 mg/L e pH = 8,0) e Zetay 51 (polietileno-amina) (10 mg/L e pH > 9). [ 33].

O último método, filtração, teoricamente somente é aplicável em laboratório ou seja em reduzida escala em vista do rápido entupimento da camada ou membrana filtrante em função da reduzida dimensão das micro-algas. Uma exceção seria o aprimoramento desenvolvido por R.O. Youngs (2009) na *Algae Venrure Systems (Harvesting, Dewatering and Drying Technology)* que explora a tensão superficial, adesão, coesão e ação capilar. O autor alega poder processar > 500 litros / h e requer menos de 40w/h de energia elétrica e uma grande vantagem é que a eficiência independe da densidade da micro-alga em processamento. Uma outra variante que pode aliviar a restrição do entupimento na filtração é a inserção, logo acima da camada filtrante, de uma hélice rotatória em facas, para a constante remoção da biomassa úmida ali acumulada.

A empresa OriginOil estabeleceu em US\$ 1.24 o custo energético para se obter 1 kg de óleo de micro-alga usando a tecnologia convencional de 3 etapas seqüenciais : coleta -> secagem -> extração. Lançou então uma nova tecnologia invertendo as etapas seqüenciais para : extração -> separação dos sólidos -> secagem, para a qual a empresa clama, no caso de biomassa de micro-alga que seja bio-digerível (atacável por enzimas industriais), um custo energético de apenas US\$ 0.20 / kg de óleo. [55]. A ruptura inicial da arquitetura celular das micro-algas é conseguida também graças à aplicação de geradores potentes de ultra-som no processo patenteado designado de *Quantum Fracturing™*.

A etapa seguinte do processamento de micro-algas, a secagem (“*dewatering*”), é também custo-intensiva (= ou > 30% dos custos totais). Se faz necessária por 2 razões: a) a estocagem da biomassa com umidade acima de 7% facilita a biodegradação da mesma por ação, principalmente, de bactérias; b) qualquer que seja o método seguinte de extração do óleo (prensas ou organossolvente a quente), a umidade é um sério atrapalho.

<b>Método</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Limitações</b>	<b>Particularidades</b>
Secagem em tambor	Rápido e eficiente	Custo alto	Rompe a parede celular de algumas micro-algas; esteriliza o produto; (não aplicável a <i>Spirulina</i> )
atomizador a quente ( <i>spray-dryer</i> )	idem	idem	Esteriliza o produto mas não garante ruptura da parede celular
Secagem ao sol	Baixo custo global; capital fixo barato e sem custos correntes	Dependente do clima e regime pluviométrico	Não esterilizante; risco maior de contaminação
Secagem em fluxo-cruzado	Mais rápido do que a secagem ao sol e mais barato do que a secagem em tambor	Custo médio	Não esterilizante; não afeta parede celular (sem risco de ruptura)
Secagem a vácuo em prateleiras	Processo suave	Custo alto	Preserva bem os constituintes mas produto se torna higroscópico
Liofilizador ( <i>freeze-dryer</i> )	Processo suave	Custo (muito) alto; processo lento	idem

Há contudo o registro de uma patente que versa sobre a extração dos lipídeos de micro-algas a partir de sua forma úmida de colheita [56].

O fatiamento de custos no cultivo e processamento de microalgas até o produto principal visado é detalhado nas tabelas seguintes.

<b>COMPONENTE</b>	<b>US\$ / galão (3,785 L)</b>	<b>(% do total *)</b>
Inoculação	1.10 – 5.50	(5,5 – 16,8%)
Crescimento da micro-alga	15.00 – 20.00	(75 – 61%)
Suprimentos de água e nutrientes	0.40 – 0.70	(2,0 – 2,1,%)
Suprimento de CO2	1.20 – 2.40	(6 ,0 – 7,3%)
Coleta da biomassa	0.80 – 1.60	(4,0 – 4,9%)
Extração do óleo	1.50 – 2.60	(7,5 – 7,9%)
Total	20.0 0 – 32.80	---

**Tabela 8 - CUSTOS COMPARATIVOS NA PRODUÇÃO DE  $\beta$ -CAROTENO (\*) E BIOCOMBUSTÍVEL (\*\*) POR MICRO-ALGAS EM HIDROFAZENDAS E FOTOBIORRETORES TUBULARES [33] [57]**

	hidrofazenda	fotobiorreator
Cepa de alga	<i>Dunaliella</i>	<i>Scenedesmus</i>
Produto visado (*, **)	$\beta$ -caroteno	biocombustível
escala	10 ha	650m <sup>2</sup> ; 30 m <sup>3</sup>
<b>RENDIMENTO DE BIOMASSA</b>		
g / m <sup>2</sup> / dia	2	50
ton / ha / dia	7	100
<b>CUSTOS DE CAPITAL</b>		
compra dos equipamentos	4,3 milhões	290,5 mil
instalação	----	29,7 mil
construções	1,0 milhão	29,7 mil
infraestrutura	1,0 milhão	264,1 mil
diversos	0,3 milhão	---
<b>TOTAL DOS CUSTOS DE CAPITAL</b>	<b>6,6 milhões</b>	<b>613,0 mil</b>
<b>DEPRECIÇÃO (US\$/ano; 10 anos)</b>	<b>0,66 milhão</b>	<b>61,3 mil</b>
<b>CUSTOS OPERACIONAIS (US\$ / ANO)</b>		
fertilizantes	36,0 mil	4,72 mil
mão-de-obra	500,0 mil	127,93 mil
eletricidade	180 mil	18,13 mil
água	220,0 mil	---
CO <sub>2</sub>	150,0 mil	8,81 mil
diversos	80,0 mil	---
<b>TOTAL DOS CUSTOS OPERACIONAIS</b>	<b>1,166 milhões</b>	<b>159,59 mil</b>
<b>TOTAL DO CUSTO DE PRODUÇÃO (US\$ / ano)</b>	<b>1,826 milhões</b>	<b>220,89 mil</b>
<b>CUSTO DE PRODUÇÃO UNITÁRIO DA BIOMASSA DE MICRO-ALGA (US\$ / kg)</b>	<b>26</b>	<b>34</b>
(*) produto de alto valor agregado ; (**) produto de baixo valor agregado		

Outra criteriosa avaliação do potencial de micro-algas para biocombustíveis foi compilada por Lee, Y-K na National University of Singapore (2001, *J. Appl. Phycol.* 13 : 307-315). As máximas produtividades alcançadas na República Tcheca com *Chlorella* sp. foram de 2,50 g / L / dia e 25,0 g de óleo / m<sup>2</sup> / dia em hidrofazendas abertas rasas ("open ponds"). Já em fotobiorreatores fechados de vários modelos (tubular, serpentina, coluna ou prato chato) os respectivos valores de g / L / dia para *Isochrysisgalbana* (Israel), *Phaedactylum* sp. (Espanha), *Chlorella pyrenoidosa* (Singapura) e *Tetraselmis chuii* (Australia) foram de 1,60, 2,76, 2,90 e 1,20. Boa parte das espécies podem ser cultivadas heterotroficamente aceitando acetato, lactato, glucose e glutamato com fontes de C (casos dos gêneros *Chlorella*, *Dunaliella*, *Nannocloropsis*, *Nitzchia*, *Scenedesmus* e *Tetraselmis*). O mesmo se aplica para parte destas micro-algas quando o método de cultivo é o mixotrófico ou seja combinação de luz para a fotossíntese acoplada a suprimento de variadas fontes de C. Outro importante parâmetro cinético foi cotejado para a taxa máxima de crescimento específico : *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus acutus* mostraram valores, respectivamente de 0,11 , 0,098 e 0,198

versus 0,061, 0,040 e 0,048 para cultivos fototrófico (luz apenas), heterotrófico (glucose) e mixotrófico (luz + glucose).

A soja tem um teor umidade (comercialmente praticado) em torno de 13% e isto não é barreira técnica para a extração do grão com hexano a quente visando a separação do óleo e nem mesmo até para a biodielização *in situ* no grão inteiro (patente da PETROBRÁS). A soja tem um ciclo de colheita de 90 a 160 dias. A produtividade média brasileira (PR e MT) é de 2,7 ton / ha cultivado num ciclo entre 90 e 160 dias. Os sojicultores brasileiros aparentam estar satisfeitos com os resultados, em ordem cronológica, com cultivares mais precoces e com a adoção das sementes transgênicas unitrato como a soja “*Round Up Ready*” (resistente ao multi-herbicida glifosato). Comparativamente um cultivo produtivo de micro-algas (80-90% de água quando recém colhida por centrifugação, filtração, flotação ou floculação; alto componente de custo para a secagem) pode alcançar uma concentração em peso seco de 2,6 g / L / dia (= caso de *Dunaliella tertiolecta*; uma micro-alga verde, unicelular, flagelada, móvel; até 25% de lipídeos, base seca). Trace-se então um comparativo, em base mais realista (aproveitamento do  $Q_{PAR}$  ou fração de eficiência fotossintética) : 1 hectare de hidrofazenda (10.000 m<sup>2</sup>) com a lâmina de água com profundidade média de apenas 0,5 m corresponde a 5 milhões de litros de meio de cultivo e portanto  $2,6 \times (5 \times 10^6) = 26 \text{ ton / ha}$  se a colheita for integral ou 13 ton se ela se restringir a apenas 50% da biomassa. Para finalizar o cálculo teórico da maneira mais exata possível, se pode assumir que a colheita de alga pode se dar em intervalos de cada 3 dias úteis (tempo médio de duplicação de micro-algas; climas quentes) mantendo-se uma alta taxa de re-inóculo (50% da biomassa por colheita e 50% deixada na hidrofazenda como re-inóculo). Logo, o ciclo comparativo com a soja se reduziria de 90 ou 160 dias para apenas 30 ou 53 turnos de colheita. Então: 13 ton x (30) ou (53) = 390 ou 689 ton / ha / ciclo completo de colheita. Finalmente,  $390 \text{ ou } 689 \text{ ton} / 2,7 \text{ ton} = 144 \text{ a } 255$  maior produtividade da micro-alga em relação à soja. Estes vantajosos números podem ser confrontados, confiavelmente, com aqueles reportados por Chisti, Y. (2007) [8] que são de 130 a 304 vezes, na base de produtividade específica em óleo / área cultivada, dependendo se o teor lipídico da micro-alga é assumido em 30 ou 70% já que o da soja oscila entre apenas 18% e 21%.

Destine-se a soja exclusivamente a alimentos ou à produção de biodiesel, o grão irá gerar sempre 38% (em média) do peso seco em proteína (farelo ou torta), alimento dos mais nobres em composição de aminoácidos essenciais ou não e de alta digestibilidade para humanos e animais. Tais fatores são pouco estudados para as micro-algas apropriadas à biodieselização ou na produção direta de *neo-diesel*. Segundo a UNIJUÍ, as cotações de de 12/dez/2010 para o grão, óleo e farelo de soja, com base na Bolsa de Chicago (CBOT) eram respectivamente de US\$ 474, US\$ 378 e US\$ 1199 / ton. Segundo dados do sistema A ALGAEPRO (USA), uma tonelada de farinha de soja (48% de proteína) tem custo médio de US\$ 400 / ton. Este sistema pode produzir uma tonelada seca de farinha da cianobactéria *Arthrospira platensis* (antes dita alga azul-esverdeada *Spirulina platensis*; 68% de proteína) por apenas US\$ 230 – 260. Este micro-organismo filamentosos espiralado não se presta à produção de biodiesel (apenas 6 a 9% de lipídeos), mas com alguma diferenciação de custos, o comparativo poderia ser aplicado a micro-algas verdadeiras boas produtoras de óleos / hidrocarbonetos. Neste mesmo sentido, dados de Coutteau & Sorgeloos (1992), compilados pela FAO - Food and Agriculture Organization, colocam a faixa de custos para a produção de micro-algas entre US\$ 50 e 400 / ton de peso seco dependendo das cepas e métodos, o preço menor se referindo a culturas em tanques abertos e ao ar e os maiores em condições mais sofisticadas (e.g., PBRs – fotobiorreatores).

## 11. PRAGAS DA SOJA [58] ; CONTAMINAÇÕES DAS MICRO-ALGAS

As principais pragas da soja (*Glycine Max*) são em número de seis : lagarta-da-soja: *Anticarsia gemmatalis*; lagarta-medede-palmo - *Pseudoplusia includens*; broca-das-axilas - *Epinotia aporema*; percevejo-verde - *Nezara viridula*, percevejo-pequeno - *Piezodorus guildinii*; percevejo-marrom - *Euschistus heros*. Feliz e naturalmente, estas pragas tem suas doenças, parasitas e predadores tais como os fungos *Nomurea rileyii*, *Entomophthora* sp , *Beauveria* sp; vírus, *Baculovirus anticarsia*; parasitóides entomófagos como a vespa *Litomastix truncatellus* e percevejos *Nabis* sp e *Geocoris* sp, e o besouro *Calosoma granulatum*; microhimenópteros como *Euplectrus chapadae* e *Telenomus mornidaea*; o díptero *Eutrichopodopsis nitens*.

O cultivo de micro-algas também está sujeito a pragas ou contaminações por parte de outras espécies de fitoplâncton, zooplâncton fitófago e bactérias.

## 12. COLEÇÕES INTERNACIONAIS DE MICRO-ALGAS

Algumas instituições tem se especializado na manutenção de culturas puras de micro-algas e as fornecem mediante doação ou venda. Exemplos são : NREL – National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO, USA; CSIRO Microalgae Research Centre, Hobart, Tasmania, Austrália; University of Toronto Culture Collection, Toronto, Canadá e Charles University of Praga Culture Collection, Praga, República Tcheca e a coleção da Universidade de Gotting, Alemanha. No Brasil, um trabalho similar é feito pelo Prof. Sérgio Lourenço, do Depto. de Biologia Marinha da UFF – Universidade Federal Fluminense.

## 13. OUTRAS APLICAÇÕES INDUSTRIAIS PARA BIODIESEL DE FONTES CONVENCIONAIS E DE MICRO-ALGAS [59]

Embora o viés convencional seja a destinação do biodiesel (mono-ésteres metílico ou etílico) e / ou neo-diesel (hidrocarbonetos quimicamente variados) para fim (bio)combustível em veículos automotores do ciclo Diesel (caminhões, ônibus, camionetas, embarcações pequenas e navios; também carros de passeio na Europa e USA) , outras aplicações começam a ser exploradas, tais como : a) produção de hidrogênio para veículos movidos a células combustíveis (InnovaTek & Chevron); b) limpeza de derramamento ou manchas de petróleo (e.g., limpeza de praias com o produto “Cytosol” do Department of Fish and Game da California); c) geração de eletricidade de usos civil ou militar (e.g., o gerador de 6 mW da University of California @ Riverside; d) geração de aquecimento residencial (e.g, Portland Green Heat); e) energia para cozinha e iluminação (e.g., lanternas e fogões da BriteLyt Petromax; f) limpeza de ferramentas e outros utensílios engraxados; e g) remoção de tintas e adesivos (evitando a inalação de vapores tóxicos de solventes derivados do petróleo).

Há igualmente o potencial de aplicação de biodíeseis especiais (preparados a partir de ácidos “graxos” completamente incomuns) que permitem vantagens como alta resistência ao congelamento / gelificação / cristalização, maior poder comburente (duplamente oxigenados) aroma agradável (para perfumaria e cosméticos) e atividade microbica contra bactérias, fungos e algas, que são os casos dos ésteres etílicos dos ácidos valpróico (cadeia curta ramificada), azeláico (duplas “cabeças” carboxílicas; maior oxigenação relativa) e sórbico (cadeia curta duplamente insaturada). [60].

Outros detalhes a respeito de fontes alternativas à soja e micro-algas como fontes oleaginosas e de hidrocarbonetos para a produção de biodiesel e *neo-diesel* poderão ser encontrados no livro “Biodiesel para leitores de 9 a 90 anos” (José Domingos Fontana com comentários de Univaldo Vedana, do portal “Biodieselbr”), a ser publicado pela Editora da UFPR em março ou abril de 2011.

(\*) *J.D.Fontana é professor emérito da UFPR (2005), pesquisador DTEI do CNPq e 11º. Prêmio Paranaense em C&T (1996).*

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. <http://www.oilgae.com/ref/report/report.html>; acesso em 02.Jan.2010
- [2]. <http://gas2.org/2008/03/29/first-algae-biodiesel-plant-goes-online-april-1-2008/> (diversos); acesso em 02.Jan.2010
- [3]. <http://biofuelsdigest.com/bdigest/2010/07/30/ls9s-magic-bug-new-genes-enable-one-step-conversion-of-sugar-to-diesel/>; acesso em 11.agosto.2010
- [4]. <http://pubs.acs.org/cen/news/88/i17/8817news2.html>; acesso em 8.junho.2010
- [5]. <http://biofuelsdigest.com/bdigest/2010/03/26/renewable-diesel-from-glycerine-for-as-little-as-10k/>; acesso em 01.junho.2010
- [6]. [http://www.tradingmarkets.com/news/stock-alert/ngbf\\_ngbf-files-patent-application-on-glycerin-based-biofuel-956137.html](http://www.tradingmarkets.com/news/stock-alert/ngbf_ngbf-files-patent-application-on-glycerin-based-biofuel-956137.html); acesso em 1.junho.2010
- [7]. <http://biofuelsdigest.com/bdigest>; acesso em 23.nov.2010
- 8]. Chisti, Y. (2007) “Biodiesel from microalgae”. *Biotechnology Advances* 25 : 294–306
- [9] Deng, X, Li, Y. & Fei, X. (2009) “Microalgae : a promising feedstock for biodiesel”. *African J. Microbiol. Res.*, 3(13) :1008-1014
- [10]. <http://www.fao.org/docrep/003/w3732e/w3732e05.htm#TopOfPage>; acesso em 15.dez.2010
- [11] L.W. Hillen et al. (1982). "Hydrocracking of the Oils of *Botryococcus braunii* to Transport Fuels". *Biotechnology and Bioengineering* 24 (1): 193–205.
- [12] Dayananda, C. et al (2008) “Isolation and characterization of hydrocarbon producing green alga *Botryococcus braunii* from Indian freshwater bodies”. *Electronic Journal of Biotechnology* 10 (1), 78-91.
- [13] Banerjee, A. (2002) “*Botryococcus braunii*: A Renewable Source of Hydrocarbons and Other Chemicals”. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(3) : 245–279
- [14]. Singh, Y. & Kumar, H.D. (1992) “Lipid and hydrocarbon production by *Botryococcus* spp. under nitrogen limitation and anaerobiosis” *Journal of Microbiology and Biotechnology* 8, 121-124

[15]. Tsukahara, K. & Sawayama, S. (2005) "Liquid fuel production using microalgae". Journal of the Japan Petroleum Institute 48 (5) : 251-259

[16]. Zhila N.O. et al (2010) "Effect of salinity on the biochemical composition of the alga *Botryococcus braunii* Kutz IPPAS H-252". J. Appl. Phycol. (publ. online 29.May.2010)

[17]. Rao A.;R. et al.(2007) "Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents", Bioresource Technology 98 : 560-564

[18]. Kalacheva, G. et AL. (2002) "Lipid and hydrocarbon composition of a collection strain and a wild sample of the green microalga *Botryococcus*". Aquatic Ecology 36 : 317 – 330

[19]. Metzger P. & Largeau C (2005) "*Botryococcus braunii* : a rich source for hydrocarbons and related ether lipids". Appl. Microbiol. Biotechnol. 66 : 486 – 4906

[20]. Hodgson, P.A. et al. (1991) "Patterns of variation in the lipid class and fatty acid composition of *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) during batch culture" Journal of Applied Phycology 3: 169-181.

[21]. Hu, H. & Gao, K. (2006) "Response of growth and fatty acid compositions of *Nannochloropsis* sp. to environmental factors under elevated CO<sub>2</sub> concentration". Biotechnol Lett. 28:987–992

[22]. Pruvost, J. et al. (2009). "Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor". Bioresource Technology, 100 (23) : 5988-5995

[23]. Tornabene, T. G. et al. (1983) "Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleoabundans*. Enzyme and Microbial Technology , 5 (6) : 435-440

[24]. Li, Y. et al. (2008) "Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*" Appl Microbiol Biotechnol. 81:629–636

[25]. Gouveia, L. e Oliveira, A.C. (2009) "Microalgae as raw material for biofuels production". J. Ind. Microbiol. Technol., 36 : 269-274

[26]. Liu, C-P & Lin, L-P (2007) "Ultrastructural study and lipid formation of *Isochrysis* sp. CCMP1324" Bot. Bull. Acad. Sin (2001) 207-214

[27]. MIT – Massachusetts Institute of Technology. "MIT/OCW Health Sciences & Technology 508/510; [http://ocw.mit.edu/courses/health-sciences-and-technology/hst-510-genomics-computing-economics-and-society-fall-2005/lecture-notes/05f\\_oct13.pdf](http://ocw.mit.edu/courses/health-sciences-and-technology/hst-510-genomics-computing-economics-and-society-fall-2005/lecture-notes/05f_oct13.pdf); acesso em 26.dez.2010

[28]. Schenk, P.M. et al. (2008) "Second generation biofuels: high-efficiency microalgae". Bioenergy Research 1 : 20-43

[29] Kluge, R.A. "Fotossíntese". USP, ESALQ, Depto. de Ciências Biológicas, LCB 311 – Fisiologia Vegetal; <http://www.scribd.com/doc/3319811/Fotossintese> ; acesso em 01.Jan.2011

[30]. Bury, E. "Buy the truth"; <http://buythetruth.wordpress.com/2009/06/13/photosynthesis-and-co2-enrichment/> ; acesso em 23.dez.2010

[31]. Eggert, A. (University of Rostock) "Energy Efficiency and Microalgae"; [http:// www. bio-](http://www.bio-)

[energywiki.net/images/d/de/Egger\\_Energy\\_Efficiency.pdf](http://energywiki.net/images/d/de/Egger_Energy_Efficiency.pdf); acesso em 23.dez.2010

[32] [http://www.soystats.com/2000/page\\_06.htm](http://www.soystats.com/2000/page_06.htm); acesso em 3.jan.2010

[33]. Chen, P. et al (2009) "Review of the biological and engineering aspects of algae to fuels approach" *Int J Agric & Biol Eng.* 2 (41)

[34]. [www.oilgae.com](http://www.oilgae.com); acesso em 3.jan.2010

[35]. Stewart, W. D. P. (1973) "Nitrogen fixation by photosynthetic microorganisms" *Annu. Rev. Microbiol.* 1973.27:283-316.

[36]. Rowley, W.M. (2010) "N and P biomass-kinetic model". Thesis. USAir Force, Ohio, USA.

[37]. Mata, T., Martins, A., & Caetano, N. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14: 217-232.

[38] Becker, E. W. (1994). *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. New York: Cambridge University Press

[39]. Piorreck, M., Baasch, K., & Pohl, P. (1984). Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry*, 23 (2): 207-216.

[40]. Csavina, J.L. (2008) "The Optimization of Growth Rate and Lipid Content from Select Algae Strains". Thesis, MSc. Ohio University, pg. 33.

[41] Fontana, J.D. et al. (1994) "Acetogenins from *Annona* and *Rollinia*". *Applied Biochemistry and Biotechnology* 45 / 46 : 295-313

[42]. Chebil, L. & Yamasaki, S. (1998) "Improvement of a rotifer ecosystem culture to promote recycling marine microalga, *Nannochloropsis* sp." *Aquacultural Engineering* 17 (1) : 1-10.

[43] [http://www.xs4all.nl/~buddendo/aquarium/redfield\\_eng.htm](http://www.xs4all.nl/~buddendo/aquarium/redfield_eng.htm); acesso em 4.Jan.2010

[44] Larned S. T. (1998) "Nitrogen- versus phosphorus-limited growth and sources of nutrients for coral reef macroalgae". *Marine Biology* 132 : 409-421.

[45]. Geider R. J. & La Roche J. (2002). Redfield revisited: variability of C : N ratio in marine microalgae and its biochemical basis. *European Journal of Phycology*, 37 : 1-17

[46]. Klausmeier, C.A. ET AL (2004) "Optimal nitrogen-to-phosphorus stoichiometry of phytoplankton" *Nature* 429 : 171-174.

[47]. Sallal, A.K.N. & Radwan, S.S. (1990) "Lipid and fatty acid composition of freshwater cyanobacteria" *Journal of General Microbiology*, 136, 2043-2048

[48]. Loura, I.C., Dubacq, J.P. & Thomas, J.C. (1987) "The Effects of Nitrogen Deficiency on Pigments and Lipids of Cyanobacteria" *Plant Physiol.* 83(4): 838–843.

[49]. Singh, S.; Bhushan K. N.; Banerjee, U C (2005) "Bioactive Compounds From Cyanobacteria and Microalgae: An Overview" ; <http://www.redorbit.com/news/science/>

281044/bioactive\_compounds\_from\_cyanobacteria\_and\_microalgae\_an\_overview/; acesso em 27.dez.2010

[50]. J.D.Fontana, pedido de patente INPI PI-0002001-0 “Hidrólise fosfórica de amidos”; 23.Maio.2001.

[51] J.D.Fontana, M. Passos e A. Grzybowski, pedido de patente INPI PI 0703206-4 “Hidrólise ácida parcial cítrica e fosfórica de inulina para a obtenção de FOS – frutooligossacarídeos”; 09.Set.2007

[52]. Wageningen University, Netherlands; <http://www.bpe.wur.nl/UK/Research/Projects/Biofuels+from+microalgae.+Harvesting+of+algae+for+oil+extraction/>; acesso em 2.Jan.2010

[53]. Levin, G.V. (1961), “Harvesting Algae by Froth Flotation”, Resource Research Inc., Washington D. C

[54]. Mulaku W. O. & Nyanchaga N. [2004] “Dissolved Air Flotation Process for Algae Removal in Surface Water Treatment in Kenya, Journal of Civil Engineering Research and Practice, 1 (2) : 27-38.

[55] [http://www.worldbiofuelsmarkets.com/downloads/presentations/16thMarch/Algae/Riggs\\_Eckelberry.pdf](http://www.worldbiofuelsmarkets.com/downloads/presentations/16thMarch/Algae/Riggs_Eckelberry.pdf); acesso em 3.Jan.2010

[56]. Liddepl, J.M. (2001) “Extraction of triglycerides from micro-organisms”. US Patent 6180376; assigned to Zeneca Ltd.

[ 57] Shen Y et al. (2009) “Microalgae mass production methods. Transactions of the ASABE,; 52(4): 1275–1287.

[58] Dihel, S.R.L. e Junquetti, M.T.G. (Manual de Culturas CATI); <http://www.agrobyte.com.br/soja.htm>; acesso em 27.dez.2010)

[59]. [ [http:// gas2.org / 2008 / 03 / 26 / top-15-unexpected – uses for biodiesel](http://gas2.org/2008/03/26/top-15-unexpected-uses-for-biodiesel); acesso em 02.Jan.2011; (Unexpected uses for biodiesel”, N. Chambers, C. DeMorro, J. Borrás & S. Schick; 26.March.2008)

[60] Fontana, J.D. “Processo e Aplicações de biodiesel derivado de ácidos graxos incomuns”. Pedido de Patente ao INPI PI-0703189-0 A2; 25.set.2007.