UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO

TÁCYO SANTOS ACIOLI

Cultivo da microalga *Chlorella spp.* em pequena escala visando ao aumento da produção de biomassa e óleos para biodiesel.

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2014

TÁCYO SANTOS ACIOLI

Cultivo da microalga *Chlorella spp.* em pequena escala visando ao aumento da produção de biomassa e óleos para biodiesel.

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientadora: Profa. Titular Maria do Carmo Calijuri

São Carlos

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

181c Acioli, Tácyo Santos
 Cultivo da microalga *Chlorella* spp. em pequena
escala visando ao aumento da produção de biomassa e
óleos para biodiesel. / Tácyo Santos Acioli;
orientadora Maria do Carmo Calijuri. São Carlos, 2014.

 Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de
Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de
Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,
2014.

 1. Chlorophyceae. 2. Biomassa. 3. Airlift. 4. Bags.
5. Lipídeos. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Bacharel **TÁCYO SANTOS ACIOLI**.

Título da dissertação: "Cultivo da microalga *Chlorella* spp. em pequena escala visando ao aumento da produção de biomassa e óleos para biodiesel".

Data da defesa: 30/09/2014

Comissão Julgadora:

Resultado:

Profa. Titular **Maria do Carmo Calijuri (Orientadora)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovado

Prof. Dr. **Davi Gasparini Fernandes Cunha**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

APROVADO

Prof. Dr. **André Cordeiro Alves dos Santos**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Aprovado

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:

Profa. Associada **Maria Bernadete A. Varesche Silva**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Associado **Paulo César Lima Segantine**

*Dedico este trabalho à minha mãe,
Carmen Lúcia, meu espelho, minha
heroína, a pessoa mais importante
e que eu mais amo na vida. Sem o
seu amor, o seu cuidado, a sua
atenção, e todo o investimento feito
em minha educação, não seria
possível chegar até aqui.*

AGRADECIMENTOS

Agradecer; demonstrar ou expressar gratidão; oferecer graças; RECONHECER. Vários são os significados desse ato tão nobre. É sempre bom poder agradecer a quem nos faz favores, a quem nos ajuda, a quem nos tolera, a quem está sempre ao nosso lado.

Primeiramente agradeço a Deus por estar comigo em todos os momentos da realização do mestrado. É muito bom sentir o Seu cuidado e a Sua proteção nos mínimos detalhes. Foi muito difícil ter que deixar uma vida em Maceió, e começar outra aqui a milhares de quilômetros de casa.

Agradeço à professora Maria do Carmo Calijuri por ter proporcionado a oportunidade de realização do Mestrado na EESC/USP, umas das instituições mais renomadas do mundo. Obrigado por ter sempre me compreendido e cedido o que foi necessário à realização da pesquisa.

Agradeço também à Universidade de São Paulo, à Escola de Engenharia de São Carlos, e ao Departamento de Hidráulica e Saneamento por ter cedido às instalações, equipamentos e materiais para a realização da pesquisa. Em especial, as funcionárias da referida Instituição Sá, Priscila e Rose por terem sempre atendido às minhas solicitações com presteza e sorriso no rosto, isso faz toda a diferença.

Aos amigos do Mestrado, o meu muito obrigado. Nunca tinha feito parte de uma turma tão unida, aliás, foi uma extensão da família, pois só tínhamos uns aos outros para contar. Muitos foram os momentos de descontração e diversão, porém, muitos foram os momentos de estudo e troca de conhecimento e experiência. Vou levá-los por toda a vida comigo.

Agradeço às amigas de morada e de vida Fernanda e Araceli, com quem criei laços de irmandade. Agradeço também ao Jairo por ter me acolhido em sua casa, onde protagonizamos muitos momentos de descontração e diversão. Vou sentir muita falta.

Não tenho palavras para agradecer a todos que fazem parte do BIOTACE. Meu muito obrigado às técnicas Adriana e Luci e aos companheiros de pesquisa Paulo, Raquel, Simone, Sarah, Laís, Victória e Davi. Em especial, agradecer à Adriana por ter sempre feito o possível para que a pesquisa fosse finalizada. À Sarah e a Laís, por terem dispensado tempo para ajudar esse principiante na área da microbiologia, muitas vezes interrompendo suas atividades para me ensinar a fazer uma análise ou sanar uma dúvida.

Anjo. Acho que é a definição que cabe ao Paulo. Nada do que eu falar aqui vai chegar perto do tamanho do meu OBRIGADO. Posso falar sem temor que essa pesquisa só foi possível graças ao seu empenho, ajuda, tempo, conselhos, ensinamentos, conversas, "puxões de orelha", enfim, tudo.

Agradeço ainda ao Alcino, que assim como o Paulo, foi imprescindível para a realização da pesquisa.

Aos meus amigos e familiares de Maceió o meu muito obrigado. Como foi difícil ficar longe de vocês esse tempo.

E por último, agradeço aos meus pais, Carmen e Nildo, que sempre dispensaram esforços à minha educação. Só foi possível chegar até aqui por causa deles, que sempre me educaram a ser uma pessoa melhor. Tudo o que eu me tornei hoje, primeiramente atribuo a Deus, depois, aos esforços deles.

⁵“Confia no Senhor de todo o teu coração, e não te estribes no teu próprio entendimento;

⁶Não sejas sábio a teus próprios olhos, teme ao SENHOR e aparta-te do mal;

¹³Bem aventurado o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire conhecimento;

¹⁴Porque é melhor a sua mercadoria do que artigos de prata, e maior o seu lucro que o ouro mais fino.

¹⁵Mais preciosa é do que os rubis, e tudo o que mais possas desejar não se pode comparar a ela.

¹⁶Vida longa de dias está na sua mão direita; e na esquerda, riquezas e honra”.

Provérbios3: 5-6; 13-16

Bíblia Apologética de Estudo. Traduzida em Português por JOÃO FERREIRA DE ALMEIDA.

RESUMO

ACIOLI, T.S. 2014. **Cultivo da microalga *Chlorella spp.* em pequena escala visando ao aumento da produção de biomassa e óleos para biodiesel.** 2014. 134 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Os combustíveis derivados do petróleo são notadamente reconhecidos como fontes insustentáveis de energia, visto que há um empobrecimento das suas fontes, e ainda pela contribuição nas mudanças climáticas globais. Nesse cenário, os biocombustíveis aparecem como alternativa renovável frente às não-renováveis. No Brasil, a inserção de fontes renováveis na matriz energética tem crescido ao longo das últimas décadas, onde o biodiesel tem desempenhado um papel de destaque. A linha de frente da produção está centrada nos vegetais superiores e resíduos contendo óleos vegetais e animais, entretanto, estas não são as únicas fontes de matéria-prima para a fabricação do biodiesel. Microalgas oleaginosas são uma alternativa potencial que resolve, em parte, alguns dos problemas associados ao biodiesel oriundo de óleos vegetais e animais. As microalgas podem acumular significativas quantidades de lipídeos (até mais que 50% do seu peso seco) e gerar grande quantidade de biomassa, porém, não se encontram disponíveis na natureza em concentrações que suportem exploração comercial, salvo exceções. Portanto, para serem produzidas em larga escala, podem ser utilizados sistemas controlados de cultivo. Dentro desse contexto, a pesquisa foi dividida em 3 etapas que visaram atingir os seguintes objetivos: (1) Através de técnicas de axenização, purificar duas cepas de *Chlorella spp.* para que os resultados obtidos pudessem ser atribuídos exclusivamente à alga; (2) Estudar o comportamento de duas cepas em dois meios de cultura distintos (WC e TAP) utilizando glicose como fonte orgânica de carbono e investigar fatores físicos e químicos para otimizar a produtividade de biomassa e lipídeos em relação à esses fatores. (3) Com os fatores escolhidos e otimizados, avaliar de forma simplificada o cultivo em média escala (fotobiorreatores de 10 L). A cepa de *Chlorella* DAM5%⁰⁴ apresentou os melhores resultados quanto às velocidades de crescimento, e por isso foi escolhida. Para monitorar o crescimento, foram utilizadas as absorbâncias calibradas previamente por sólidos suspensos. O modelo de Gompertz foi utilizado para a modelagem do crescimento e gerou curvas e parâmetros de crescimento (amplitude, velocidades máximas específicas de crescimento e tempo de geração). A adição de glicose aos meios de cultura aumentou 4 vezes as velocidades de crescimento quando comparado ao meio WC padrão (de 0,30 UFC mL⁻¹ dia⁻¹ para 1,23 UFC mL⁻¹ dia⁻¹). A relevância da glicose no meio TAP foi em relação à biomassa produzida, que dobrou seu valor em relação ao WC e TAP padrão (de 500 mg.L⁻¹ para 1090 mg.L⁻¹). Na investigação dos fatores químicos, a retirada de enxofre do meio foi responsável por aumentar em mais de 7 vezes o valor da fluorescência de lipídeos neutros (de 1 u.a para 7,8 u.a.), sendo o mais eficiente. Na combinação dos fatores envolvidos, a produção de biomassa chegou ao 2000 mg.L⁻¹, ao passo que a fluorescência de lipídeos chegou às 14 u.a. O ponto ótimo para produção de biomassa e fluorescência de lipídeos neutros encontrado pelo modelo de otimização utilizado foi de 98 mg L⁻¹ de nitrogênio, 51 mg L⁻¹ de fósforo, 0 mg L⁻¹ de enxofre e 200 μ mol fótons m⁻² s⁻¹ para o meio de cultura. Esses valores foram utilizados na fase posterior, o cultivo nos fotobiorreatores. Foi constatado que o *airlift* é mais suscetível à contaminação da cultura (comprovado microscopicamente) do que as *bags*, o que interferiu nos resultados. As maiores velocidades específicas de crescimento foram obtidas no reator *airlift* (5,77 d⁻¹) para o cultivo com ar enriquecido em CO₂ (2%), sendo de 4 a 5 vezes maiores do que as obtidas em pequena escala (tubos de ensaio). Em relação à biomassa, o cultivo no *airlift* apresentou 2550 mg L⁻¹. A fluorescência de lipídeos neutros não ultrapassou 1 u.a, em todos os experimentos realizados nos fotobiorreatores, muito aquém dos valores encontrados nos tubos.

Palavras-chave: Chlorophyceae; Biomassa; *Airlift*, *Bags*; Lipídeos.

ABSTRACT

ACIOLI, T. S. **Optimization of cultivation of microalgae *Chlorella* spp. in photobioreactors types airlift and bags: Biomass as an alternative source of biodiesel.** 2014. 134 f. Master (MSc) - School of Engineering of São Carlos, University of São Paulo.

Oil-based fuels are notably recognized as unsustainable sources of energy, as their sources are impoverished, as well as their contribution to global climate change. In this scenario, biofuels appear as a renewable alternative to non-renewable ones. In Brazil, the insertion of renewable sources in the energy matrix has grown over the last decades, where biodiesel has played a prominent role. The production front line is centered on top vegetables and residues containing vegetable and animal oils, however, these are not the only sources of raw material for the production of biodiesel. Oil microalgae are a potential alternative that solves, in part, some of the problems associated with biodiesel from vegetable and animal oils. Microalgae can accumulate significant amounts of lipids (up to more than 50% of their dry weight) and generate large amounts of biomass, but are not available in nature at concentrations that support commercial exploitation, except for exceptions. Therefore, to be produced on a large scale, controlled cropping systems can be used. Within this context, the research was divided into 3 stages that aimed to achieve the following objectives: (1) Through axenization techniques, to purify two strains of *Chlorella* spp. So that the results obtained could be attributed exclusively to the algae; (2) To study the behavior of two strains in two different culture media (WC and TAP) using glucose as an organic carbon source and to investigate physical and chemical factors to optimize biomass and lipid productivity in relation to these factors. (3) With the chosen and optimized factors, to evaluate in a simplified way the cultivation in medium scale (10B photobioreactors). The *Chlorella* strain DAM5% 04 presented the best results regarding growth rates, and it was therefore chosen. To monitor growth, the absorbances previously calibrated by suspended solids were used. The Gompertz model was used for growth modeling and generated growth curves and parameters (amplitude, maximum growth speeds and generation time). The addition of glucose to the culture media increased the growth rates 4 fold compared to standard WC media (0.30 CFU mL⁻¹ day⁻¹ to 1.23 CFU mL⁻¹ day⁻¹). In the investigation of the chemical factors, the removal of sulfur from the medium was carried out in the same way as the biomass produced, which doubled its value in relation to WC and standard TAP (from 500 mg L⁻¹ to 1090 mg L⁻¹). Which is responsible for increasing the fluorescence value of neutral lipids by more than 7 times (from 1 ua to 7.8 ua), being the most efficient. In the combination of the factors involved, biomass production reached 2000 mg L⁻¹, Whereas the lipid fluorescence reached 14 ua. The optimal point for the production of biomass and fluorescence of neutral lipids found by the optimization model was 98 mg L⁻¹ of nitrogen, 51 mg L⁻¹ of phosphorus, 0 mg L⁻¹ of sulfur and 200 µmol photons m⁻² s⁻¹ for the culture medium. Phase, culture in photobioreactors. It has been found that the airlift is more susceptible to contamination of the crop (microscopically proven) than bags. The highest specific growth rates were obtained in the airlift reactor (5.77 d⁻¹) for CO₂-enriched air (2%) cultivation, 4 to 5 times higher than those obtained on a small scale (test tubes). In relation to biomass, the airlift culture presented 2550 mg L⁻¹. Neutral lipid fluorescence did not exceed 1 u.a. in all experiments performed on photobioreactors, well below the values found in the tubes.

Key-words: Chlorophyceae; biomass; *Airlift*, *Bags*; lipids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Evolução dos biocombustíveis no Brasil. Fonte: ANP, 2010.....	33
Figura 2 (a) e 2 (b) - Fenômeno da "Neve Melancia" nas montanhas do Colorado (EUA) causado pela proliferação de <i>Chlamydomonas nivalis</i> . Fonte: REIS, 2011.	37
Figura 3 (a) e 3 (b) - Floração de algas no reservatório de Barra Bonita, São Paulo/Brasil. Fonte: Davi Gasparini Fernandes Cunha, 2014.	37
Figura 4 - Potenciais da biomassa algácea: fontes de energia, produtos e aplicações. Fonte: BECKER, 2008.	38
Figura 5 - Processos de assimilação do carbono. Fonte: LARCHER, 2000.....	39
Figura 6 - Vista superior de uma lagoa de alta taxa (raceway). O inóculo é introduzido após a roda de pás e completa um ciclo ao ser mecanicamente arejado com CO ₂ . Fonte: Adaptado de BREENAN e OWENDE, 2010.	44
Figura 7 - Vista superior de outra configuração para uma lagoa de alta taxa. Fonte: Adaptado de CHISTI (2007).	45
Figura 8 - Diferentes configurações de fotobiorreatores. (a) Fotobiorreator do tipo helicoidal. (b) Fotobiorreator tubular horizontal. (c) Visões frontal e lateral de um fotobiorreator de placas planas. Fonte: Adaptado de SINGH; SHARMA (2012).	46
Figura 9 - Diferentes tipos de fotobiorreatores do tipo airlift. Para a pesquisa foi utilizado o airlift com circulação e divisão internas (à direita). Fonte: Adaptado de SINGH; SHARMA (2012).	50
Figura 10 - Fluxograma experimental da pesquisa.	54
Figura 11 - Fluxograma experimental da primeira etapa da pesquisa.....	56
Figura 12 - Monitoramento do crescimento em tubo com fotoperíodo ajustado em incubadoras B.O.D. 411D Nova Ética.....	60
Figura 13 - Calibração das curvas de absorbâncias e sólidos em erlenmeyers com 1 L cultura.	62
Figura 14 - Experimento Fatorial realizado em tubos com 20 mL de cultura.	64
Figura 15 - Preparo de meio de cultura em galões Pyrex de 9 L.	65
Figura 16 - Fluxograma experimental da terceira etapa da pesquisa.....	66
Figura 17 (a) - Vista frontal do suporte para as bags. (b) - Vista lateral superior mostrando as barras removíveis e os suportes para as barras.	67
Figura 18 - Projeto do airlift. Material de fabricação do reator, entrada e saída de substrato, entrada e saída do gás, ponto com abertura para entrada de sensores e aspectos construtivos.	68
Figura 19 - Fotobiorreatores utilizados na pesquisa na operação.....	68
Figura 20 - (a) Compressor utilizado. (b) Tubulação em cobre externa ao laboratório. (c) Regulador de pressão e tubulação de Poliuretanoantes da passagem por filtros de ar e óleo.....	69
Figura 21 - Conjunto de filtros em sequência (A1 0010G, A4 0010G e A5 0010G (carvão ativado) utilizados para filtração do ar atmosférico.	70
Figura 22 - (a) Cilindro de CO ₂ . (b) Final da tubulação em cobre externa ao laboratório.	70
Figura 23 - (a) Regulador de pressão para o CO ₂ . (b) Fluxômetros para controle da vazão de entrada nos fotobiorreatores.	71
Figura 24 - (a) Estrutura de madeira para fixação das lâmpadas fluorescentes coberta com papel alumínio para maior dissipação da luz. (b) Estrutura com as lâmpadas em funcionamento.	71

Figura 25 - Fotomicrografias de colônias e células de <i>Chlorella</i> sp. onde observa-se a pureza das culturas. Aumento de 400x. Células no 3º dia do cultivo realizado em meio WC enriquecido com peptona e glicose (1 g/L).....	74
Figura 26 - Curvas de crescimento da cepa DAM 5% 04 nos meios WC padrão (em azul) e WC com adição de glicose como fonte orgânica de carbono (em vermelho). Barras verticais indicam desvio padrão (n=3)..	75
Figura 27 (a) e 27(b) – Curvas obtidas na modelagem no software Origin 8.0 através da função de Gompertz. (a) Curva em meio WC padrão. (b) Curva em meio WC com adição de 1 g/L de glicose.	76
Figura 28 - Curvas de crescimento da cepa FAZ11 nos meios WC padrão (em azul) e WC com adição de glicose como fonte orgânica de carbono (em vermelho). Barras verticais indicam desvio padrão (n=3).....	77
Figura 29 (a) e 29 (b) – Gráfico apresentando o ajuste dos dados ao modelo de Gompertz e o valor de R quadrado para a cultura em meio WC padrão.	78
Figura 30 - Curvas de crescimento da cepa DAM 5%04 nos meios TAP padrão (em vermelho), TAP + glicose (1 g/L) (em azul) e WC + glicose (1 g/L) (em cinza). Barras verticais indicam desvio padrão (n=5).....	79
Figura 31 (a) e 31 (b) – Gráficos apresentando o ajuste dos dados ao modelo de Gompertz e o valor de R quadrado para a cultura em meio TAP (a) e TAP + glicose (b).	80
Figura 32 – Curva de crescimento da cepa FAZ 11 no meio TAP padrão. Barras verticais indicam desvio padrão (n=5).	81
Figura 33 - Gráfico apresentando o ajuste dos dados ao modelo de Gompertz e o valor de R quadrado para a cultura em meio TAP da cepa FAZ 11.	82
Figura 34 - Regressão linear entre SST(mg/L) e absorbâncias (550 nm) da cepa DAM 5%04 no meio de cultura WC + glicose.	83
Figura 35 - Regressão linear entre SST(mg/L) e absorbâncias (550 nm) da cepa DAM 5%04 no meio de cultura WC + glicose com a eliminação dos últimos pontos visando a não perder a linearidade.	84
Figura 36 - Regressão linear entre SST(mg/L) e absorbâncias (683nm) da cepa DAM 5%04 no meio de cultura WC + glicose.	84
Figura 37 - Regressão linear entre SST(mg/L) e absorbâncias (683 nm) da cepa DAM 5%04 no meio de cultura WC + glicose com a eliminação dos últimos pontos.	85
Figura 38 (a), (b), (c), (d), (e) e (f) – Curvas de calibração entre SST (mg/L) e Absorbância e seus reajustes. (a) TAP Padrão (550 nm) (b) TAP Padrão (683 nm) (c) TAP + Glicose (550 nm) (d) TAP + Glicose (550 nm) reajustada. (e) TAP + Glicose (683 nm) (f) TAP + glicose (683 nm) reajustado.	86
Figura 39 - Sólidos Dissolvidos Totais para os meios de cultura testados. Barras verticais indicam desvio padrão (n=3).	87
Figura 40 - Curvas de Crescimento da cepa DAM 5%04 no meio TAP sob limitações de nitrogênio. Barras verticais indicam desvio padrão (n=3).....	88
Figura 41 - Fluorescência de lipídeos neutros para as limitações de nitrogênio nos dois períodos de tempo estudados (6 e 13 dias). Barras verticais indicam desvio padrão (n=3).....	89
Figura 42 - Curvas de Crescimento da cepa DAM 5%04 no meio TAP + glicose sob limitações de nitrogênio. Barras verticais indicam desvio padrão (n=3).	90
Figura 43 - Fluorescência de lipídeos neutros para as limitações de nitrogênio nos dois períodos de tempo estudados (6 e 13 dias). Barras verticais indicam desvio padrão (n=3).....	91
Figura 44 - Comparação entre as fluoreescências de lipídeos neutros para as limitações de nitrogênio nos dois períodos de tempo e meio estudados (6 e 13 dias). Barras verticais indicam desvio padrão (n=3).....	91
Figura 45 - Curvas de Crescimento da cepa DAM 5%04 no meio TAP + glicose sob diferentes concentrações de Bicarbonato, Nitrogênio e Fósforo. Barras verticais indicam desvio padrão (n=3).....	93

Figura 46 - Fluorescência de lipídeos neutros para as condições que envolvem diferentes concentrações de Bicarbonato, Nitrogênio e Fósforo. Barras verticais indicam desvio padrão (n=3).	94
Figura 47 - Gráfico apresentando o ajuste dos dados ao modelo de Gompertz e o valor de R quadrado para a cultura em meio WC padrão.	95
Figura 48 - Fluorescência de lipídeos neutros em condições de privação de enxofre (6 e 13 dias). Barras verticais indicam desvio padrão (n=3).	96
Figura 49 - (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h), (i), (j) – Fotomicrografias da cepa DAM 5%04 cultivadas a 24° C e com intensidade luminosa de 60 μmol fótons m^2s^{-1} na fase estacionária do cultivo. Vesículas de lipídeos neutros são evidenciadas em amarelo após coração com corante Vermelho do Nilo. Cloroplastos aparecem em vermelho. Aumento de 400 x. Escala de 20 μm .	98
Figura 50 - Curvas de Crescimento para as 16 condições /experimentos rodadas no experimento fatorial.	102
Figura 51 - Fluorescências de lipídeos neutros para as 16 condições do experimento fatorial tendo como base o meio TAP + glicose cultivadas por 6 dias.. Barras verticais indicam desvio padrão (n=3).	103
Figura 52 - Fluorescências de lipídeos neutros para as 16 condições do experimento fatorial tendo como base o meio TAP + glicose cultivadas por 13 dias. Barras verticais indicam desvio padrão (n=3).	104
Figura 53 - Diagrama de Pareto para a modelagem em relação à produção de biomassa. As letras A, B, C e D representam Nitrogênio, Fósforo, Enxofre e Luz, respectivamente.	105
Figura 54 - Diagrama de Pareto para a modelagem em relação à fluorescência de lipídeos. As letras A, B, C e D representam Nitrogênio, Fósforo, Enxofre e Luz, respectivamente.	105
Figura 55 (a) e 55 (b) - Superfícies de respostas produtividade de biomassa em função de nitrogênio, fósforo, enxofre e luz de acordo com o modelo preditivo. Pontos em vermelho indicam os pontos experimentais que foram utilizados para gerar o modelo.	107
Figura 56 - Superfícies de respostas para fluorescências de lipídeos neutros em função de nitrogênio, fósforo, enxofre e luz de acordo com o modelo preditivo. Pontos em vermelho indicam os pontos experimentais que foram utilizados para gerar o modelo.	108
Figura 57 - Curvas de crescimento (550 nm e 683 nm), perfil de O ₂ e pH ao longo do cultivo no reator (airlift) na condição controle.	110
Figura 58 - Curvas de crescimento, perfil de O ₂ e pH ao longo do cultivo nas bags (sem adição de CO ₂) na condição controle. Barras verticais indicam desvio padrão (n=3).	111
Figura 59 - Curvas de crescimento (preto) e perfil de O ₂ (cinza) ao longo do cultivo no reator (airlift) com adição de CO ₂ ao ar atmosférico para aeração das culturas.	112
Figura 60 - Curvas de crescimento (preto) e perfil de O ₂ (cinza) ao longo do cultivo nas bags com adição de CO ₂ ao ar atmosférico para aeração das culturas. Barras verticais indicam desvio padrão (n=3).	113
Figura 61 - Curvas de crescimento e ajustes realizados com a modelagem de Gompertz para os fotobiorreatores utilizados na pesquisa com seus respectivos R quadrados.	114
Figura 62 - Curvas de crescimento e ajustes realizados com a modelagem de Gompertz para os fotobiorreatores utilizados na pesquisa com seus respectivos R quadrados.	115
Figura 63 - Sólidos Dissolvidos Totais (mg/L) para os experimentos realizados no airlift.	116
Figura 64 - Sólidos Dissolvidos Totais (mg/L) para os experimentos realizados nas bags.	117
Figura 65 - Comparação entre as fluorescências para lipídeos neutros para os experimentos controle e com adição de CO ₂ realizados nos reatores e nas bags. Barras verticais indicam desvio padrão (n=3).	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Cenário global de energia renovável para 2040.	31
Tabela 2 - Vantagens na utilização de microalgas para a produção de biocombustíveis.	36
Tabela 3 - Efeitos das diferentes concentrações de nitrogênio na composição química de <i>Chlorellavulgaris</i> e <i>Scenedesmusobliquus</i>	41
Tabela 4 - Comparação entre as características das diferentes condições de cultivo.	43
Tabela 5 - Valores para a produtividade de biomassa de microalgas em sistemas abertos.	45
Tabela 6 - Valores para a produtividade de biomassa em sistemas fechados.	47
Tabela 7 - Comparação de sistemas abertos e fechados para a cultura de microalgas.	48
Tabela 8 - Produtividade e concentração de biomassa em escala comercial.	49
Tabela 9 - Relação superfície/volume utilizada em airlifts.	50
Tabela 10 - Comparação de produtividades de culturas enriquecidas ou não com CO ₂	51
Tabela 11 - Produtividades de <i>Chlorella</i> em relação a porcentagens de CO ₂ em fotobiorreatores.	52
Tabela 12 - Produtividades de <i>Chlorellap yrenoidosa</i> e <i>Scenedesmus obliquus</i> em relação a diferentes porcentagens de CO ₂ (fotobiorreatores).	52
Tabela 13 - Cepas do banco de microalgas e cianobactérias do BIOTACE – USP utilizadas na pesquisa.	55
Tabela 14 - Composição do meio de cultura WC.	58
Tabela 15 - Composição da solução de metais do meio de cultura WC.	58
Tabela 16 - Composição da solução de vitaminas do meio de cultura WC.	58
Tabela 17 - Composição da solução de sais do meio de cultura TAP.	59
Tabela 18 - Composição da solução de fosfato do meio de cultura TAP.	59
Tabela 19 - Composição da solução de metais do meio de cultura TAP.	59
Tabela 20 - Fatores químicos e seus níveis estudados na pesquisa.	63
Tabela 21 - Condições testadas de acordo com os fatores químicos definidos.	63
Tabela 22 - Fatores e Níveis utilizados no Experimento Fatorial.	64
Tabela 23 - Variáveis e Métodos para as análises físico-químicos.	72
Tabela 24 - Variáveis bioquímicas e métodos.	73
Tabela 25 - Parâmetros da Função de Gompertz, velocidade máxima específica de crescimento e tempo de geração para a cepa DAM 5% 04 no meio WC padrão.	76
Tabela 26 - Parâmetros da Função de Gompertz e velocidades máximas específicas de crescimento para a cepa FAZ 11 no meio WC padrão e no meio WC + glicose.	78
Tabela 27 - Parâmetros da Função de Gompertz e velocidades máximas específicas de crescimento para a cepa DAM 5%04 no meio TAP padrão.	80
Tabela 28 - Parâmetros da Função de Gompertz e velocidades máximas específicas de crescimento para a cepa DAM 5%04 no meio TAP padrão.	81

Tabela 29 - Compilação das velocidades de crescimento e tempos de geração obtidos através dos parâmetros gerados na modelagem com a função de Gompertz.	82
Tabela 30 - Fatores e níveis testados no experimento fatorial.	98
Tabela 31 - Fatores e níveis testados no experimento fatorial.	99
Tabela 32 - Resultados obtidos no experimento fatorial.	100
Tabela 33 - Ponto ótimo para a produtividade de biomassa.	109
Tabela 34 - Ponto ótimo para a fluorescência de lipídeos neutros.	109
Tabela 35 - Ponto ponto para ambas as respostas (sólidos e fluorescências).	109
Tabela 36 - Velocidade máximas específicas de crescimento para o experimento controle nos fotobiorreatores.	114
Tabela 37 - Velocidade máximas específicas de crescimento para o experimento controle nos fotobiorreatores.	115

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
2. OBJETIVOS	29
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	30
3.1 Energia, perspectivas energéticas e questões ambientais.	30
3.2 Energia a partir da biomassa.....	32
3.3 Biocombustíveis e o caso de sucesso do Brasil.....	33
3.4 Microalgas	34
3.5 Fotossíntese e crescimento microalgal	39
3.5.1 Descrição do processo.....	39
3.6 Efeitos dos principais nutrientes no processo fotossintético.....	40
3.6.1 Nitrogênio	40
3.6.2 Fósforo.....	41
3.6.3 Enxofre	42
3.7 Cultivo de Microalgas	42
3.7.1 Cultivo de microalgas em sistemas abertos.....	44
3.7.2 Cultivo de microalgas em sistemas fechados.....	46
3.7.3 Comparação do cultivo em sistemas abertos e fechados	47
3.8 Airlift.....	49
3.9 Aeração das culturas através de ar enriquecido com CO ₂	51
3.10 Controle do pH, intensidade luminosa, temperatura, e oxigênio dissolvido.....	53
4. MATERIAIS E MÉTODOS	54
4.1. ETAPA 1 – Origem e axenização das cepas utilizadas na pesquisa	55
4.1.1. Origem das cepas	55
4.1.2. Axenização das cepas de <i>Chlorella sp</i>	55
4.2. ETAPA 2	59
4.2.1. Monitoramento do crescimento da microalga.....	59
4.2.2. Modelagem do crescimento da microalga.....	60
4.2.3. Calibração das curvas de absorbâncias e sólidos.....	61
4.2.4. Seleção de fatores químicos para otimização do cultivo visando produtividade de biomassa e lipídeos totais.	62
4.2.5. Otimização do cultivo	63
4.3. ETAPA 3 –Cultivo em média escala utilizando-se fotobiorreatores de 10 L	65
4.3.1 - Descrição dos Fotobiorreatores	67
4.3.2 –Sistema de Injeção dos Gases	69
4.3.3–Coleta de amostras e análises físico-químicas.	71
4.3.3 – Determinação da biomassa e análises bioquímicas	72

4.3.4- Análise dos dados.....	73
5. RESULTADOS.....	74
5.1. ETAPA 1 – Origem e axenização das cepas utilizadas na pesquisa	74
5.2. ETAPA 2 – Monitoramento do crescimento das cepas de <i>Chlorella sp.</i>	75
5.2.1 – Cepa DAM 5%04	75
5.2.3 – Monitoramento das cepas no meio TAP	79
5.2.4 - Curvas de Calibração Sólidos x Absorbâncias	83
5.2.4.1 - WC + glicose (550 nm)	83
5.2.4.2 - WC + glicose (683nm)	84
5.2.4.3 – TAP e TAP + glicose.....	85
5.2.5– Produção de lipídeos.....	87
5.2.5.1 – Limitação de Nitrogênio no meio TAP padrão.....	88
5.2.4.2 – Limitação de Nitrogênio no meio TAP com adição de glicose (1g/L)	89
5.2.4.3 – Bicarbonato, Fósforo e Limitação de Nitrogênio no meio TAP com adição de glicose (1 g/L)	92
5.2.4.3 – Privação de Enxofre nos meios TAP padrão e TAP com adição de glicose (1 g/L).....	95
5.3 - Experimento Fatorial	98
5.3.1. Experimento Fatorial - 1ª Fase	100
5.3.2. Experimento Fatorial - 2ª Fase	103
5.3.3 – Modelagem Experimento Fatorial.....	104
5.4. ETAPA 3 – Cultivo em média escala utilizando fotobiorreatores de 10 L.....	110
5.4.1. Cultivo na condição controle (0 % CO ₂)	110
5.4.2. Cultivo com adição de CO ₂ (2%)	112
5.4.3. Modelagem do crescimento nos fotobiorreatores	113
6. DISCUSSÃO	119
7. CONCLUSÕES.....	127
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129

1. INTRODUÇÃO

A gestão eficiente dos recursos naturais se tornou algo absolutamente indispensável para que o modelo de crescimento econômico adotado pelo homem possa ser conciliado com a preservação dos recursos disponibilizados pela natureza.

Tornou-se cada vez mais evidente que o uso continuado dos recursos energéticos provenientes de combustíveis fósseis é insustentável, devido ao empobrecimento das reservas mundiais e à emissão de gases de efeito estufa (GEE), apontada como principal causa do aquecimento global.

Nos últimos anos, grandes iniciativas de pesquisa no sentido de desenvolver alternativas renováveis foram desenvolvidas, dentre as quais, os biocombustíveis vêm apresentando papel de destaque.

A produção dos biocombustíveis utilizados hoje tem como base, principalmente, os óleos vegetais e as gorduras animais (biocombustíveis de 1º e 2º gerações). Porém, essas matérias-primas também podem ser utilizadas para consumo humano, o que pode aumentar o custo e dificultar sua utilização, pois a competição por terras aráveis destinadas ao cultivo de insumos alimentícios pode inviabilizar o processo.

Os biocombustíveis reduzem a emissão de CO₂, contribuem com a diminuição do aquecimento global e são apontados como a alternativa verde, a maneira "ecológica" de mover os veículos automotores. Porém, existe o outro lado, já que vastas áreas florestais são queimadas com toneladas de CO₂ liberadas para dar lugar à agroindústria. Além disso, os resíduos com elevadas cargas orgânicas geradas nos processos e a maneira como têm sido dispostos, muitas vezes causando impactos ambientais ao solo e aos ambientes aquáticos, enriquecem essa lista negativa.

Entretanto, a energia a partir da biomassa tem apresentado potencial de crescimento para os próximos anos, e uma alternativa que pode minimizar os impactos decorrentes da agroindústria são os biocombustíveis provenientes da biomassa algal (biocombustíveis de 3ª geração). As microalgas estão atualmente no foco das atenções por apresentarem produtividade muito mais elevada que os vegetais superiores, e ainda pela possibilidade da geração de coprodutos de interesse.

De um ponto de vista prático, as microalgas são microrganismos de fácil cultivo, podendo até mesmo ser cultivadas em efluentes com significativa disponibilidade de nutrientes, como é o caso da vinhaça, resíduo do processo sucro-alcóoleiro. Essa possibilidade é bastante favorável ao uso das microalgas, pois pesquisadores da área afirmam que a produção só será econômica e ambientalmente viável se associada ao tratamento de águas residuárias.

As microalgas utilizam a luz solar e convertem dióxido de carbono (CO₂) em biomassa de maneira eficiente. Sendo assim, a utilização de uma fonte de carbono é imprescindível ao sucesso do cultivo, visto que a biomassa de microalgas pode conter até mais do que 50% de carbono em peso seco.

Um fator limitante no processo é a não disponibilidade de concentrações apreciáveis de microalgas que sustentem exploração comercial. O cultivo em condições artificiais realizado em laboratório aparece como uma alternativa. Podem ser utilizados sistemas abertos (tanques abertos, lagoas de alta taxa), assim como sistemas fechados (fotobiorreatores e fermentadores). A viabilidade econômica para o cultivo em larga escala ainda é o grande desafio a ser superado.

No campo da biotecnologia, fotobiorreatores vêm sendo muito utilizados para o cultivo de microrganismos, e no caso das microalgas, estimulam de forma racional e sustentável o crescimento até a escala comercial. Várias configurações podem ser encontradas, com adaptações a diferentes níveis tecnológicos, porém poucos operam com as condições requeridas para o processo, o que gera demanda por estudos mais aprofundados da hidrodinâmica interna e dos fatores intervenientes.

O cultivo de *Chlorella sp.* visando produção lipídica é relatado com sucesso na literatura, pois esse gênero de microalga apresenta diversidade em termos de metabolismo e adaptação a fatores adversos impostos no processo da síntese lipídica. Nesse sentido, essa pesquisa buscou avaliar além da produção de lipídeos, a produtividade de biomassa de *Chlorella sp* em relação a diversos fatores e condições de cultivo. Também foi avaliado o cultivo com o objetivo de maximizar a produção de lipídeos e biomassa simultaneamente, esperando-se que os resultados obtidos e o conhecimento levantado auxiliem na orientação para o cultivo de microalgas com vistas à produção de biocombustíveis de 3ª geração, sobretudo biodiesel, aperfeiçoando as técnicas e os fatores envolvidos.

2. OBJETIVOS

✓ **Geral:**

O objetivo principal dessa pesquisa foi o cultivo da microalga *Chlorella sp.* em dois tipos de fotobiorreatores: airlif (transporte aéreo) e bags (variantes de fotobiorreatores de coluna vertical, fabricados em polietileno de baixa densidade) a fim de aumentar a produção e produtividade de biomassa e lipídeos, de acordo com os fatores estudados: nitrogênio, fósforo, enxofre e luz.

✓ **Específicos:**

- Investigar duas cepas de *Chlorella sp.* em relação à produtividade de biomassa e óleos em pequena escala;
- Modelar o crescimento da microalga em pequena escala, e posteriormente em cada fotobiorreator;
- Buscar, através de um experimento fatorial em pequena escala, pontos ótimos para: (i) produtividade de biomassa; (ii) síntese de lipídeos; e (iii) para os dois fatores simultaneamente.
- Reproduzir o ponto ótimo encontrado em (iii) nos fotobiorreatores;
- Comparar o cultivo nos dois fotobiorreatores em relação à produção de biomassa e lipídeos.
- Concluir sobre qual fotobiorreator se mostrou mais adequado ao cultivo de *Chlorella sp.* em relação aos fatores envolvidos e às respostas obtidas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Energia, perspectivas energéticas e questões ambientais.

Segundo Calijuri, Assemany e Santiago (2012), energia pode ser conceituada como a capacidade de realizar trabalho ou, ainda, como a capacidade de movimento. Este último é imprescindível no nosso cotidiano, e assim, o aproveitamento, a geração e a transformação de energia são considerados os principais componentes para o desenvolvimento social e econômico. Esses fatores provocam sérias implicações no meio ambiente, pois a sociedade humana depende, desde o início de seu desenvolvimento até os dias atuais, de energia para a sua subsistência.

A década de 70 figura é marcada por questionamentos e manifestações ecológicas, em nível mundial, que defendem a inclusão dos problemas ambientais na agenda do desenvolvimento das nações e das relações internacionais como um todo. O modelo de crescimento econômico adotado, que tem como base o setor industrial, traz como consequências o volume de efeitos desagregadores sobre os ecossistemas naturais. O progresso e expansão capitalista têm gerado um conjunto de impactos ambientais tidos como inevitáveis, impactos estes que passam a assumir a um novo patamar e a despertar atenção, interesse, e novos estudos. (LIMA, 1997).

Em 2008, foi estimado em 11. 295 milhões de toneladas equivalentes de petróleo o consumo anual de energia primária (aquela que está disponível na natureza antes de ser convertida ou transformada). Em relação aos combustíveis fósseis, o percentual foi de 88% (petróleo 35%, carvão mineral 29%, e gás natural 24%), mantendo-os no nível de combustíveis mais utilizados no mundo, enquanto a energia nuclear e a hidroeletricidade, tidas como fontes limpas e renováveis de energia, representaram, respectivamente, apenas 5% e 6% do total (BREENAM & OWENDE, 2009).

O consumo energético mundial só tende a aumentar e projeções revelam que ele irá triplicar até 2025 ultrapassando os 600 quadrilhões de KJ. Os principais fatores que sustentam a busca por fontes alternativas de energia são o crescimento da população, da economia, da tecnologia e da agricultura. A expectativa de vida dobrou nestes últimos dois séculos e projeções populacionais indicam que a população mundial irá aumentar de 6 para 11 bilhões neste século, e a demanda por energia aumentar 35 vezes no mesmo período (DEMIRBAS & DEMIRBAS, 2010).

Com todo o progresso tecnológico atual, as reservas potenciais, e a exploração de reservas não convencionais, como as de gás natural, existe uma alta probabilidade de que os combustíveis fósseis, aliados a segurança no seu fornecimento decorrente da evolução geopolítica ao longo da história, continuem a estar disponíveis por baixo custo durante um período de tempo considerável.

Porém, a potencial ameaça de mudanças climáticas globais tem aumentado, e a maior parte dessas mudanças tem sido atribuída à emissão de gases de efeito estufa, que já acarretam

consequências para o meio ambiente e para os seres vivos, colocando em questão o uso sustentável dos combustíveis fósseis, não só em relação à finitude dos recursos, mas também em relação aos efeitos negativos das emissões de CO₂ e outros gases tóxicos.

Nesse sentido, a sustentabilidade assume um papel norteador na gestão dos recursos naturais, e vai atuar desde a eficiência operacional, passar pela minimização do impacto ambiental, e chegar a considerações socioeconômicas, sendo todos estes interdependentes. (CALIJURI, ASSEMAN & SANTIAGO, 2012).

Diante desse cenário apresentado, não é novidade que há inúmeras pesquisas que têm levado países a investigar e desenvolver alternativas renováveis e potencialmente neutras em carbono.

Pesquisadores da área afirmam que o Brasil já é uma potência no setor de energia, destacando-se pela “renovabilidade” de sua matriz energética e pela grande produção de etanol, e sobressaindo-se pela capacidade de produzir energias renováveis tendo como base a hídrica, o que facilita a inserção de outras fontes.

Como perspectivas para o futuro, mesmo com os combustíveis fósseis ainda representando mais de 80% do fornecimento total de energia no mundo, há uma tendência de queda de produção e o desenvolvimento de novas fontes de energia graças a desenvolvimentos tecnológicos recentes (DEMIRBAS & DEMIRBAS, 2010).

O cenário global para energia renovável até 2040 é bastante promissor, e, segundo o Conselho Europeu de Energia (EREC, 2006), aproximadamente metade da oferta global de energia virá de fontes renováveis, como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Cenário global de energia renovável para 2040.

	2001	2010	2020	2030	2040
Consumo Total (Milhões de Tonelas equivalentes de petróleo)	10.038	10.549	11.425	12.352	13.310
Biomassa	1,080	1,313	1,791	2,483	3,271
Grandes hidrelétricas	22.7	266	309	341	358
Geotérmica	43.2	86	186	333	493
Pequenas centrais hidrelétricas	9,5	19	49	106	189
Eólica	4.7	44	266	542	688
Solar térmica	4.1	15	66	244	480
Fotovoltaica	0.2	2	24	221	784
Eleticidade solar térmica	0.1	0.4	3	16	68
Marinha (das marés, das ondas, do oceano)	0.05	0.1	0.4	3	20
Total de fontes de energia renovável	1,365.5	1,745.5	2,694.4	4,289	6,351
Contribuição das fontes de energia renovável (%)	13.6	16.6	23.6	34.7	47.7

Fonte: DEMIRBAS & DEMIRBAS (2010).

Dentro do universo das energias renováveis, a geração de energia através da **biomassa** aparece como uma das fontes mais promissoras e que apresenta alto potencial de crescimento nos próximos anos, diversificando a matriz energética, e trazendo como consequência menor dependência dos combustíveis fósseis. A diversidade em termos de origem e de tecnologias de conversão em produtos energéticos, o baixo custo de operação, implantação e manutenção de uma unidade de conversão, facilidade de armazenamento e transporte, e a possibilidade de reaproveitamento dos resíduos são os principais fatores que corroboram para tal fato. (CALIJURI, ASSEMANY & SANTIAGO, 2012).

3.2 Energia a partir da biomassa

Biomassa, segundo a Aneel (Agência Nacional de Energia Elétrica), é qualquer matéria orgânica que pode ser transformada em energia mecânica, térmica ou elétrica. De acordo com a sua origem, ainda segundo a Aneel, pode ser classificada como: florestal (madeira, principalmente), agrícola (soja, arroz e cana-de-açúcar, entre outras) e rejeitos urbanos e industriais (sólidos ou líquidos, como os resíduos sólidos). O potencial energético varia para cada tipo, e os derivados obtidos dependem tanto da matéria-prima utilizada, como da tecnologia de processamento para obtenção dos energéticos (Aneel, 2008).

Em 2010, a biomassa participou em cerca de **30%** da matriz energética brasileira, alcançando o posto de segunda principal fonte de energia, superada apenas pelo petróleo e seus derivados. Ocupou a mesma posição entre as fontes de energia elétrica de origem interna, respondendo por cerca de **4,7%** da oferta. Foi superada apenas pela energia hidráulica, responsável pela produção de 74% da oferta total (CALIJURI; ASSEMANY; SANTIAGO, 2012 apud Balanço Energético Mundial).

Da biomassa é possível obter energia elétrica e biocombustíveis, como o biodiesel e o etanol, cujo consumo é crescente em substituição aos derivados do petróleo. Se por um lado a biomassa é uma das fontes renováveis de energia mais promissoras para as próximas décadas, por outro, historicamente, tem sido pouco expressiva na matriz energética mundial, com dados de quantificação de usos imprecisos. De acordo com estudo feito em 2007 pelo *Survey of Energy Resources*, do *World Energy Council* (WEC), a biomassa respondeu com pouco mais de 1% da produção total de energia elétrica em 2005, com 183,4 TWh (terawatts-hora) produzidos (Aneel, 2008).

O biodiesel é um combustível produzido a partir de óleos vegetais ou de gorduras animais. Dezenas de espécies vegetais presentes no Brasil podem ser usadas na sua produção, entre elas: soja, dendê, girassol, babaçu, amendoim, mamona e pinhão-mansão. Entretanto, o óleo vegetal *in natura* é bem diferente do biodiesel, que deve atender à especificação estabelecida pela Resolução ANP nº 7/2008.

3.3 Biocombustíveis e o caso de sucesso do Brasil

Biocombustíveis são combustíveis alternativos que apresentam potencial para reduzir a dependência do uso de combustíveis fósseis (Demirbas, 2010). São derivados de biomassa renovável que podem substituir, parcial ou totalmente, os derivados de petróleo e gás natural em motores à combustão ou em outro tipo de geração de energia (ANP, 2010). Os custos com a produção podem variar significativamente a depender da matéria-prima utilizada, do processo de conversão, da escala de produção, e até mesmo da região (Demirbas, 2010).

Pioneiro no mundo, o Brasil ocupa uma posição almejada por muitos países que buscam fontes renováveis de energia, onde cerca de 45% da energia e 19% dos combustíveis consumidos no país já são derivados de fontes renováveis (ANP, 2010).

Desde 1º de janeiro de 2010, o óleo diesel comercializado em todo o Brasil contém **5%** de biodiesel. Esta regra foi estabelecida pela Resolução nº 6/2009 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), que aumentou de **4%** (B4) para **5%** (B5) o percentual obrigatório de mistura de biodiesel ao óleo diesel. Testes revelaram que esse percentual de biodiesel acrescentado ao diesel de petróleo não necessita de qualquer adaptação nos motores dos veículos, e a contínua elevação deste percentual demonstra o sucesso do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel e da experiência acumulada pelo Brasil na produção e no uso em larga escala de biocombustíveis (ANP, 2010).

O Brasil está entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo, com uma produção anual, em 2010, de 2,4 bilhões de litros e uma capacidade instalada, no mesmo ano, de cerca de 5,8 bilhões de litros (ANP, 2010). A Figura 1 mostra a evolução dos biocombustíveis no Brasil, com destaque para o etanol.

Figura 1 - Evolução dos biocombustíveis no Brasil. Fonte: ANP, 2010.

A biomassa utilizada como fonte de energia renovável não se limita às matérias-primas apresentadas anteriormente. Ao explorar a cadeia dos biocombustíveis, a biomassa de microrganismos fitoplanctônicos (basicamente composto por microrganismos capazes de realizar fotossíntese, em especial, microalgas eucarióticas e cianobactérias,) aparece também como uma alternativa. Esses microrganismos não necessitam de grandes áreas para cultivo, capturam CO₂ da atmosfera, possibilitam o aproveitamento de regiões desérticas e improdutivas, são caracterizados por taxas de crescimento bem superiores às das culturas terrestres, apresentando rendimento estimado de 20.000 a 80.000 litros de óleo por hectare/ano, o que é de 7 a 31 vezes maior que o rendimento do melhor vegetal vascular utilizado para tal fim, a palma (DEMIRBAS, 2011). Os altos teores de óleos e carboidratos (variam de acordo com a condição da cultura) a adaptação e a boa resposta a um espectro amplo de condições adversas, tais como temperatura, pH, nutrientes e incidência luminosa, enriquecem a lista de atributos desses microrganismos, que são atualmente o foco de inúmeras pesquisas espalhadas pelo mundo (MELO, 2010).

3.4 Microalgas

Microrganismos fotossintéticos; Seres capazes de se adaptar a uma diversidade de condições adversas; Seres encontrados tanto em ambientes terrestres como em ambientes aquáticos; Seres capazes de duplicar sua biomassa várias vezes em um mesmo dia; Seres capazes de produzir, em média, 15 vezes mais óleo por hectare do que as culturas terrestres; Microrganismos que podem ser cultivados em águas residuárias ricas em nutrientes. Essas são algumas das diversas características das microalgas, seres que estão em ascensão no que se refere à produção de fontes alternativas de energia.

O termo “algas” compreende um amplo grupo sem legitimidade taxonômica que em geral envolve organismos eucariontes fotossintéticos, excluindo-se os vegetais superiores. Os grupos mais numerosos de algas são as algas verdes (Chlorophyceae), as algas vermelhas (Rhodophyceae), as diatomáceas (Bacillariophyceae) e as algas marrons (Phaeophyceae). Uma discussão paralela se concentra em torno das cianobactérias (algas verdes-azuis), que apesar de serem classificadas no domínio das bactérias por serem procariontes, muitas vezes são consideradas como algas por sua capacidade fotossintética. Macro e microalgas são as duas categorias principais de algas de acordo com o tamanho das células.

Da mesma forma que os vegetais superiores, as algas utilizam-se da fotossíntese para converter energia solar em energia química, armazenando-a sob a forma de óleos, carboidratos e proteínas. Variando desde pequenas algas unicelulares até organismos multicelulares, algumas com formas bastante complexas e diferenciadas, as algas exigem três componentes principais para o seu crescimento: luz solar, dióxido de carbono e água.

Com o advento da Revolução Industrial no século XIX, o CO₂ que outrora foi armazenado juntamente com a transformação de organismos em combustíveis fósseis por processos geológicos na crosta terrestre, vem sendo liberado através da queima desses combustíveis

ocasionando um estado de excesso na atmosfera atual, contribuindo para o chamado efeito estufa. Hoje, é conhecido que cerca de 50% desse excesso é absorvido pelos oceanos, que funcionam como grandes reservatórios de CO₂, porém, não se sabe até quando os oceanos vão suportar a absorção desta grande quantidade de CO₂. As microalgas e as cianobactérias, assim como ocorreu no passado, apresentam potencial para através da fotossíntese captar CO₂ da atmosfera, liberar oxigênio, que é vital para a manutenção da vida no planeta, e assim, minimizar os efeitos negativos da liberação de grande quantidade de CO₂ na atmosfera (BRAGA et. al., 2003).

Além da capacidade de absorção do CO₂ excedente, segundo Demirbas (2011), as microalgas parecem ser a única fonte de biodiesel renovável que é capaz de atender a demanda global por combustíveis utilizados no setor de transportes. Porém, os custos de produção do biodiesel de microalgas ainda não o torna competitivo no mercado.

Desde o início do cultivo de microalgas em larga escala em meados da década de 40, a biomassa produzida vem sendo destinada às mais diversas aplicações comerciais, como produção de proteína unicelular, carotenóides, clorofila, enzimas, ésteres, antibióticos, hidrocarbonetos e vitaminas. Hoje, o principal interesse é o cultivo com vistas à produção de biocombustíveis, com destaques para o biodiesel e para o biohidrogênio.

Na maioria das tecnologias de conversão da biomassa microalgal o principal substrato para a produção de lipídeos são os carboidratos, ao mesmo tempo em que podem limitar o uso das microalgas nessas tecnologias. O alto conteúdo protéico das células de microalgas é outro fator que também pode limitar o uso da biomassa alga. Porém, a composição dessa biomassa pode ser modificada drasticamente com a utilização de várias técnicas de cultivo, que envolve, principalmente, limitação e/ou excesso de nutrientes, privação total de nutrientes, intensidade luminosa, pH, temperatura e as combinações destes e de outros fatores (MARKOU; ANGELIDAKI; GEORGAKAKIS, 2012).

Os lipídeos produzidos podem ser convertidos em biodiesel. Entretanto, utilizar microalgas para produzir biodiesel requer de 55 à 111 vezes mais nutrientes nitrogenados, mesmo com uma produção de óleo de 10 a 20 vezes maior que as culturas terrestres. (DEMIRBAS & DEMIRBAS, 2010).

A utilização da biomassa de microalgas tem várias vantagens sobre as culturas energéticas terrestres. A Tabela 2 mostra algumas das vantagens de se utilizar microalgas para a produção de biocombustíveis

Tabela 2- Vantagens na utilização de microalgas para a produção de biocombustíveis.

Vantagens	Referência
Alta taxa de crescimento, sendo muito superior àquelas apresentadas pelas culturas terrestres;	Demirbas, 2010.
Podem ser cultivadas em áreas impróprias para a agricultura;	Demirbas, 2010.
Alta eficiência na mitigação de CO ₂ ;	Demirbas, 2010.
Maior rentabilidade do que as culturas terrestres	Demirbas, 2010.
Organismos que apresentam maior eficiência na conversão da energia solar em energia química.	Markou; Angelidaki; Georgakakis, 2012
Não competem com as culturas aráveis por terras aráveis.	Markou; Angelidaki; Georgakakis, 2012
A fertilidade do solo não é requisito para o cultivo, visto que são cultivadas em meio aquático.	Williams & Laurens, 2010.
Podem ser cultivados com simples exigências nutricionais	Markou; Angelidaki; Georgakakis, 2012
Se forem utilizadas microalgas marinhas, não há a necessidade dos suplementos valiosos que são requeridos quando o cultivo é realizado em água doce.	Williams & Laurens, 2010.
O impacto ecológico negativo é bastante reduzido quando comparado com os vegetais superiores.	Williams & Laurens, 2010.
O cultivo pode ser realizado juntamente com o tratamento de águas residuárias.	Markou; Angelidaki; Georgakakis, 2012

De acordo com a Tabela 2, fica claro que as microalgas apresentam muitas vantagens em relação às culturas de vegetais superiores. Porém, também apresentam desvantagens, com destaque aos altos custos de produção em larga escala. Pesquisadores da área sugerem que o cultivo só será viável se acoplado com o tratamento de águas residuárias ricas em nutrientes.

Outro problema relacionado é a baixa concentração de microalgas no ambiente natural. Estresse nutricional, competição, predação e infestação de diversos gêneros de microalgas são os principais fatores relacionados à baixa concentração de microalgas na natureza, concentrações estas que não suportam exploração comercial. Porém, podem ocorrer naturalmente em concentrações maiores, ocasionando os chamados blooms ou florações.

As Figuras 2(a) e 2(b) mostram exemplos de ocorrência de grandes concentrações naturais de microalgas na natureza, retratando o fenômeno que ocorre nas montanhas do Colorado nos EUA, denominado de Neve Melancia, causado pela proliferação de *Chlamydomonas nivalis*.

Figura 2 (a) e 2 (b) - Fenômeno da "Neve Melancia" nas montanhas do Colorado (EUA) causado pela proliferação de *Chlamydomonas nivalis*. Fonte: REIS, 2011.

As Figuras 3 (a) e 3 (b) representam a ocorrência de uma floração de cianobactérias no reservatório de Barra Bonita no estado de São Paulo em fevereiro de 2014.

Figura 3 (a) e 3 (b) - Floração de algas no reservatório de Barra Bonita, São Paulo/Brasil. Fonte: Davi Gasparini Fernandes Cunha, 2014.

Ao longo dos anos, várias tentativas foram feitas com o intuito de explorar tecnologias de produção de microalgas como fonte de alimentos, alimentação, lipídios, vitaminas, pigmentos, fertilizantes, produtos farmacêuticos e outros produtos químicos especiais. Este interesse comum surgiu como resultado da necessidade de fornecimento de alimentos adicionais, aumentando os problemas de eliminação de resíduos e à escassez de matérias-primas e recursos energéticos.

Nesse contexto, métodos de produção de algas em larga escala foram desenvolvidos e dependem da interação de fatores internos e externos. Becker (2008) relata três tipos de sistemas que podem ser distinguidos de acordo com as matérias-primas utilizadas e com o fim a que se destina:

- (i) Sistemas nos quais a cultura é monoalgácea sem a presença de outros seres, usando água doce, nutrientes minerais e fonte de carbono adicional;
- (ii) Sistemas que utilizam águas residuárias sem o acréscimo de nutrientes e carbono externo. A população consiste de várias espécies de algas e uma grande quantidade de bactérias;
- (iii) Cultivo de algas em sistemas fechados sob energia solar ou luz artificial, com o crescimento em meio autotrófico preferido.

Esses tipos de cultivo distinguem-se entre si pelos tipos de fonte de energia e carbono utilizados. A depender do fim a que se destina e das respostas do cultivo, um ou outro é indicado. As principais fontes de energia e os principais produtos oriundos da biomassa algácea estão na Figura 4.

Figura 4 - Potenciais da biomassa algácea: fontes de energia, produtos e aplicações. Fonte: BECKER, 2008.

3.5 Fotossíntese e crescimento microalgal

O sítio onde acontece a fotossíntese é o cloroplasto, organela que está envolvida por uma dupla membrana e seu estroma contém um sistema de membranas formando tilacóides (com os pigmentos fotossintetizantes ativos), ribossomos, plasmídeos (o genoma dos cloroplastos) e diferentes inclusões (como depósitos de lipídeos e glicídeos). Nos tilacóides acontece a conversão de energia radiante em energia química. A condição prévia da fotossíntese é a absorção de energia radiante pelos cloroplastos. Os receptores de radiação da fotossíntese são as clorofilas. Em cianobactérias, algas vermelhas e criptomonadinos ocorrem também biliproteínas (ficocianina e ficoeritrina) (LARCHER, 2000).

A absorção da radiação depende em grande parte da concentração do pigmento fotossinteticamente ativo, que pode se tornar o fator limitante em condições de forte radiação.

Oxigênio e carbono assimilado são os produtos finais da fotossíntese, igualmente importantes para todos os seres vivos. (LARCHER, 2000). A respiração, forma eficiente de oxidação biológica como fonte de energia para o metabolismo e de constituintes estruturais da célula, tem como condição prévia o oxigênio; os carboidratos tornaram-se substratos universais para a respiração e o ponto de partida para diferentes biossínteses.

Durante o processo de assimilação de carbono, outros processos são observados (Figura 5), cada um influenciado por fatores internos e externos e que podem limitar o rendimento assimilatório como um todo.

Figura 5 - Processos de assimilação do carbono. Fonte: LARCHER, 2000.

3.5.1 Descrição do processo

No momento em que os cloroplastos absorvem a radiação fotossinteticamente ativa tem-se início o processo fotoquímico. A fixação do dióxido de carbono em seres autotróficos se dá em duas fases (LARCHER, 2000).

1ª Fase: A energia luminosa é assimilada pelos pigmentos coletores de luz de fotossistemas e direcionada para o centro de reação. No centro da reação, a energia de excitação é usada para gerar fluxo de elétrons.

2ª Fase: Durante a segunda fase os equivalentes redutores e ATP são consumidos nas reações do Ciclo de Calvin – Benson, que catalisa a síntese de carboidratos a partir de dióxido de carbono e água.

O processo fotossintético sofre interferência de vários fatores, e os nutrientes (excesso, limitação ou privação) gera respostas diversas. Nitrogênio, fósforo e enxofre são os elementos mais reportados na literatura quanto a mudanças no processo fotossintético, gerando diferentes respostas quanto à produção de lipídeos, hidrogênio, principalmente, e outros produtos.

3.6 Efeitos dos principais nutrientes no processo fotossintético

3.6.1 Nitrogênio

Em termos de importância quantitativa, o nitrogênio, ao lado do carbono, é o elemento mais importante na nutrição algal. Desempenha um papel fundamental na constituição de moléculas de elementos vitais aos seres vivos: proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas, enzimas, hormônios e pigmentos fotossintetizantes (clorofilas e ficobilinas), e para as algas, apresenta importância destacada por ser um constituinte de diversas substâncias do metabolismo primário (BRAGA, 2005).

Nitrato, nitrito e amônio são formas inorgânicas não assimiladas que podem ser encontradas no interior de células algáceas em concentrações bastante variáveis, e juntamente com a ureia, representam as formas nitrogenadas que podem ser utilizadas pelas algas como fonte de nitrogênio. Na prática, as fontes de nitrogênio mais utilizadas estão na forma de amônia ou ureia, pois não apresentam custos elevados em comparação ao nitrato e ao nitrito, além do nitrito ser tóxico em concentrações elevadas (LOURENÇO, 2006; BECKER, 2008). Lourenço (2006) apresenta concentrações de nitrito na faixa de 1,0 à 5,0 μM como toleráveis para absorção e assimilação por microalgas.

Em relação aos principais efeitos do nitrogênio no crescimento algal e na produtividade de lipídeos, se o fornecimento de nitrogênio é elevado no cultivo, é verificado aumento das concentrações de proteínas e clorofila nas células (LOURENÇO, 2006). Porém, se o fornecimento é limitado, a acumulação de grandes quantidades de compostos de carbono (produtos de reserva) como polissacarídeos e lipídeos, além da redução da concentração de proteínas e de clorofila são verificadas. (LOURENÇO, 2006; BECKER, 2008).

A Tabela 3 apresenta os efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio na composição de proteínas e lipídeos de *Chlorellavulgaris* e *Scenedesmus obliquus*.

Tabela 3 - Efeitos das diferentes concentrações de nitrogênio na composição química de *Chlorellavulgaris* e *Scenedesmusobliquus*.

	Fonte de Nitrogênio	0,00003%	0,0001%	0,003%	0,01%	0,03%	0,1%
A. Total de proteínas (% do peso seco)							
<i>Chlorellavulgaris</i>	NH ₄ Cl	7,79	11,1	19,9	28,9	31,2	-
<i>Scenedesmusobliquus</i>	NH ₄ Cl	9,36	9,43	22,0	33,2	34,4	-
<i>Chlorellavulgaris</i>	KNO ₃	12,6	6,75	14,5	30,7	31,1	32,2
<i>Scenedesmusobliquus</i>	KNO ₃	8,19	9,00	8,81	34,0	32,1	32,9
B. Total de lipídeos (% do peso seco)							
<i>Chlorellavulgaris</i>	NH ₄ Cl	52,8	41,8	20,2	14,1	11,8	-
<i>Scenedesmusobliquus</i>	NH ₄ Cl	34,6	33,1	21,7	23,0	22,4	-
<i>Chlorellavulgaris</i>	KNO ₃	57,9	62,9	42,7	22,0	21,8	22,6
<i>Scenedesmusobliquus</i>	KNO ₃	45,6	44,3	50,1	26,9	29,8	21,2

3.6.2 Fósforo

O fósforo, assim como o nitrogênio, são fatores limitantes do crescimento de vegetais, e para o fitoplâncton não é diferente. É o material genético constituinte das moléculas dos ácidos ribonucleico (RNA) e desoxirribonucleico (DNA). Sendo um macronutriente, e assim tendo uma proporção maior em relação aos outros elementos quando comparado com sua participação nas fontes primárias, o fósforo é, provavelmente, o fator mais limitante à produtividade primária, o que justifica sua importância ecológica. (BRAGA, 2005).

Segundo Becker (2008), o fósforo é o maior nutriente necessário para o crescimento normal das algas, pois é essencial para quase todos os processos celulares, tais como a biossíntese de ácidos nucleicos e a transferência de energia. ATP, açúcares fosfatados, ácidos nucleicos e fosfoenzimas são os principais componentes estruturais que apresentam fósforo em algas. Em razão da acumulação de energia em ATP, a assimilação do fósforo depende de luz (LOURENÇO, 2006).

Ortofosfato é a principal forma inorgânica de fósforo que é assimilada pelas algas. A concentração ótima do fósforo, assim como as concentrações toleráveis no meio, variam de espécie para espécie, mesmo com todos os outros elementos fornecidos em concentrações adequadas (BECKER, 2008). Microalgas possuem a capacidade de assimilar grandes quantidades de fósforo. Lourenço (2006) mostra que esses seres são capazes de assimilar entre 8 e 16 vezes a mais do que a necessidade mínima do elemento.

Em relação aos efeitos do fósforo, sob concentrações adequadas no cultivo, fosfatos inorgânicos são acumulados nas algas como polifosfatos em grandes grânulos, que são metabolizados na deficiência de fósforo. Entretanto, pH e concentrações de Na⁺, K⁺, Mg⁺ e variações de metais pesados no meio afetam a assimilação de fósforo pelas algas. Em condições

de limitação de fósforo, assim como acontece em meio sob limitação de nitrogênio, há uma tendência do acúmulo de grandes quantidades de lipídeos, ao passo que o conteúdo de proteína, clorofila e ácidos nucleicos diminui.

3.6.3 Enxofre

A principal forma de assimilação do enxofre pelos seres produtores é como sulfato inorgânico. Assim como o fósforo, é vital para todas as células, pois é o constituinte de alguns aminoácidos essenciais (metionina e cisteína), vitaminas, sulfolipídeos e etc.

A falta de enxofre no meio de cultura modifica de forma crucial o metabolismo celular, causando acúmulo de amido e inativação do fotossistema II e do ciclo de Calvin – Benson (ANTAL; KRENDELEVA. RUBIN, 2011). Segundo Antal, Krendeleva e Rubin (2011) a produção fotossintética de hidrogênio pela microalga *Chlamydomonas reinhardtii* pode ser sustentada a partir de uma enzima específica, (FeFe) – hidrogenase ((FeFe)-H₂ase), que está envolvida no processo de geração de hidrogênio.

3.7 Cultivo de Microalgas

As microalgas têm a capacidade de utilizar carbono tanto na forma orgânica, como na forma inorgânica, e as características de crescimento dependem significativamente das condições de cultivo. São relatados na literatura quatro tipos principais: autotrófico, heterotrófico, mixotrófico e fotoheterotrófico, que serão discutidos adiante. Na fotoautotrofia, a única fonte de energia é a luz, e a fonte de carbono deriva de compostos inorgânicos, em contraste com a heterotrofia, na qual tanto a fonte de carbono como a fonte de energia têm origens orgânicas. Na fotoheterotrofia, a fonte de energia é a luz, o que permite que as microalgas utilizem uma fonte orgânica de carbono. Já na mixotrofia, a principal fonte de energia é a luz, ainda que os compostos orgânicos e inorgânicos são essenciais.

Na Tabela 4 estão as principais características das condições de cultivo e os principais problemas associados quando há aumento de escala.

Tabela 4 - Comparação entre as características das diferentes condições de cultivo.

Condição de cultivo	Fonte de energia	Fonte de carbono	Densidade Celular	Reator	Custo	Problemas associados com aumento de escala
Fototrófico	Luz	Inorgânica	Baixa	Raceways ou fotobiorreatores	Baixo	Baixa densidade celular Alto custo de condensação
Heterotrófico	Orgânico	Orgânica	Alta	Fermentador convencional	Médio	Contaminação Alto custo do substrato
Mixotrófico	Luz e orgânico	Inorgânica e orgânica	Média	Fotobiorreator fechado	Alto	Contaminação Alto custo do equipamento Alto custo do substrato
Fotoheterotrófico	Luz	Orgânica	Média	Fotobiorreator fechado	Alto	Contaminação Alto custo do equipamento Alto custo do substrato

Fonte: Chen et al. (2011).

Atualmente, mesmo com a baixa densidade celular, o método que é mais técnico e economicamente viável para a produção em larga escala de biomassa de algas é a produção fotoautotrófica (BRENNAN & OWENDE, 2010).

O cultivo pode ser realizado em sistemas fechados (sem contato com a atmosfera) ou em sistemas abertos (em contato com a atmosfera). Nos abertos, as lagoas de alta taxa (raceways) são as formas mais conhecidas. Entre os fechados, os fotobiorreatores são os mais utilizados, e podem ter diferentes configurações, tais como: tubular, placas planas, verticais, helicoidais. Os sistemas fechados apresentam custos de produção bem mais elevados que os abertos, o que inviabiliza a sua ampliação para uma comparação de escala comparáveis com os abertos. Cada sistema é influenciado pelas características intrínsecas de cada cepa utilizada, bem como as condições climáticas e os custos associados.

3.7.1 Cultivo de microalgas em sistemas abertos

O cultivo de algas em sistemas abertos vem sendo utilizado desde a década de 50 (BOROWITZKA, 1999). Nos sistemas abertos podem ser utilizados águas naturais (lagos, lagoas) ou lagos artificiais (BREENAM & OWENDE, 2010). Os sistemas mais utilizados incluem grandes lagoas rasas, lagos circulares, e lagoas de alta taxa (Figura 6). Uma das principais vantagens de tanques abertos é que eles são mais fáceis de construir e operar do que a maioria dos sistemas fechados (UGWU et al., 2008). Entretanto, a ineficiência na utilização da luz, as perdas por evaporação, a difusão de CO₂ para a atmosfera, a necessidade de grandes áreas de terra e a alta contaminação são os principais fatores que limitam o uso desses sistemas.

As lagoas de alta taxa são os sistemas abertos mais antigos e mais simples para a produção em massa de microalgas. Vale ressaltar que até mesmo lagos/lagoas naturais podem ser utilizados para tal fim, como lagos da Ásia e da África, nos quais as microalgas ali presentes eram utilizadas como alimentos por povos nativos há vários séculos. Podem ser construídas, quando artificiais, desde escavação no solo e revestimento com material impermeável, até mesmo em concreto armado. Os nutrientes podem ser fornecidos através de água de escoamento de terras próximas ou canalizando a água de estações de tratamento de água e de esgoto, por serem efluentes ricos em nutrientes

Figura 6 - Vista superior de uma lagoa de alta taxa (raceway). O inóculo é introduzido após a roda de pás e completa um ciclo ao ser mecanicamente arejado com CO₂. Fonte: Adaptado de BREENAN e OWENDE, 2010.

A Figura 7 representa outra configuração para uma lagoa de alta taxa apresentada por Chisti (2007).

Figura 7 - Vista superior de outra configuração para uma lagoa de alta taxa. Fonte: Adaptado de CHISTI (2007).

As principais características desse tipo de sistema são:

- (i) A água (substrato), a alga e os nutrientes circulam em torno da lagoa, que tem o formato semelhante ao de uma pista de corrida, por isso a denominação *raceway*;
- (ii) O fluxo é mantido por um conjunto de pás que fazem com que a alga seja mantida em suspensão, e são circuladas de volta à superfície com uma frequência regular;
- (iii) A profundidade dos tanques/lagoas é pequena, em torno de 15 – 35 cm, para que a alga seja mantida exposta à luz e para que a luz possa penetrar em toda a profundidade da lagoa.

No que diz respeito à produtividade de biomassa, Breennan e Owende (2009) reuniram os trabalhos de vários pesquisadores e forneceram valores para o cultivo em sistemas abertos. Esses valores podem ser verificados na Tabela 5. Vale destacar a variabilidade de valores para uma mesma espécie de microalga.

Tabela 5 - Valores para a produtividade de biomassa de microalgas em sistemas abertos.

Microalga	$X_{\text{máx}}(\text{g L}^{-1})^*$	$P_{\text{máx}}(\text{g L}^{-1} \text{ dia}^{-1})^{**}$	Referência Original
<i>Chlorellasp.</i>	10	-	Setliket al. (1970)
<i>Chlorellasp.</i>	40	-	Doucha e Lívanský (2006)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	0,202	-	Huntley e Redalje (2007)
<i>Spirulina platensis</i>	-	0,18	Richmond et al. (1990)
<i>Spirulina platensis</i>	0,47	0,05	Jiménez et al. (2003)
<i>Spirulina platensis</i>	0,9	0,15	Pushparajet al. (1997)
<i>Spirulina platensis</i>	1,6	0,32	Pushparajet al. (1997)

Fonte: BRENNAN & OWENDE (2009).

* Concentração máxima de biomassa.

** Produtividade máxima de biomassa.

3.7.2 Cultivo de microalgas em sistemas fechados

Os sistemas fechados (fotobiorreatores) são utilizados para superar alguns dos principais problemas associados aos abertos, entre os quais pode-se citar a alta contaminação e difusão de CO_2 para a atmosfera. Existem várias configurações para os fotobiorreatores, dentre as quais podemos citar os tubulares verticais, tubulares horizontais, variantes de colunas verticais (bags), colunas de bolhas, airlift, placas planas e os helicoidais. As diferenças entre eles residem, principalmente, em seus formatos, no material de fabricação, caminho da luz e sistema de aeração. Algumas dessas configurações são apresentadas na Figura 8.

©

Figura 8 - Diferentes configurações de fotobiorreatores. (a) Fotobiorreator do tipo helicoidal. (b) Fotobiorreator tubular horizontal. (c) Visões frontal e lateral de um fotobiorreator de placas planas. Fonte: Adaptado de SINGH; SHARMA (2012).

Na tabela 6 são apresentados valores para a produtividade de biomassa de algumas espécies de microalgas em sistemas fechados (escalas laboratorial e comercial).

Tabela 6 - Valores para a produtividade de biomassa em sistemas fechados.

Microalga	Tipo de Reator	Volume (L)	$X_{\max}$ (g L ⁻¹)*	$P_{\max}$ (g L ⁻¹ dia ⁻¹)**
<i>Arthrospira</i>	Tubular	146	2,37	1,15
<i>Chlorella</i>	Placas planas	400	-	3,8
<i>Chlorella</i>	Placas planas	400	-	3,2
<i>Chlorellasorokiniana</i>	Tubular inclinado	6	1,5	1,47
<i>Haematococcuspluvialis</i>	Tubular paralelo	25	-	0,05
<i>Haematococcuspluvialis</i>	Coluna de bolhas	55	1,4	0,06
<i>Haematococcuspluvialis</i>	Airlift tubular	55	7	0,41
<i>Haematococcuspluvialis</i>	Placas planas	25	-	-
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Placas planas	440	-	0,27
<i>Phaeodactylumtricornutum</i>	Helicoidal tubular	75	-	1,4
<i>Phaeodactylumtricornutum</i>	Airlift tubular	200	-	1,2
<i>Phaeodactylumtricornutum</i>	Airlift tubular	200	-	1,9
<i>Porphyridiumcruentum</i>	Airlift tubular	200	3	1,5
<i>Spirulinaplantensis</i>	Tubular	5,5	-	0,42
<i>Tetraselmis</i>	Coluna	Ca. 1.000	1,7	0,42

* Concentração máxima de biomassa

** Produtividade máxima de biomassa.

Fonte: BRENNAN e OWENDE (2010).

Observa-se da Tabela 6 que os maiores valores para produtividade máxima de biomassa foram obtidos no cultivo de *Chlorella* em reatores de placas planas. Em relação ao *airlift*, os valores de produtividade de biomassa encontrados são satisfatórios em relação aos outros tipos de fotobiorreatores. Nessa pesquisa, foi estudado o cultivo de *Chlorella* spp. em *airlift*.

3.7.3 Comparação do cultivo em sistemas abertos e fechados

De acordo com Marta, Martins e Caetano (2010) os sistemas fechados são mais vantajosos se comparados aos abertos em vários aspectos, tais como: controle de contaminação, controle do processo, mistura, densidade de células algais, eficiência de utilização da luz, controle da temperatura, produtividade e concentração da biomassa, como pode ser observado na Tabela 7.

Tabela 7 - Comparação de sistemas abertos e fechados para a cultura de microalgas.

Fatores	Sistemas Fechados (FBRs)	Sistemas Abertos (Lagoas)
Controle de contaminação	Fácil	Difícil
Risco de contaminação	Reduzido	Alto
Esterilidade	Realizável	Nenhuma
Controle do processo	Fácil	Difícil
Controle das espécies	Fácil	Difícil
Mistura	Uniforme	Muito baixa
Regime de Operação	Batelada, semi- contínuo ou contínuo	Batelada, semi- contínuo ou contínuo
Espaço requerido	Em relação à produtividade	PBRs ~Lagoas
Relação Área/Volume	Alta (20-200 m ⁻¹)	Baixa (5 – 10 m ⁻¹)
População (densidade de células de algas)	Alta	Baixa
Investimento	Alto	Baixo
Custo de Operação	Alto	Baixo
Eficiência de utilização da luz	Alta	Baixa
Controle da temperatura	Temperatura mais uniforme	Difícil
Produtividade	3 – 5 vezes mais produtividade	Baixa
Perdas de água	-----	-----
Estresse hidrodinâmico na alga	Baixo – Alto	Muito baixo
Evaporação do meio de cultura	Baixo	Alto
Controle de transferência de gás	Alto	Baixo
Perdas de CO₂	Dependem do pH, alcalinidade, etc.	PBRs ~Lagoas
Inibição de O₂	-----	PBRs ~Lagoas
Concentração de biomassa	3 – 5 vezes em FBRs	PBRs ~Lagoas
Aumento de escala	Difícil	Difícil

Fonte: MARTA, MARTINS & CAETANO (2010).

Ainda se tratando de produtividade e concentração de biomassa, Reis (2011) fornece valores típicos para o escalonamento comercial, tanto para os sistemas abertos, como para os fotobiorreatores (Tabela 8).

Tabela 8 - Produtividade e concentração de biomassa em escala comercial.

	Sistemas abertos	Fotobiorreatores
Produtividade	0,025 kg. m ⁻³ . dia ⁻¹	1,535 kg. m ⁻³ . dia ⁻¹
Concentração	1 kg. m ⁻³ (típica de 0,5 kg m ⁻³)	4 kg. m ⁻³

Fonte: REIS (2011).

Dentre as configurações existentes, um dos fotobiorreatores mais utilizados é o airlift (transporte aéreo), por apresentar resultados satisfatórios para o cultivo de algumas espécies de microalgas.

A produtividade de um fotobiorreator deverá ser no mínimo igual à produtividade de uma lagoa aberta para este ser considerado adequado para o cultivo de microalgas, e estudos com airlift têm demonstrado essa adequabilidade.

3.8 Airlift

O airlift é um reator com duas zonas de interligação, sendo uma responsável por fornecer o gás. Geralmente, existem dois mecanismos de funcionamento: circulação interna e circulação externa. No reator de circulação interna, as regiões são separadas por um tubo de aspiração ou uma divisão no cilindro. Essa configuração com circulação interna permite classificar o airlift em reator interno de divisão interna, e reator com tubos concêntricos (Figura 9). No airlift com circulação externa, os tubos de elevação e de descida são diferentes, e separados fisicamente (SINGH & SHARMA, 2012).

A mistura nesse tipo de fotobiorreator é feita pela introdução do gás, o que vai gerar borbulhamento através de uma agitação física. Com isso, a densidade na parte ascendente diminui, fazendo com que o líquido se mova para cima (transporte aéreo). Na zona de desprendimento (zona superior), o gás deixa o líquido, e este último passará para a outra parte do reator, garantindo um fluxo (SINGH & SHARMA, 2012). A sedimentação da biomassa é impedida através da manutenção de fluxo altamente turbulento.

Figura 9 - Diferentes tipos de fotobiorreatores do tipo airlift. Para a pesquisa foi utilizado o airlift com circulação e divisão internas (à direita). Fonte: Adaptado de SINGH; SHARMA (2012).

Resultados significativos de produtividade em relação ao efeito da geometria (coluna de separação) no cultivo de *Porphyridium* são apresentados em Luo e Al-Dahhan (2011) quando comparados a outras configurações de airlift. Ainda em relação à produtividade, o trabalho de Cuaresma et al. (2011) (cultivo de *Chlorella sorokiniana*) mostra que fotobiorreatores verticais têm maiores produtividades por unidade de área. Já em relação ao consumo de energia, Jorquera et al. (2010) fornecem o valor de 55 W/m³ para este tipo de fotobiorreator, um valor relativamente baixo quando comparado aos 3000 W/m³ de fotobiorreatores tubulares horizontais.

Outros fatores importantes para o uso difundido do *airlift* são a área de superfície exposta à luz, e a relação superfície/volume. I. Rawat et al. (2013) afirmam que reatores tubulares são considerados adequados para se obter elevadas concentrações de biomassa de microalgas, por apresentarem grande área de superfície exposta à luz, e elevada relação superfície/volume. A Tabela 9 mostra essa relação para alguns estudos com airlift.

Tabela 9 - Relação superfície/volume utilizada em airlifts.

Relação superfície/volume	Referência
0,44 cm ⁻¹	Contreraset al. (1998)
0,57 cm ⁻¹	Kumar e Das (2012)

Fonte: I. RAWAT et. al. (2013).

Em suma, existem fotobiorreatores quase naturais, passando pelos de baixo custos, como as bags (simples bolsas de polietileno de baixa densidade), até os mais sofisticados e caros, fabricados com diversos materiais (PVC, vidro, acrílico, policarbonato), com diversas geometrias e

configurações. O que vai determinar a escolha é o objetivo a que se quer chegar, os recursos disponíveis, a disposição de área, tempo, entre outros fatores.

3.9 Aeração das culturas através de ar enriquecido com CO₂

Diante das emissões de CO₂, apontado como um dos principais gases causadores do efeito estufa, e que resulta de atividades humanas, a biofixação deste composto por microalgas tem recebido atenção considerável, pois a biomassa gerada serve de matéria-prima para a produção de biodiesel, e ainda pela possibilidade de gerar bioprodutos (YOO et al, 2010).

Em geral, para o crescimento da biomassa, constituída por cerca de 40-50% de carbono em peso seco, as microalgas dependem de uma fonte suficiente de carbono e luz para que a fotossíntese possa ocorrer (MATA, MARTINS, CAETANO, 2010).

Porém, para o sucesso da biofixação de CO₂ e da produção de biodiesel, as microalgas precisam ser classificadas de acordo com a sua taxa de crescimento, o teor de lipídios, e a tolerância a níveis elevados de CO₂ (YOO et al., 2010).

Chen et al., (2011) apresentam valores de produtividade de biomassa, conteúdo e produtividade de lipídios para algumas espécies de *Chlorella*, comparando as condições de cultivo com aeração enriquecida com CO₂, e aeração com ar não enriquecido, em sistemas fechados. Esses valores podem ser observados na Tabela 10.

Tabela 10 - Comparação de produtividades de culturas enriquecidas ou não com CO₂.

Microalga	Condição de cultivo	Produtividade de biomassa (g/L/d)	Conteúdo de Lipídios (% of DCW)	Produtividade de lipídios (mg/L/d)
<i>Chlorella emersonii</i>	Fotoautotrófico ^a	0,03 – 0,05	29,0 – 63,0	8,1 – 49,9
<i>Chlorella emersonii</i>	Fotoautotrófico ^b	0,04	25,0 – 34,0	10,3 – 12,2
<i>Chlorella Vulgaris</i>	Fotoautotrófico ^a	0,17	19,2	32,6
<i>Chlorella Vulgaris</i>	Fotoautotrófico ^b	0,02 – 0,04	28,0 – 58,0	11,2 – 13,9

^aEnriquecido com CO₂

Fonte: Chen et al. (2011).

^bAr

Pelos valores expostos na tabela 9, observa-se que quando uma cultura é enriquecida com CO₂, pode apresentar produtividade de biomassa até 4 vezes maior (*Chlorella vulgaris*) do que culturas que não são enriquecidas. Em relação aos lipídios, ainda segundo os autores, *Chlorella emersonii* pode chegar a apresentar aproximadamente 4 vezes mais produtividade, se, da mesma forma, for aerada com ar enriquecido com CO₂.

Em se tratando das porcentagens de CO₂ utilizadas, Tang et al. 2011 relataram que os crescimentos de *Chlorella* sp. e *Nannochloropsis oculata* foram completamente inibidos quando a concentração de CO₂ foi superior a 5%.

Brennan e Owende (2010) também mostraram produtividades de biomassa para espécies de *Chlorella* em sistemas fechados. Os valores são apresentados na Tabela 11, e a maior produtividade de biomassa observada foi para a concentração de 2%.

Tabela 11 - Produtividades de *Chlorella* em relação a porcentagens de CO₂ em fotobiorreatores.

Microalga	T (°C)	CO ₂ (%)	Produtividade de biomassa (g L ⁻¹ d ⁻¹)	Eficiência na utilização do carbono (%)
<i>Chlorella</i> sp.	26	1	0,682 ^a	-
<i>Chlorella</i> sp.	26	2	1,445 ^a	58
<i>Chlorella</i> sp.	26	5	0,889 ^a	27
<i>Chlorella</i> sp.	26	10	0,106 ^a	20
<i>Chlorella</i> sp.	26	15	0,099 ^a	16
<i>Chlorella kessleri</i>	30	18	0,087	-

^aCultura incubada de 4 – 8 dias.

Fonte: BRENNAN E OWENDE, (2010).

Analisando o trabalho de Tang et al. (2011), constata-se que as maiores produtividades de biomassa das microalgas *Chlorella pyrenoidosa* e *Scenedesmus obliquus*, aconteceram nas concentrações de 10% e 5%, respectivamente (Tabela 12).

Tabela 12 - Produtividades de *Chlorella pyrenoidosa* e *Scenedesmus obliquus* em relação a diferentes porcentagens de CO₂ (fotobiorreatores).

Concentração de CO ₂ (%)	<i>Chlorellapyrenoidosa</i>			<i>Scenedesmusobliquus</i>		
	X _{máx} * (g L ⁻¹)	P _{máx} ** (g L ⁻¹ d ⁻¹)	Taxa máxima de crescimento específico (d ⁻¹)	X _{máx} * (g L ⁻¹)	P _{máx} ** (g L ⁻¹ d ⁻¹)	Taxa máxima de crescimento específico (d ⁻¹)
0,03	0,87±0,01	0,065±0,007	0,688±0,028	1,05±0,02	0,083±0,002	0,507±0,009
5	1,44±0,01	0,133±0,011	0,993±0,052	1,80±0,02	0,158±0,006	0,943±0,021
10	1,55±0,01	0,144±0,011	0,993±0,082	1,84±0,01	0,155±0,004	0,087±0,012
20	1,22±0,08	0,121±0,005	0,909±0,043	1,65±0,01	0,134±0,001	0,780±0,089
30	0,95±0,05	0,075±0,002	0,532±0,024	1,03±0,06	0,081±0,002	0,544±0,089
50	0,69±0,01	0,054±0,003	0,326±0,037	0,82±0,06	0,056±0,004	0,299±0,007

* Concentração máxima de biomassa

** Produtividade máxima de biomassa.

Fonte: Tang et al. (2011).

3.10 Controle do pH, intensidade luminosa, temperatura, e oxigênio dissolvido.

O crescimento fotoautotrófico de microalgas em fotobiorreatores necessita de vários fatores importantes, tais como: pH, luz, nutrientes como N, P, Fe, e fonte de carbono, que geralmente é o CO₂. Quando há a captação de CO₂ e dos nitratos pela microalga, verifica-se aumento do pH da cultura (VALDÉS et al., 2012), sendo necessário o controle destas variáveis, e, pelo fotobiorreator ser um sistema fechado, esse controle é, em parte, facilitado.

O processo da fotossíntese gera oxigênio e a taxa máxima de geração em um fotobiorreator tubular típico não pode ultrapassar as 10g O₂.m⁻³.min⁻¹. Níveis de oxigênio dissolvidos que ultrapassem os valores de saturação do ar vão inibir a fotossíntese. Danos fotooxidativos às células das algas também são associados à combinação do excesso de oxigênio e alta luminosidade (CHISTI, 2007).

Segundo Ho et al. (2012), o intervalo de intensidade luminosa utilizado em seu trabalho para o cultivo de *Scenedesmus obliquus* foi de 180 a 250 μmol.m⁻².s⁻¹. Tang et al. (2011) utilizaram intensidade luminosa de 180 μmol.m⁻².s⁻¹ em seus experimentos visando obter respostas de *Chlorella pyrenoidosa* e *Scenedesmus obliquus* à injeção de diferentes níveis de aeração com ar enriquecido em CO₂. Além disso, o diâmetro do material do fotobiorreator não pode ser tal que não permita que a luz penetre na cultura densa, o que é necessário para assegurar produtividade elevada.

Nos trabalhos consultados, o pH variou entre 7 e 8,2 sendo este último o valor máximo admitido para otimizar a produtividade de biomassa.

Fotobiorreatores requerem controle da temperatura durante o dia, e também durante a noite, pois a perda de biomassa durante o período noturno devido ao processo de respiração celular pode ser reduzida com a diminuição da temperatura. Nos trabalhos analisados, a temperatura variou entre 20 e 30°C.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos desta pesquisa foram realizados no Laboratório de Biotoxicologia de Águas Continentais e Efluentes da Escola de Engenharia de São Carlos / Universidade de São Paulo (BIOTACE – EESC/USP).

A pesquisa se desenvolveu de acordo com o fluxograma experimental apresentado na Figura 10.

Figura 10 - Fluxograma experimental da pesquisa.

4.1. ETAPA 1 – Origem e axenização das cepas utilizadas na pesquisa

4.1.1. Origem das cepas

As cepas de *Chlorella sp.* utilizadas na pesquisa são oriundas do banco de microalgas e cianobactérias do BIOTACE da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo – USP (Tabela 13).

Foram previamente descritas como oleaginosas segundo testes de fluorescências para lipídeos neutros realizado por SANTOS (2013).

Tabela 13 - Cepas do banco de microalgas e cianobactérias do BIOTACE – USP utilizadas na pesquisa.

Ambiente	Código no banco de microalgas
Lago Fazenda São José – Ilícinia – MG	FAZ11
Lago Condomínio Dahma – São Carlos – SP	DAM 5% 04

4.1.2. Axenização das cepas de *Chlorella sp.*

A axenização das cepas se desenvolveu segundo o fluxograma apresentado na Figura 11.

A porcentagem de inóculo utilizada em toda a pesquisa foi de 5% de acordo com os obtidos por SANTOS (2013), onde essa concentração foi a que proporcionou a maximização simultânea dos parâmetros amplitude, velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e tempo de geração (T_g).

Figura 11 - Fluxograma experimental da primeira etapa da pesquisa.

Na pesquisa interessava o cultivo axênico da microalga para evitar competição por nutrientes e espaço, além de garantir que os resultados pudessem ser exclusivamente atribuídos à alga. As duas cepas estavam contaminadas com bactérias e para obtenção das culturas puras

foram aplicadas técnicas de purificação com o objetivo de gerar culturas viáveis e livres de outros seres ou espécies contaminantes.

Para a pesquisa foi utilizado o método físico com meio sólido. O meio de cultura utilizado nessa etapa foi o WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972) solidificado com Ágar (1%) e autoclavado por 20 minutos (121 °C). Segundo Lourenço (2006), esse método é o mais apropriado para purificação de culturas contaminadas com bactérias. A aplicação do método só não é viável quando a microalga não for apta a crescer em meio sólido.

Foram utilizadas duas técnicas de purificação, ambas descritas por Andersen (2005):

(i) Técnica 1 - Estriamento com o uso de alça de platina: estriamento de uma alíquota de 50 µL da cultura estoque em placa de Petri com meio de cultura WC solidificado com Ágar (1%).

(ii) Técnica 2 - Plaqueamento em meio sólido com o uso de alça de Drigalsky: espalhamento da mesma alíquota de cultura (50 µL) na placa de Petri também com meio de cultura WC solidificado com Ágar (1%).

A olho nu foi possível observar diferenças na coloração entre as colônias da microalga, o que pode estar associado a maior ou menor presença de clorofila. Para observação em lupa com aumento de 10 vezes, e com o objetivo de identificar colônias de bactérias (transparentes), foram selecionadas as colônias com coloração mais esverdeada e que estavam mais afastadas das demais.

Após seleção e observação das colônias na lupa, aquelas em que visualmente foi verificada a ausência de bactérias foram coletadas em capela de fluxo laminar com alça de platina, e depositadas em tubos de ensaio com meio de cultura WC enriquecido com peptona e glicose, indicadores da presença de bactérias pela turvação da cultura, ambos na concentração de 1 g/L.

Nas placas em que a presença de colônias visualmente livres de bactérias não foi detectada, novos plaqueamentos foram feitos.

O período de incubação das colônias nos tubos de ensaio foi de aproximadamente 1 semana (fotoperíodo 12/12 h; 24° C; 60 µmol fótons m⁻² s⁻¹), e após esse período, os tubos nos quais não foi verificada a turvação ou esbranquiçamento da cultura foram levados para a última fase desta etapa, a confirmação em microscópio Olympus BX 51. A cultura foi considerada axênica quando não foi verificada microscopicamente (aumento de 400 x) nenhum outro microrganismo além da microalga de interesse. Com essa confirmação partiu-se para a segunda etapa.

O meio de cultura utilizado nesta etapa da pesquisa foi o WC (GUILLARD & LORENZEN, 1972), cujas características são descritas na Tabela 14.

Tabela 14 - Composição do meio de cultura WC.

Componentes	Solução estoque (g.L ⁻¹ H ₂ O)	Volume para 1 L WC	Concentração final no meio (M)
NaNO ₃	85,01	1 mL	3,78 x 10 ⁻³
CaCl ₂ . 2H ₂ O	36,76	1 mL	4,13 x 10 ⁻³
MgSO ₄ . 7H ₂ O	36,97	1 mL	1,00 x 10 ⁻³
NaHCO ₃	12,6	1 mL	2,50 x 10 ⁻⁴
Na ₂ SiO ₃ . 9H ₂ O	28,42	1 mL	1,50 x 10 ⁻⁴
K ₂ HPO ₄	8,71	1 mL	1,50 x 10 ⁻⁴
Solução de traço de metais	Tabela 15	1 mL	1,00x 10 ⁻³
Solução de vitaminas	Tabela 16	1 mL	5,00 x 10 ⁻⁴⁵

As soluções de traço de metais e vitaminas são apresentadas nas Tabelas 15 e 16.

Tabela 15 - Composição da solução de metais do meio de cultura WC.

Componentes	Solução estoque (g.L ⁻¹ dH ₂ O)	Massa ou volume para 1 L WC	Concentração final no meio (M)
Na ₂ EDTA . 2H ₂ O	---	4,36 g	1,17 x 10 ⁻⁵
FeCl ₂ . 6H ₂ O	---	3,15 g	1,17 x 10 ⁻⁵
CuSO ₄ . 5H ₂ O	10	1 mL	4,01 x 10 ⁻⁸
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	22	1 mL	7,65 x 10 ⁻⁸
CoCl ₂ . 6H ₂ O	10	1 mL	4,2 x 10 ⁻⁸
MnCl ₂ . 4H ₂ O	180	1 mL	9,1x 10 ⁻⁷
Na ₂ MoO ₄	6	1 mL	2,48 x 10 ⁻⁸
H ₃ BO ₃	---	1 g	1,62 x 10 ⁻⁵

Tabela 16 - Composição da solução de vitaminas do meio de cultura WC.

Componentes	Solução estoque (g.L ⁻¹ H ₂ O)	Massa ou volume para 1 L WC	Concentração final no meio (M)
Thiamine.HCl (vitamin B ₁)	---	100 mg	2,96 x 10 ⁻⁷
Biotin (vitaminaH)	0,5	1 mL	2,05 x 10 ⁻⁹
Cyanocobalamin (vitamina B ₁₂)	0,5	1 mL	3,69 x 10 ⁻¹⁰

4.2. ETAPA 2

4.2.1. Monitoramento do crescimento da microalga

Nessa etapa optou-se por testar também o meio de cultura TAP (DE GORMAN; LEVINE, 1965), que tem sua composição descrita nas Tabelas 17, 18 e 19.

1. Solução de Sais

Tabela 17 - Composição da solução de sais do meio de cultura TAP.

Componentes	Solução estoque (g.L ⁻¹ H ₂ O)	Volume da solução para 1 L de TAP
NH ₄ Cl	15	25 mL
MgSO ₄ . 7H ₂ O	4	
CaCl ₂ . 2H ₂ O	2	

2. Solução de fosfato

Tabela 18 - Composição da solução de fosfato do meio de cultura TAP.

Componentes	Solução g.100mL ⁻¹ dH ₂ O)	Volume da solução para 1 L de TAP
K ₂ HPO ₄	28,8	0,375 mL
KH ₂ PO ₄	14,4	

3. Solução de traço de metais*

Tabela 19 - Composição da solução de metais do meio de cultura TAP.

Componentes	Massa utilizada (g)	Quantidade de água (mL)
Na ₂ EDTA	50 g	250
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	22 g	100
H ₃ BO ₃	11, 4	200
MnCl ₂ . 4H ₂ O	5,06 g	50
CoCl ₂ . 6H ₂ O	1,61 g	50
CuSO ₄ . 5H ₂ O	1,57 g	50
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ . 4H ₂ O	1,10 g	50
FeSO ₄ . 7H ₂ O	4,99 g	50
Volume da solução para 1 L de TAP	1mL	

*Adicionar 1,0 mL de ácido acético e 2,42 g de Tris para o preparo de 1 L de meio TAP.

Nitrogênio, fósforo e enxofre são os elementos de interesse para a pesquisa, e suas concentrações no TAP são 98 mg/L, 31 mg/L e 15,49 mg/L, respectivamente.

O monitoramento do crescimento da microalga foi realizado em tubos de 50 mL (volume final de 20 mL) por espectrofotometria de massa em espectrofotômetro DR 4000 (HACH) no comprimento de onda 683 nm (pico da clorofila - *a* após varredura realizada por SANTOS (2013). Os tubos foram mantidos em sala com temperatura controlada (24 °C, fixada para toda as etapas da pesquisa), fotoperíodo 12/12 h, 60 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

A princípio, foram realizadas leituras diárias (24 h) em horários padronizados. Posteriormente, de acordo com a velocidade de crescimento das cepas de *Chlorella*, o horário de leitura passou a ser de 12 em 12 h no meio das fases clara e escura, e fotoperíodo ajustado em incubadoras B.O.D. 411D (Nova Ética) (Figura 12).

Figura 12 - Monitoramento do crescimento em tubo com fotoperíodo ajustado em incubadoras B.O.D. 411D Nova Ética.

4.2.2. Modelagem do crescimento da microalga

Para melhor ajuste ao modelo, os dados obtidos no monitoramento do crescimento (absorbância) foram normalizados para escala logarítmica conforme recomendações de Zweitering et. al. (1990), utilizando-se a equação $Y = \ln (X/X_0)$, onde X é a biomassa no dia de interesse do cultivo e X_0 é a biomassa referente ao dia 0. A modelagem foi realizada através do software *Origin 8.0* usando o modelo de Benjamim Gompertz (1825). O modelo de Gompertz foi escolhido pela sua simplicidade, porém funcionalidade e adequação quando aplicado à microbiologia, para traduzir crescimentos celulares. É uma função exponencial dupla, que descreve uma curva sigmóide assimétrica, onde está imbutido o método de Lindeberg para ajuste das curvas. (Equação 01) (DALCANTON, 2010).

$$N = N_0 + a \cdot e\{-e^{[-b(t-c)]}\} \text{ (Equação 01)}$$

Ou, em termos de log:

$$\text{Log} N = N_0 + a \cdot e^{\{-e^{[-b(t-c)]}\}} \text{ (Equação 02)}$$

Onde **Log N** é o logaritmo decimal da densidade microbiana no tempo t; **N₀** é o valor da assíntota inferior (equivalente ao log da densidade microbiana inicial); **a** é o aumento da densidade microbiana (equivalente ao log da contagem microbiana máxima durante a fase estacionária menos o log da contagem inicial); **b** é a velocidade de crescimento relativa no tempo c; e **c** é o tempo requerido para alcançar a velocidade de crescimento máxima. Os parâmetros da função de Gompertz são os parâmetros a, b e c, e suas dimensões são, respectivamente, log (UFC/mL), adimensional e tempo.

A partir de a, b, c, os parâmetros cinéticos velocidade específica máxima de crescimento $\mu_{\text{máx}}$ (dia⁻¹) e tempo de geração foram calculados através das equações 03 e 04.

$$\mu_{\text{max}} = a \cdot b \cdot e^{-1} \text{ (Equação 03)}$$

$$\text{Tempo de geração} = \frac{\ln 2}{\mu_{\text{max}}} \text{ (Equação 04)}$$

A partir dos resultados obtidos e das análises estatística (ANOVA) seguida de teste Tukey para médias, p<0,05), a cepa que apresentou as maiores velocidades de crescimento nos meios testados foi escolhida para o prosseguimento da pesquisa.

4.2.3. Calibração das curvas de absorbâncias e sólidos

Regressões lineares entre absorbância e biomassa foram realizadas para estimativa da biomassa produzida pela cepa nessa etapa da pesquisa. Para as leituras de absorbâncias no espectrofotômetro foi incluído o comprimento de onda 550 nm, segundo recomendações de Becker (2008), e mantida a leitura no comprimento 683nm. A biomassa foi obtida por sólidos totais (APHA, 2005).

A calibração das curvas foi realizada em erlenmeyers de 2 L com volume de cultura de 1L, fotoperíodo ajustado nas incubadoras, 24° C e 60 μmol fótons m⁻² s⁻¹ (Figura 13).

Os meios de cultura também foram testados com a adição de glicose na concentração de 1 g/L como fonte orgânica de carbono. De acordo com os resultados e suas análises, o meio de cultura escolhido para as etapas posteriores foi o TAP com a adição de 1g/L de glicose, pois

apresentou maiores velocidades máximas específicas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e maior produtividade de biomassa.

Figura 13 - Calibração das curvas de absorbâncias e sólidos em erlenmeyers com 1 L cultura.

4.2.4. Seleção de fatores químicos para otimização do cultivo visando produtividade de biomassa e lipídeos totais.

Tendo o meio de cultura que apresentou maior produtividade de biomassa, foram realizados experimentos com o objetivo de selecionar os fatores químicos que apresentavam respostas significativas quanto à produtividade de lipídeos. A luz foi o único fator físico testado, ao passo que pH, temperatura e glicose foram mantidos constantes em 8,2, 24°C, e 1 g/L, respectivamente.

Após revisão da literatura, os fatores químicos testados e suas concentrações estão apresentados na tabela 20.

Tabela 20 - Fatores químicos e seus níveis estudados na pesquisa.

Fatores Químicos	Níveis
Químicos	
N – NH ₄ ⁺ (mg/L)	0 (0 mM), 4,9 (0,35 mM), 24,5 (1,75 mM), 49 (3,5 mM) 80,5 (5,75 mM) e 98 (7mM - padrão)
P – PO ₄ (mg/L)	31 e 62
S – SO ₄ ⁻ (mg/L)	0 e 15,49
Bicarbonato (mg/L)	1000
pH	8,2

Definidos os fatores e suas concentrações, as condições descritas na Tabela 21 foram testadas, à exceção das concentrações de nitrogênio que foram testadas à parte, e somente as concentrações de 98 (mg/L), 49 mg/L (padrão) e foram utilizadas juntamente com as concentrações definidas para os outros fatores.

Tabela 21 - Condições testadas de acordo com os fatores químicos definidos.

Condição	Meio de Cultura	Fonte Orgânica De Carbono	N –NH₄⁺	Bicarbonato	P-PO₄⁻	S – SO₄⁻¹
01	TAP	Glicose (1 g/L)	49 mg/L	1 g/L	31 mg/L	15,49 mg/L
02	TAP	Glicose (1 g/L)	98 mg/L	1 g/L	31 mg/L	15,49 mg/L
03	TAP	Glicose (1 g/L)	49 mg/L	1 g/L	62 mg/L	15,49 mg/L
04	TAP	Glicose (1 g/L)	49 mg/L	0 g/L	31 mg/L	15,49 mg/L
05	TAP	Glicose (1 g/L)	98 mg/L	0 g/L	31 mg/L	15,49 mg/L
06	TAP	Glicose (1 g/L)	49 mg/L	1 g/L	62 mg/L	15,49 mg/L
07	TAP	Glicose (1 g/L)	49 mg/L	1 g/L	62 mg/L	0 mg/L
08	TAP	Glicose (1 g/L)	49 mg/L	1 g/L	62 mg/L	0 mg/L

A quantificação de lipídeos foi feita de modo indireto através da fluorescência de lipídeos neutros. No início da fase estacionária do cultivo, as culturas foram coradas com corante Vermelho do Nilo para leitura em fluorômetro 10 AU (Turner Designs) de acordo com o protocolo estabelecido e adaptado de Chen, Sommerfeld e Hu (2011) e apresentado no trabalho de Santos (2013).

4.2.5. Otimização do cultivo

Definidos os fatores relevantes na etapa anterior, partiu-se para a otimização do cultivo. Foi utilizado um planejamento fatorial completo (1 bloco) com 4 fatores e 2 níveis (2⁴) gerando 16 unidades experimentais, executadas em triplicata, com a adição de 6 pontos centrais, totalizando

54 unidades experimentais (Figura 14). As respostas avaliadas foram as produtividades de biomassa e a fluorescência de lipídeos neutros.

Os fatores e níveis investigados estão dispostos na Tabela 22.

Tabela 22 - Fatores e Níveis utilizados no Experimento Fatorial.

Fatores	Níveis		
	Mínimo	Máximo	Central
Luz ($\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	60	200	130
Nitrogênio N - NH_4^+ (mg/L)	49	98	73,5
Fósforo P - PO_4^- (mg /L)	31	62	46,5
Enxofre S - SO_4^- (mg/L)	0	15,49	7,745

O modelo gerou pontos ótimos para a produtividade de biomassa, fluorescência de lipídeos neutros, e para ambos. Os resultados foram validados experimentalmente a fim de se avaliar a exequibilidade do modelo.

O ponto ótimo para a biomassa foi o escolhido para dar continuidade à pesquisa, pois na terceira etapa outro fator foi estudado, a adição de CO_2 ao cultivo em média escala realizado em fotobiorreatores de 10 L. A escolha se deu com o objetivo de avaliar a resposta que a adição do gás carbônico traria na produtividade de lipídeos tomando como base o ponto ótimo da biomassa.

Figura 14 - Experimento Fatorial realizado em tubos com 20 mL de cultura.

4.3. ETAPA 3 –Cultivo em média escala utilizando-se fotobiorreatores de 10 L

Na última etapa da pesquisa, o cultivo na condição otimizada para a produtividade de biomassa foi realizado em fotobiorreatores de 10 L, mantendo-se a proporção de 5% de inóculo. Os fotobiorreatores utilizados foram do tipo *airlift* e *bags* (*triplicata*).

O meio de cultura foi autoclavado em galões de vidro com volume total de 9 L (Pyrex) e 8 L de volume utilizado (Figura 15). Devido ao aumento de volume do meio de cultura, estes foram autoclavados por 70 minutos (121 °C). Os experimentos foram realizados de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 16.

Figura 15 - Preparo de meio de cultura em galões Pyrex de 9 L.

Figura 16 - Fluxograma experimental da terceira etapa da pesquisa.

4.3.1 - Descrição dos Fotobiorreatores

A esterilização dos reatores foi feita com hipoclorito de sódio (10%) seguido de aeração com tiosulfato de sódio (Andersen, 2005). Foram escolhidos para a pesquisa dois tipos de fotobiorreatores:

(i) **Bags:** Bolsas de polietileno de baixa densidade já fabricadas e vendidas comercialmente, com largura de 35 cm e altura de 74 cm quando vazias. Esse tipo de reator foi escolhido pela sua simplicidade, com custo muito baixo quando comparado ao airlift.

Um suporte de metal resistente com barras removíveis e móveis foi construído para as *bags*. Fita Hallerman foi utilizada para fixação das *bags* nas barras (Figura 17).

(a)

(b)

Figura 17 (a) - Vista frontal do suporte para as *bags*. (b) - Vista lateral superior mostrando as barras removíveis e os suportes para as barras.

(ii) **Airlift (transporte aéreo):** Reator de acrílico, que pode ser modificado para diferentes configurações a partir de uma chapa opaca removível localizada em seu centro (Figura 18).

As dimensões do reator foram definidas de forma que o volume de operação fosse o mesmo das *bags*, o que gerou uma relação superfície/volume de $0,24 \text{ cm}^{-1}$.

Figura 18 - Projeto do airlift. Material de fabricação do reator, entrada e saída de substrato, entrada e saída do gás, ponto com abertura para entrada de sensores e aspectos construtivos.

O volume total do reator foi de aproximadamente 13,6 L calculado a partir da fórmula de volume para um cilindro:

$$Volume_{cilindro} = \text{Área da base}(\pi \times \text{raio}^2) \times \text{altura} \text{ (Equação 05)}$$

$$Volume_{reator} = \pi \times (0,085m)^2 \times 0,6m = 0,0136 m^3 = 13,6 L \text{ (Equação 06)}$$

A Figura 19 mostra os fotobiorreatores em operação.

Figura 19 - Fotobiorreatores utilizados na pesquisa na operação.

4.3.2 –Sistema de Injeção dos Gases

Para que a aeração dos reatores fosse possível, duas redes de gases foram instaladas no laboratório (ar atmosférico e CO₂). A rede de ar atmosférico foi composta de duas partes, uma externa ao laboratório, com um compressor Schulz (vazão:10 pés/min; capacidade: 200 litros; potência do motor: 2 hp) e tubulação em cobre; e uma parte interna, em Poliuretano com regulador de pressão. (Figura 20).

Figura 20 - (a) Compressor utilizado. (b) Tubulação em cobre externa ao laboratório. (c) Regulador de pressão e tubulação de Poliuretano antes da passagem por filtros de ar e óleo.

Filtros de ar e filtros de óleo (hb ar comprimido PURO) modelos A₁ 0010G, A₄ 0010G e A₅ 0010G (carvão ativado) foram implantados na rede para que o ar pudesse ser mantido o mais puro possível minimizando o risco de contaminação das culturas (Figura 21). Além disso, filtros de 0,2 µm (Midisart 2000, Sartorius Stedim) foram colocados na tubulação imediatamente antes da entrada nos reatores.

Figura 21 - Conjunto de filtros em sequência (A1 0010G, A4 0010G e A5 0010G (carvão ativado) utilizados para filtração do ar atmosférico.

Para a rede de CO₂ foi utilizada tubulação em aço inox para evitar oxidação do material e dióxido de carbono super seco (cilindro de 25 kg, pureza > 99,9%). (Figura 22).

(a)

(b)

Figura 22 - (a) Cilindro de CO₂. (b) Final da tubulação em cobre externa ao laboratório.

Da mesma forma que para a rede de ar atmosférico, regulador de pressão e filtros 0,2 µm (Midisart 2000, Sartorius Stedim) também foram instalados na rede de CO₂.

Para controle da vazão dos gases nos fotobiorreatores foram utilizados fluxômetros de precisão, sendo 10 L.min⁻¹ para o ar atmosférico e 100 mL.min⁻¹ para o CO₂. (Figura 23).

Figura 23 - (a) Regulador de pressão para o CO₂. (b) Fluxômetros para controle da vazão de entrada nos fotobiorreatores.

O fornecimento de luz necessária à fotossíntese foi realizado por lâmpadas fluorescentes (OSRAM 20 W) fixadas a uma estrutura de madeira com capacidade para 13 lâmpadas. Foram utilizadas 2 estruturas (uma para cada o *airlift* uma para as bags) com um total de 26 lâmpadas. (Figuras 24).

Figura 24 - (a) Estrutura de madeira para fixação das lâmpadas fluorescentes coberta com papel alumínio para maior dissipação da luz. (b) Estrutura com as lâmpadas em funcionamento.

4.3.3–Coleta de amostras e análises físico-químicas.

Nesta etapa, o período de coleta de amostras dos fotobiorreatores foi a cada 0,5 dias até que o cultivo chegasse à fase estacionária. Oxigênio dissolvido, pH e absorvância foram medidos logo após cada coleta, com posterior filtração para quantificação da biomassa (sólidos suspensos

totais) e clorofila *a*. O filtrado foi armazenado em potes plásticos e imediatamente congelado (-20 °C) para análises de nutrientes e DQO.

Espectrofotômetro DR4000 (HACH) equipado com luz UV, sistema Buchi automatizado (Digestor automático k-438, Unidade Kjeldahl Automática k-370 e Scrubber B 414) foram utilizados para as análises espectrofotométricas, NTK e N-NH₄, respectivamente. Oxímetro DM4 (Digimed) e pHmetro TEC- 2mp (Tecnal) foram utilizados para medidas de oxigênio dissolvido e pH.

Os métodos utilizados para cada umas das análises físico-químicas estão na Tabela 23 com as devidas referências.

Tabela 23 - Variáveis e Métodos para as análises físico-químicos.

Variáveis	Métodos	Referência
Temperatura	Termo-resistivo	-
Oxigênio Dissolvido (mg.L ⁻¹)	Potenciométrico	-
pH	Potenciométrico	APHA (2005)
SST	Gravimétrico – Método 2540D	APHA (2005)
P-PO ₄	Espectrofotométrico – Método 4500 P E – Ácido ascórbico	APHA (2005)
N-NH ₄	Método 4500NH ₃ B – Destilação e Método 4500NH ₃ C - Titulométrico	APHA (2005)
DQO	Colorimétrico – Método 5220D – Refluxo fechado	APHA (2005)

4.3.3 – Determinação da biomassa e análises bioquímicas

O monitoramento da biomassa nessa etapa foi realizado com determinação de sólidos suspensos totais (APHA, 2005) e clorofila *a* (NUSH, 1980 modificado por NEDERLANDSE NORM, 1981).

Para obtenção da biomassa seca necessária à caracterização bioquímica de *Chlorella* na fase estacionária do cultivo, amostras retiradas dos fotobiorreatores foram submetidas à centrifugação em frascos Nalgene em centrífuga de bancada 5204R (Eppendorf) por 10 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a biomassa enxaguada com solução de NaCl (9%) no mesmo volume da amostra. Após o enxágue, a biomassa foi transferida para cadinhos de porcelana mantidos em estufa por 24 horas sob temperatura de 60 °C para secagem. Após a secagem, a biomassa seca foi macerada e mantida sob congelamento em frascos de vidro (-20°C) até o momento das análises para caracterização bioquímica.

Análises de proteínas, carboidratos, lipídeos totais e cinzas foram realizadas de acordo com os métodos expostos na Tabela 24, e as porcentagens das substâncias foram calculadas em relação à biomassa seca.

Tabela 24 - Variáveis bioquímicas e métodos.

Variável	Método	Referência
Proteínas	NTK com fator de conversão para proteínas de 4,71 sugerido para microalgas (LOURENÇO et. al., 2007)	APHA (2005)
Carboidratos	Método do Fenol	Dubois et. al. (1956)
Lipídeos totais	Método adaptado	Folch, Lees e Stanley (1957)
Cinzas	Sólidos suspensos orgânicos	APHA (2005)

O protocolo para extração e determinação de lipídeos totais adaptado de Folch, Lees e Stanley (1957) é apresentado também no trabalho de SANTOS (2013). Vale ressaltar que o protocolo foi estabelecido após sucessivos testes com diversos solventes e reagentes de lise celular, como explicado pelo autor.

4.3.4- Análise dos dados

Inicialmente, foram coletados dados de absorbância, sólidos suspensos totais, e clorofila-a. Os dados de absorbância foram normalizados e curvas de crescimento foram traçadas. A modelagem do crescimento foi realizada através do modelo de Benjamim Gompertz (1825) no software *Origin 8.0*. Uma regressão linear com os dados de absorbância e sólidos suspensos totais também foi realizada para a conversão de absorbância em biomassa.

As produtividades dos reatores foram calculadas a partir dos dados de sólidos totais e clorofila-a relacionados com o tempo ao término de cada cultivo. Serão comparadas com a análise de variância ANOVA seguida do teste de Turkey. Em todos os testes estatísticos utilizados para o tratamento dos resultados, o software utilizado foi o Origin Pro 8.0, e para indicar diferença significativa dos resultados, foi adotado $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. ETAPA 1 – Origem e axenização das cepas utilizadas na pesquisa

As técnicas utilizadas para purificação das cepas foram eficientes na obtenção de cepas puras de *Chlorella sp.*, e assim, puderam ser obtidas culturas monoalgais que são caracterizadas pela ausência de qualquer outro organismo (confirmação microscópica), e assim, até o final da segunda etapa, os resultados obtidos puderam ser atribuídos apenas à alga estudada. A Figura 25 mostra fotomicrografias das cepas após a aplicação de todos os procedimentos referentes à primeira etapa. Pode-se observar somente a presença de colônias da microalga de interesse.

Figura 25 - Fotomicrografias de colônias e células de *Chlorella sp.* onde observa-se a pureza das culturas. Aumento de 400x. Células no 3º dia do cultivo realizado em meio WC enriquecido com peptona e glicose (1 g/L).

A partir da obtenção das culturas puras da microalga partiu-se para a segunda etapa da pesquisa, o monitoramento do crescimento em tubos Pyrex com 20 mL de cultura, pH 8,2, temperatura de 24 °C e 60 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de radiação luminosa, de acordo com os resultados apresentados no trabalho de Santos (2013).

5.2. ETAPA 2 – Monitoramento do crescimento das cepas de *Chlorella sp.*

O monitoramento do crescimento nesta etapa foi realizado primeiramente no meio WC padrão. Logo após, foi adicionado 1 g/L de glicose como fonte orgânica de carbono e também foi testado o meio TAP padrão e TAP com adição de glicose na mesma concentração de 1 g/L. Foram construídas curvas de crescimento relacionando a absorbância normalizada ($\ln X/X_0$) e o período de monitoramento (dias) no software *Excel 2013*. A modelagem do crescimento para obtenção dos parâmetros de crescimento e posterior cálculo das velocidades específicas de crescimento e de seus tempos de geração também foi realizada. Esse monitoramento teve por objetivo escolher, dentre as duas cepas estudadas, a que apresentasse as maiores velocidades específicas de crescimento e os menores tempos de geração.

5.2.1 – Cepa DAM 5%04

Na Figura 26 estão apresentadas as curvas de crescimento da cepa DAM 5% 04, com os dados de absorbâncias em escala logarítmica, monitorados no comprimento de onda 683 nm (pico da clorofila).

Figura 26 - Curvas de crescimento da cepa DAM 5% 04 nos meios WC padrão (em azul) e WC com adição de glicose como fonte orgânica de carbono (em vermelho). Barras verticais indicam desvio padrão (n=3).

Analisando o gráfico, observa-se que a adição de glicose acelera o crescimento, que chegou à fase estacionária por volta do 6º dia de cultivo, além de diminuir a amplitude de crescimento, que é o maior valor de crescimento final. Na cultura sem a adição de glicose, após

22 dias de monitoramento ainda não tinha se estabelecido a fase estacionária e maior amplitude de crescimento foi verificada. Consta-se também que as culturas não apresentaram as fases lag e de senescência, e que maiores amplitudes de crescimento não significaram maiores quantidades de biomassa produzidas, pois os dados de absorbância estão normalizados por X_0 , e assim, não é possível fazer essa relação entre amplitude e biomassa final.

A modelagem das culturas com a função de *Gompertz* revelou-se satisfatória, o que confirma a adequação dessa função para traduzir crescimentos celulares. Na Figura 27 (a) e 27(b) estão as curvas de crescimento e de ajuste do modelo com seus respectivos valores de R^2 quadrados. Melhor ajuste foi verificado no cultivo com adição de glicose (Figura 27 (b)).

Figura 27 (a) e 27(b) – Curvas obtidas na modelagem no software Origin 8.0 através da função de Gompertz. (a) Curva em meio WC padrão. (b) Curva em meio WC com adição de 1 g/L de glicose.

Os parâmetros de Gompertz obtidos no modelo, a velocidade máxima específica de crescimento e o tempo de geração para os meios WC padrão e WC com adição de glicose estão contidos na Tabela 25.

Tabela 25 - Parâmetros da Função de Gompertz, velocidade máxima específica de crescimento e tempo de geração para a cepa DAM 5% 04 no meio WC padrão.

Parâmetro de Gompertz		Velocidade específica de Crescimento (UFC mL ⁻¹ dia ⁻¹)	Tempo de geração (tempo)
Meio WC padrão			
a	2,37171	0,30	2,28
b	0,64739		
c	1,39888		
Meio WC com adição de glicose		1,23	0,57
a	2,3412		
b	0,59342		
c	1,43057		

Analisando as velocidades de crescimento para a cultura com glicose, observou-se que estas quadruplicaram em relação ao meio WC padrão, passando de 0,30 para 1,23 (UFC mL⁻¹ dia⁻¹), confirmando a constatação visual feita através das curvas de crescimento, com o adiantamento da fase estacionária. Para o tempo de geração, observa-se que este diminuiu 4 vezes em relação ao meio WC padrão.

O carbono, ao lado do nitrogênio e do fósforo, é o principal limitante do crescimento das microalgas, pois pode participar de até 50% da constituição do peso seco da célula algal. Esse fato pode explicar a maior quantidade de biomassa obtida nas culturas com adição de carbono em comparação com as que não o tem.

5.2.2 – Cepa FAZ₁₁

As curvas de crescimento da cepa FAZ₁₁ estão representadas na Figura 28.

Figura 28 - Curvas de crescimento da cepa FAZ₁₁ nos meios WC padrão (em azul) e WC com adição de glicose como fonte orgânica de carbono (em vermelho). Barras verticais indicam desvio padrão (n=3).

Da mesma forma, a adição de glicose na cultura também acelerou o crescimento da microalga, que chegou à fase estacionária por volta do 9º dia de crescimento. A fase estacionária para o cultivo sem glicose, com os mesmos 22 dias de monitoramento, também não foi bem definida. As fases lag e de senescência também não foram verificadas para as culturas, e em relação às amplitudes de crescimento, foram mais próximas em comparação com as da cepa DAM 5%₀₄, que apresentaram mais disparidade entre si.

A modelagem do crescimento através da função de Gompertz também foi realizada, e, assim como para a outra cepa estudada, demonstrou-se satisfatória. A curva de crescimento e a

curva de ajuste estão apresentadas na Figura 29(a) e 29(b). Observa-se ainda que o meio WC se ajustou melhor ao crescimento dessa cepa quando comparada à outra (maior R quadrado).

Figura 29 (a) e 29 (b) – Gráfico apresentando o ajuste dos dados ao modelo de Gompertz e o valor de R quadrado para a cultura em meio WC padrão.

Os parâmetros de *Gompertz* obtidos na modelagem, suas respectivas velocidades de crescimento e os tempos de geração são apresentados na Tabelas 27 para ambos os cultivos.

Tabela 26 - Parâmetros da Função de Gompertz e velocidades máximas específicas de crescimento para a cepa FAZ 11 no meio WC padrão e no meio WC + glicose.

Parâmetro de Gompertz (Meio WC padrão)		Velocidade específica de Crescimento (UFC/mL)/tempo	Tempo de geração (tempo)
a	3,17908	0,27	2,65
b	0,22342		
c	4,63866		
Parâmetro de Gompertz (Meio WC com adição de glicose)		Velocidade específica de Crescimento (UFC/mL)/tempo	Tempo de geração (tempo)
a	2,86749	0,47	1,48
b	0,44173		
c	3,15813		

O crescimento da $\mu_{\max}$ constatado para a cepa DAM 5%₀₄ quando da adição da glicose não foi verificado aqui, onde as velocidades da cepa FAZ₁₁ passaram de 0,27 para 0,47 ((UFC/mL)/tempo), valores abaixo das velocidades alcançadas pela cepa DAM 5%₀₄, que

apresentou velocidades que superaram em até 4 vezes as velocidades obtidas pela cepa FAZ₁₁ nos mesmos meios de cultura testados. A produção de biomassa não foi avaliada nesta etapa, pois mesmo que a cepa FAZ₁₁ produzisse maior quantidade de biomassa, de acordo com os resultados apresentados anteriormente, levaria o quádruplo do tempo para essa produção ocorrer. Pelas velocidades e pelos tempos de geração encontrados, a escolha da cepa DAM 5%₀₄ já se justificaria. Porém, as cepas ainda foram avaliadas no meio TAP.

5.2.3 – Monitoramento das cepas no meio TAP

O meio WC é um meio genérico, com a possibilidade de adaptação de vários gêneros de microalgas, o que o torna limitante. A utilização do meio TAP teve o intuito de avaliar outro meio de cultura bastante difundido na literatura. Os crescimentos das cepas também foram estudados nos meios TAP padrão e TAP com adição de glicose.

Para fins de comparação e padronização do cultivo em relação ao inóculo, o meio WC com adição de glicose também foi utilizado. As curvas de crescimento com os dados de absorbância normalizados para a cepa DAM 5%₀₄ estão apresentadas na Figura 30.

Figura 30 - Curvas de crescimento da cepa DAM 5%₀₄ nos meios TAP padrão (em vermelho), TAP + glicose (1 g/L) (em azul) e WC + glicose (1 g/L) (em cinza). Barras verticais indicam desvio padrão (n=5).

Analisando as curvas, observa-se que o meio TAP apresentou as maiores amplitudes de crescimento, e que a fase estacionária foi melhor definida na cultura em meio WC enriquecido com glicose com certa estabilidade observada em meados do 6º dia de cultivo. Para as culturas em meio TAP padrão e TAP com adição de glicose, até o último dia de observação, não foi verificada

estabilidade no crescimento das culturas. Da mesma forma que para os cultivos anteriores, não foram observadas fases lag e de senescência para nenhuma das culturas. A Figura 31 apresenta as curvas de crescimento e as curvas de ajustes com seus respectivos R quadrados para ambos os cultivos.

Figura 31 (a) e 31 (b) – Gráficos apresentando o ajuste dos dados ao modelo de Gompertz e o valor de R quadrado para a cultura em meio TAP (a) e TAP + glicose (b).

As curvas para o meio TAP também se ajustaram ao modelo, com melhor ajuste observado no meio TAP padrão.

Na Tabela 27 são apresentados os parâmetros de Gompertz, as velocidades específicas de crescimento e os tempos de geração para os cultivos.

Tabela 27 - Parâmetros da Função de Gompertz e velocidades máximas específicas de crescimento para a cepa DAM 5%04 no meio TAP padrão.

Parâmetro de Gompertz (Meio TAP padrão)		Velocidade específica de Crescimento (UFC/mL)/tempo	Tempo de geração (tempo)
a	2,64174	0,76	0,91
b	0,76342		
c	0,83416		
Parâmetro de Gompertz (Meio TAP + glicose)		Velocidade específica de Crescimento (UFC/mL)/tempo	Tempo de geração (tempo)
a	2,64174		

B	0,76342	0,64	1,08
C	0,83416		

Já para a cepa FAZ₁₁ o cultivo também foi analisado no meio TAP padrão para sustentar ainda mais a escolha da cepa DAM 5%₀₄. Na Figura 32 está a curva de crescimento da cepa no meio de cultura TAP padrão e mais uma vez a curva de crescimento do cultivo da cepa no meio WC + Glicose para comparação.

Figura 32 – Curva de crescimento da cepa FAZ 11 no meio TAP padrão. Barras verticais indicam desvio padrão (n=5).

Observa-se nesta condição o aparecimento de uma pequena fase lag (adaptação) no primeiro dia de cultivo, e o início da estabilização do crescimento após o 15º dia de cultivo, que foi praticamente o dobro do observado na cepa DAM 5%₀₄. A velocidade específica de crescimento e o tempo de geração da cepa FAZ₁₁ no meio TAP são apresentados na Tabela 28.

Tabela 28 - Parâmetros da Função de Gompertz e velocidades máximas específicas de crescimento para a cepa DAM 5%₀₄ no meio TAP padrão.

Parâmetro de Gompertz (Meio TAP padrão)		Velocidade específica de Crescimento (UFC/mL)/tempo	Tempo de geração (tempo)
A	3,13026	0,38	1,81
B	0,33186		
C	4,98734		

A velocidade específica de crescimento ficou abaixo das observadas na cepa DAM 5%04, ao mesmo tempo em que o tempo de geração ficou acima dos observados também para a cepa DAM 5%04. A curva de crescimento e a curva ajustada pela modelagem do crescimento estão apresentadas na Figura 33.

Figura 33 - Gráfico apresentando o ajuste dos dados ao modelo de Gompertz e o valor de R quadrado para a cultura em meio TAP da cepa FAZ 11.

Após o monitoramento do crescimento das cepas, a modelagem dos crescimentos e os resultados de velocidades específicas de crescimento e tempos de geração, estes foram compilados e estão apresentados na Tabela 29.

Tabela 29 - Compilação das velocidades de crescimento e tempos de geração obtidos através dos parâmetros gerados na modelagem com a função de Gompertz.

Cepa / Meio de cultura	Velocidade específica de Crescimento (UFC/mL)/tempo	Tempo de geração (tempo)
Cepa DAM 5%04		
WC padrão	0,30	2,28
WC + glicose	1,23	0,57
TAP padrão	0,76	0,91
TAP + glicose	0,64	1,08
Cepa FAZ₁₁		
WC padrão	0,27	2,65
WC + glicose	0,47	1,48
TAP padrão	0,38	1,81

Em suma, como os critérios para escolha da cepa foram **as maiores velocidades específicas de crescimento** e os **menores tempos de geração**, o que é imprescindível para a utilização na produção de biocombustíveis, pois busca-se maiores produtividades em menores tempos, a cepa DAM 5%₀₄ foi a escolhida para o prosseguimento da pesquisa.

5.2.4 - Curvas de Calibração Sólidos x Absorbâncias

Escolhida a cepa que apresentou as maiores velocidades de crescimento e os menores tempos de geração, partiu-se para a calibração (regressão linear) entre as curvas de Sólidos Suspensos Totais (SST) e Absorbâncias nos meios WC + glicose (1 g/L), TAP e TAP + glicose (1g/L). Diante dos resultados obtidos anteriormente, o meio WC padrão não foi mais utilizado com substrato. No monitoramento do crescimento nos tubos apenas o comprimento de onda 683 nm foi utilizado para a leitura das absorbâncias. Para as curvas de calibração, além do 683 nm, também foi utilizado o comprimento de onda 550 nm com o intuito de comparar os resultados e ter uma conclusão sobre tais comprimentos.

5.2.4.1 - WC + glicose (550 nm)

As regressões lineares para a cepa DAM 5%₀₄ no meio WC com adição de glicose são apresentadas nas Figuras 34, 35, 36 e 37.

Figura 34 - Regressão linear entre SST(mg/L) e absorbâncias (550 nm) da cepa DAM 5%₀₄ no meio de cultura WC + glicose.

Nessa condição o teor máximo de sólidos obtidos figurou na faixa dos 550 mg/L, de acordo com a Figura 39. Observa-se que os últimos pontos da curva são os referentes ao início da fase exponencial, e ficaram próximos uns dos outros pelo fato de não ocorrer acréscimo significativo de biomassa nessa fase do crescimento, onde os nutrientes já se encontram limitados. Esse fato faz com que haja diminuição do R quadrado ajustado e perda da linearidade. Optou-se pela eliminação

desses pontos, o que acarretou diminuição da absorbância limite para leitura, que para este caso ficou na faixa de 1,500. Leituras de amostras com absorbâncias superiores a esse valor, foram diluídas com o intuito da leitura compreender-se na faixa ajustada. A nova curva de ajuste e o novo R quadrado se encontram na Figura 35.

Figura 35 - Regressão linear entre SST(mg/L) e absorbâncias (550 nm) da cepa DAM 5%04 no meio de cultura WC + glicose com a eliminação dos últimos pontos visando a não perder a linearidade.

5.2.4.2 - WC + glicose (683nm)

Da mesma forma que para o comprimento de onda 550 nm, foi realizada a calibração no comprimento de onda 683 nm. A Figura 36 representa a regressão linear para este caso.

Figura 36 - Regressão linear entre SST(mg/L) e absorbâncias (683nm) da cepa DAM 5%04 no meio de cultura WC + glicose.

Os últimos pontos também foram eliminados, a absorbância limite para leitura também ficou na faixa dos 1,500, e a nova regressão pode ser observada na Figura 37.

Figura 37 - Regressão linear entre SST(mg/L) e absorbâncias (683 nm) da cepa DAM 5%04 no meio de cultura WC + glicose com a eliminação dos últimos pontos.

5.2.4. 3 – TAP e TAP + glicose

Mesmo procedimento foi utilizado para as curvas de calibração nos meio TAP e TAP + glicose. As regressões foram compiladas e são apresentadas nas partes da Figura 38, assim como os respectivos valores de R quadrado.

(a) TAP padrão (550 nm)

(b) TAP padrão (683 nm)

Figura 38 (a), (b), (c), (d), (e) e (f) – Curvas de calibração entre SST (mg/L) e Absorbância e seus reajustes. (a) TAP Padrão (550 nm) (b) TAP Padrão (683 nm) (c) TAP + Glicose (550 nm) (d) TAP + Glicose (550 nm) reajustada. (e) TAP + Glicose (683 nm) (f) TAP + glicose (683 nm) reajustado.

O meio TAP padrão foi o único em que a regressão linear apresentou-se satisfatória em sua íntegra, não necessitando de reajustes, o que não verificado para as regressões quando da adição de glicose ao meio.

De acordo com os resultados obtidos, o comprimento de onda 550 nm foi adotado para os próximos passos da pesquisa. Essa escolha foi feita para evitar a interferência do pigmento clorofila nas medições, pois com as limitações de nutrientes impostas, a quantidade de pigmento celular poderia ser afetada e, conseqüentemente, as medições realizadas.

Em relação à biomassa, os maiores resultados foram obtidos no meio TAP com adição da fonte orgânica de carbono (glicose), que chegou a ultrapassar 1000 mg/L de sólidos (1,090 g/L), valor altamente considerável quando comparado aos obtidos em outras pesquisas da área. Os valores (média; n=3) para as concentrações de sólidos obtidos estão apresentados na Figura 39.

Figura 39 - Sólidos Dissolvidos Totais para os meios de cultura testados. Barras verticais indicam desvio padrão (n=3).

De acordo com a Figura 39, o meio TAP com adição de glicose apresentou o dobro da quantidade de biomassa do meio TAP padrão, sendo assim, o meio escolhido para o prosseguimento da pesquisa foi o TAP com adição de glicose.

Finda esta etapa, foram escolhidos a melhor cepa em relação a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}), e ao tempo de geração, e o meio de cultura com maior produtividade de biomassa. A partir desse ponto foram testadas as condições para a produção de lipídeos através da fluorescência de lipídeos neutros com o meio TAP + glicose sendo o meio base, porém, o meio TAP padrão também foi estudado com o intuito de avaliar se a glicose atua como um fator limitante e/ou indutor na acumulação de lipídeos, como será discutido mais adiante.

5.2.5– Produção de lipídeos

Vários são os fatores conhecidos e reportados na literatura que podem induzir a acumulação de lipídeos nas células de microalgas, e entre eles, limitação de nitrogênio, excesso de fósforo, bicarbonato de sódio e privação de enxofre foram os escolhidos e testados na pesquisa. Mesmo com a escolha do meio TAP com adição de glicose para o prosseguimento das investigações, o meio TAP padrão também foi testado. Vale ressaltar aqui, que a fonte orgânica de carbono no meio TAP padrão é o acetato, e que com a adição de glicose, esta também passa a ser uma fonte de carbono para o meio.

5.2.5.1 – Limitação de Nitrogênio no meio TAP padrão

A limitação de nitrogênio como fator que gera grande acumulação de óleos pelas microalgas é bastante difundida na literatura científica da área. Foram testadas as concentrações dispostas no subitem 4.2.5 da seção 04.

A Figura 40 mostra as curvas de crescimento nas condições de limitação de nitrogênio estudadas.

Figura 40 - Curvas de Crescimento da cepa DAM 5%04 no meio TAP sob limitações de nitrogênio. Barras verticais indicam desvio padrão (n=3).

O nitrogênio é fonte para proteínas e organelas essenciais à vitalidade das células, fato que justifica o menor crescimento observado nas menores concentrações de nitrogênio (0 mM e 0,35 mM), ao passo que a fluorescência para lipídeos neutros foi maior nas concentrações de nitrogênio limitadas em torno da metade da concentração padrão do meio TAP, entre 1,75 e 5,75 mM (Figura 41).

Também é relatado na literatura que quanto maior o tempo de permanência da cultura na fase estacionária, maior será o acúmulo de óleos nas células, pois os nutrientes já estarão assimilados de acordo com a capacidade da alga, e novas estratégias para estoque de energia precisam ser desenvolvidas. Uma das estratégias adotadas é a acumulação de lipídeos. Por esse fato, a análise de fluorescência foi realizada em duas etapas, a primeira com a duração de 6 dias, pois de acordo com as curvas de crescimento, é o dia em que a alga adentra na fase estacionária, e a segunda consistiu em 13 dias de cultivo, tempo em que a alga já estará com a fase estacionária bem definida (estacionária tardia). Para tanto, as triplicatas das culturas foram duplicadas, onde

um conjunto de triplicata foi analisado no primeiro período (6 dias), e o outro conjunto no segundo período (13 dias).

A Figura 41 apresenta os valores de fluorescências para o 6º dia de cultivo nas condições de limitação de nitrogênio.

Figura 41 - Fluorescência de lipídeos neutros para as limitações de nitrogênio nos dois períodos de tempo estudados (6 e 13 dias). Barras verticais indicam desvio padrão (n=3).

Como era esperado, as fluorescências no segundo período de cultivo foram maiores, sobretudo nas concentrações 1,75 mM, 5,75 mM e 7mM (padrão). A partir desses resultados pôde-se inferir que a acumulação de óleos é maior para concentrações mais elevadas de nitrogênio, não obtendo o efeito esperado para concentrações muito baixas, ou seja, limitar nitrogênio impulsiona maior acumulação de óleo, porém, pelo papel fundamental exercido por este elemento, é necessário que haja uma quantidade significativa no meio de cultura.

5.2.4.2 – Limitação de Nitrogênio no meio TAP com adição de glicose (1g/L)

No subitem anterior, o acúmulo de óleo pela limitação de nitrogênio foi realizado no meio TAP padrão, cuja fonte de carbono é o acetato. Agora, além do acetato, entra a glicose como outra fonte orgânica de carbono, e a investigação dos seus efeitos aliada à limitação de nitrogênio pôde ser realizada.

As curvas de crescimento para essa nova condição são apresentadas na Figura 42.

Figura 42 - Curvas de Crescimento da cepa DAM 5%04 no meio TAP + glicose sob limitações de nitrogênio. Barras verticais indicam desvio padrão (n=3).

Fato curioso observado é o comportamento da curva na concentração 5,75 mM, tanto para o TAP sem glicose, como para o TAP com glicose. A sua fase exponencial de crescimento difere das demais, sendo inferior até um patamar em que ultrapassa as outras concentrações e chega na posição esperada, que é abaixo da concentração imediatamente superior, 7mM. Parece que há uma adaptação à limitação imposta, que vai até aproximadamente o 7º dia de cultivo. Para as concentrações mais baixas (0; 0,35; e 1,75 mM) observa-se menor amplitude de crescimento, com o início da fase estacionária adiantado em relação às demais. Esse fato pode ser explicado pela quantidade escassa de nitrogênio no meio de cultura, que é essencial para a maioria das funções vitais. Além disso, quando da realização dos experimentos, observou-se que as culturas com concentrações mais baixas apresentaram tom de verde bem mais claro que as concentrações mais altas, o que é caracterizado pela pouca produção de clorofila, que por ser um pigmento protéico (proteína), necessita de nitrogênio em quantidades adequadas para a sua síntese.

Os resultados para as fluorescências no meio TAP + glicose encontram-se na Figura 43.

Figura 43 - Fluorescência de lipídeos neutros para as limitações de nitrogênio nos dois períodos de tempo estudados (6 e 13 dias). Barras verticais indicam desvio padrão (n=3).

Os gráficos foram compilados para melhor visualização e comparação (Figura 44). Percebe-se que a glicose teve influência na síntese lipídica, e que todos os valores de fluorescência ficaram em um patamar próximo que variou entre 0 e 1 u.a.

Figura 44 - Comparação entre as fluorecências de lipídeos neutros para as limitações de nitrogênio nos dois períodos de tempo e meio estudados (6 e 13 dias). Barras verticais indicam desvio padrão (n=3).

Em detrimento ao que foi verificado no meio TAP padrão, a presença de glicose parece inibir o acúmulo de óleos, assim como, de alguma forma, interfere na influência da concentração de nitrogênio na síntese lipídica. No segundo período de cultivo, também não foram verificadas grandes modificações no processo de acumulação de lipídeos. Pode-se observar que houve um pequeno aumento nas concentrações intermediárias, mas nada que possa efetivamente caracterizar um acúmulo significativo.

Ainda em relação à glicose como fonte orgânica de carbono, se para a produtividade de biomassa ela foi muito significativa, a ponto de quadruplicar as velocidades específicas de crescimento da microalga, e dobrar a quantidade de biomassa produzida, para o acúmulo de lipídeos ela não apresentou o mesmo efeito, como comentado anteriormente.

No entanto, um dos focos principais da pesquisa é maximizar a quantidade de biomassa produzida pela alga, o que justifica a escolha do meio TAP com a adição de glicose, mesmo com os efeitos negativos em relação aos lipídeos. Sobre este fato, é relatado na literatura científica que o cultivo de microalgas com vistas à produção de biomassa concomitantemente à produção de lipídeos ainda não apresentou resultados satisfatórios. No entanto, é apontado o cultivo em duas fases como possível solução, ou seja, um processo que envolve primeiramente uma condição otimizada para biomassa que depois será transferida (geralmente por centrifugação) para outra condição otimizada em lipídeos, processo que já é feito na produção de hidrogênio, transferindo-se a biomassa de uma fase aeróbia para uma fase anaeróbia (sem enxofre).

Os próximos subitens dizem respeito aos outros fatores testados quanto à acumulação de lipídeos.

5.2.4.3 – Bicarbonato, Fósforo e Limitação de Nitrogênio no meio TAP com adição de glicose (1 g/L)

As condições testadas também foram apresentadas no subitem 4.2.5 seção 04. Foram divididas em dois blocos, o primeiro em relação ao efeito do bicarbonato e do fósforo associados à limitação de nitrogênio. O outro bloco esteve focado somente no enxofre e será discutido no subitem 5.2.4.3.

As curvas de crescimento para as condições que envolvem bicarbonato, fósforo e limitação de nitrogênio estão apresentadas na Figura 45.

Figura 45 - Curvas de Crescimento da cepa DAM 5%04 no meio TAP + glicose sob diferentes concentrações de Bicarbonato, Nitrogênio e Fósforo. Barras verticais indicam desvio padrão (n=3).

É sabido que bicarbonato em altas concentrações torna-se tóxico para a maioria das microalgas de água doce, porém, para microalgas marinhas adaptadas a altos teores de sais, apresenta efeito significativo em relação ao acúmulo de lipídeos, como relatado por White et.al (2002). Para a concentração testada, em relação ao efeito na biomassa, foi a condição que apresentou os maiores desvios padrões, não mantendo um padrão de crescimento em todos os tubos, e sendo ainda a condição que apresentou a menor produção de biomassa.

Contudo, quando o cultivo foi realizado na presença de bicarbonato juntamente com a limitação de nitrogênio (3,5 mM), ou com o dobro da quantidade de fósforo (62 mg/L) foram observados efeitos nas curvas de crescimento (maiores amplitudes).

As fluorescências para as condições testadas nesse bloco estão apresentadas na Figura 46. Nesta feita, só foi possível realizar cultivo em 6 dias, e assim o acúmulo com o passar da fase estacionária não foi avaliado.

Figura 46 - Fluorescência de lipídeos neutros para as condições que envolvem diferentes concentrações de Bicarbonato, Nitrogênio e Fósforo. Barras verticais indicam desvio padrão (n=3).

Em relação à fluorescência de lipídeos, a condição com bicarbonato como fonte de carbono foi a que apresentou as menores fluorescências. Entretanto, as maiores fluorescências foram obtidas nas condições com bicarbonato associado ao fósforo em excesso e limitação de nitrogênio (3,5 mM).

Diante do que foi exposto, pode-se concluir que bicarbonato atuando sozinho (na concentração testada) não apresentou resultado relevante ao que estava sendo buscado, porém, quando associado aos outros fatores foram responsáveis pelas maiores fluorescências observadas.

Em relação ao nitrogênio, a fluorescência obtida na concentração de 3,5 mM foi maior que o controle e que as outras concentrações limitantes testadas no meio TAP com adição de glicose (já discutidas). Mesmo fato foi observado para o fósforo, que quando teve sua concentração dobrada e associada aos outros fatores apresentou maiores fluorescências em relação ao meio controle. Mesmo com o resultado do bicarbonato não sendo satisfatório, não se pode atribuir ao fósforo ou ao nitrogênio o efeito observado, pois interações entre esses elementos e o bicarbonato podem ter ocorrido, o que requer mais estudos. Contudo, a concentração de nitrogênio que limita o seu valor à metade do padrão e a concentração de fósforo que eleva o seu valor ao dobro da encontrada no meio padrão foram incluídas no experimento fatorial, pois de qualquer forma foram as que apresentaram os melhores resultados, aliado ao fato de que o cultivo apenas com o bicarbonato foi a condição que apresentou o resultado menos significativo.

Na terceira etapa da pesquisa, o cultivo em fotobiorreatores de 10 L, o CO₂ foi o fator diferente a ser estudado, e esse teste com bicarbonato atuou como uma prévia ao que viria adiante, pois o CO₂ quando dissolvido em águas será regido pelo equilíbrio carbonato, que, de acordo com o pH do meio, pode ser deslocado para carbonato ou bicarbonato; Os resultados obtidos puderam servir de indício para o que foi obtido quando do cultivo com adição de CO₂, que será discutido nos resultados da 3ª etapa.

O último elemento a ser testado foi o enxofre e os resultados estão dispostos no subitem 5.2.4.3.

5.2.4.3 – Privação de Enxofre nos meios TAP padrão e TAP com adição de glicose (1 g/L)

A retirada total de enxofre no cultivo de microalgas está associada à produção de hidrogênio em anaerobiose, pois no processo fotossintético sob essa condição uma nova rota metabólica é seguida, rota esta que envolve a enzima hidrogenase. Ainda são poucos os trabalhos que envolvem a privação de enxofre na acumulação de lipídeos, um dos pontos onde essa pesquisa pode contribuir com o levantamento de novas informações.

As curvas de crescimento para o cultivo realizado na ausência de enxofre estão apresentadas na Figura 47. Novamente, para efeito de comparação dos resultados obtidos, as condições controles foram monitoradas a partir de um mesmo inóculo.

Figura 47 - Gráfico apresentando o ajuste dos dados ao modelo de Gompertz e o valor de R quadrado para a cultura em meio WC padrão.

As fluorescências para os lipídeos neutros (6 e 13 dias) são apresentadas na Figura 48.

Figura 48 - Fluorescência de lipídeos neutros em condições de privação de enxofre (6 e 13 dias). Barras verticais indicam desvio padrão (n=3).

A diferença entre as fluorescências para o cultivo realizado em 13 dias foi ainda maior quando comparadas àquelas para o cultivo em 6 dias. Além disso, de todas as condições testadas, foram as que apresentaram as maiores fluorescências de maneira geral, com valores que chegam a ser 7 vezes maior que os respectivos controles. Sendo assim, o enxofre também foi selecionado para o experimento fatorial.

Para visualização das fluorescências observadas experimentalmente, as vesículas de acumulação de lipídeos para algumas das condições testadas foram observadas através de fotomicrografias dispostas nas partes da Figura 49.

(a) TAP padrão sob luz

(b) TAP padrão sob fluorescência

(c) TAP + glicose sob luz

(d) TAP + glicose sob fluorescência

(e) TAP sem enxofre sob luz

(f) TAP + glicose sob fluorescência

(g) TAP + glicose sob luz

(h) TAP + glicose sob fluorescência

Figura 49 - (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h), (i), (j) – Fotomicrografias da cepa DAM 5%04 cultivadas a 24° C e com intensidade luminosa de 60 μmol fótons m^2s^{-1} na fase estacionária do cultivo. Vesículas de lipídeos neutros são evidenciadas em amarelo após coração com corante Vermelho do Nilo. Cloroplastos aparecem em vermelho. Aumento de 400 x. Escala de 20 μm .

As fotomicrografias revelaram as vesículas de lipídeos neutros (amarelo), confirmando o que foi observado com as análises de fluorescências. As condições sob privação de enxofre sobressaíram-se em relação às outras com maior quantidade de vesículas de acumulação observadas. Na comparação do meio TAP padrão com o meio TAP + glicose, pode-se observar o possível efeito inibidor na acumulação de lipídeos. (Figura 49 (a), (b), (c) e (d)). A concentração de 5,75 mM de nitrogênio também foi fotografada, e revelou, mais uma vez o que também já tinha sido constatado com as fluorescências, ou seja, maior acumulação de lipídeos em relação ao meio TAP padrão.

Com a confirmação dos resultados experimentais obtidos, partiu-se para o experimento fatorial, discutido com detalhes no item 5.3.

5.3 - Experimento Fatorial

De acordo com os resultados obtidos nas etapas anteriores, seguiu-se para o experimento fatorial completo 2^4 (1 bloco), com as condições estabelecidas na Tabela 30 e com a inclusão de um ponto central em sextuplicata. O cultivo também foi realizado nas duas fases definidas, 6 e 13 dias.

Tabela 30 - Fatores e níveis testados no experimento fatorial.

Fatores	Código no modelo	Níveis	Níveis (Ponto Central)
Nitrogênio	A	98 mg/L e 49 mg/L	73,5 mg/L
Fósforo	B	31 mg/L e 62 mg/L	46,5 mg/L
Enxofre	C	0 mg/L e 15,49 mg/L	7,75 mg/L
Luz	D	60 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 200 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$	130 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$

O software utilizado para prever os modelos foi o *Design Expert 7.0*, que gerou o desenho experimental disposto na Tabela 31 e dividido em 16 condições.

Tabela 31 - Fatores e níveis testados no experimento fatorial.

Condições	Fatores e níveis (incluindo ponto central)			
	Nitrogênio (mg/L)	Fósforo (mg/L)	Enxofre (mg/L)	Luz (μmol)
Condição 01	49	31	0	60
	49	31	0	60
	49	31	0	60
Condição 02	49	31	0	200
	49	31	0	200
	49	31	0	200
Condição 03	49	31	15,49	60
	49	31	15,49	60
	49	31	15,49	60
Condição 04	49	31	15,49	200
	49	31	15,49	200
	49	31	15,49	200
Condição 05	49	62	0	60
	49	62	0	60
	49	62	0	60
Condição 06	49	62	0	200
	49	62	0	200
	49	62	0	200
Condição 07	49	62	15,49	60
	49	62	15,49	60
	49	62	15,49	60
Condição 08	49	62	15,49	200
	49	62	15,49	200
	49	62	15,49	200
Condição 09	98	31	0	60
	98	31	0	60
	98	31	0	60
Condição 10	98	31	0	200
	98	31	0	200
	98	31	0	200
Condição 11	98	31	15,49	60
	98	31	15,49	60
	98	31	15,49	60
Condição 12	98	31	15,49	200
	98	31	15,49	200
	98	31	15,49	200

Condição 13	98	62	0	60
	98	62	0	60
	98	62	0	60
Condição 14	98	62	0	200
	98	62	0	200
	98	62	0	200
Condição 15	98	62	15,49	60
	98	62	15,49	60
	98	62	15,49	60
Condição 16	98	62	15,49	200
	98	62	15,49	200
	98	62	15,49	200
Ponto Central	73,5	46,5	7,75	130
	73,5	46,5	7,75	130
	73,5	46,5	7,75	130
Ponto Central	73,5	46,5	7,75	130
	73,5	46,5	7,75	130
	73,5	46,5	7,75	130

As duas respostas avaliadas foram fluorescência de lipídeos neutros e a produção de biomassa (Sólidos Dissolvidos Totais). As velocidades específicas de crescimento obtidas através da modelagem com a função de Gompertz também foram calculadas para comparação. Com a produção de biomassa, a produtividade foi calculada com a inclusão do fator tempo ($X_0 - X / \text{tempo}$). Foi tida como biomassa inicial a biomassa estimada para o inóculo através das equações geradas pelas regressões lineares.

5.3.1. Experimento Fatorial - 1ª Fase

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 32.

Tabela 32 - Resultados obtidos no experimento fatorial.

Condições	μ max (UFC/MI)	Fluorescência (u.a.)	Produtividade de Sólidos (mg/L.d)
Condição 01	0,84	3,911	400,0
	0,8	3,874	337,5
	0,99	2,962	383,3
Condição 02	0,74	2,91	210,0
	0,63	2,849	300,0
	0,76	3,238	444,4
Condição 03	0,51	0,972	600,0
	0,6	1,352	366,7
	0,9	0,952	958,3

Condição 04	0,75	0,739	850,0
	0,81	0,689	1187,5
	0,59	1,071	844,4
Condição 05	0,72	2,692	185,0
	0,64	3,163	192,0
	0,58	2,805	333,3
Condição 06	0,87	1,803	525,0
	0,87	1,098	650,0
	0,85	1,82	887,5
Condição 07	0,78	0,987	900,0
	0,98	0,583	1180,0
	0,87	0,812	1060,0
Condição 08	1,04	0,787	1300,0
	1,15	1,062	1340,0
	0,99	0,722	1260,0
Condição 09	0,86	3,851	220,0
	0,81	2,01	480,0
	0,8	1,886	480,0
Condição 10	1,1	2,545	520,0
	1,15	3,835	500,0
	1,08	3,344	720,0
Condição 11	1,16	0,634	1420,0
	0,84	0,746	1340,0
	1,18	0,737	1500,0
Condição 12	1,12	0,556	1500,0
	1,07	0,622	1512,0
	1,14	0,662	1566,7
Condição 13	1,43	1,314	833,3
	1,43	1,234	910,0
	1,41	0,858	1066,7
Condição 14	1,25	1,164	1050,0
	1,11	1,35	1666,7
	1,23	0,878	1333,3
Condição 15	1,18	0,483	1466,7
	1,15	0,498	1500,0
	1	0,651	1666,7
Condição 16	1,11	0,811	1650,0
	1,08	0,681	1500,0
	1,12	0,611	1666,7
Ponto Central	1,07	0,988	1900,0
	1,14	0,854	1900,0
	0,8	1,436	1750,0
	1,03	1,116	1750,0
	1,25	0,869	1800,0
	1,11	1,24	1600,0

De acordo com a Tabela 32, as maiores velocidades de crescimento foram constatadas para as condições que apresentaram enxofre no meio de cultura, com excessão da condição 13. Essa condição possui o dobro da quantidade padrão de fósforo, o que parece ter funcionado como suprimento na ausência do enxofre. As interações entre os fatores envolvidos serão discutidas mais adiante.

As maiores produtividades de biomassa, foram obtidas nas condições 16 e no ponto central, um indício da condição otimizada que seria predita pelo modelo.

As curvas de crescimento para as 16 condições foram construídas e constam na Figura 50.

Figura 50 - Curvas de Crescimento para as 16 condições /experimentos rodadas no experimento fatorial.

Analisando as curvas de crescimento, constata-se que as menores amplitudes de crescimento foram para as condições em que o enxofre não estava presente no meio de cultura. A condição 5 exibiu a menor amplitude de crescimento. Essa condição além de não conter enxofre, teve a metade da concentração de nitrogênio do meio padrão, com uma produtividade média de sólidos de 236,77, a menor dentre todas as condições.

A falta de enxofre aliada à limitação de nitrogênio consiste em situação de alto estresse para as células, visto que são dois elementos fundamentais e limitantes aos seres produtores primários. Porém, em relação à fluorescência de lipídeos, foi uma das condições que apresentou os maiores valores, como pode ser observado na Figura 51.

Figura 51 - Fluorescências de lipídeos neutros para as 16 condições do experimento fatorial tendo como base o meio TAP + glicose cultivadas por 6 dias.. Barras verticais indicam desvio padrão (n=3).

A acumulação de lipídeos é maior quanto maior for o tempo em que a cultura permanecer na fase estacionária. Com o intuito de avaliar esse fato, o cultivo foi realizado também em 13 dias, como já comentado anteriormente.

5.3.2. Experimento Fatorial - 2ª Fase

Na segunda fase do experimento fatorial foram avaliados os valores de fluorescências para comparação com os obtidos na 1ª Fase, como é apresentado pela Figura 52.

Figura 52 - Fluorescências de lipídeos neutros para as 16 condições do experimento fatorial tendo como base o meio TAP + glicose cultivadas por 13 dias. Barras verticais indicam desvio padrão (n=3).

Notadamente, como esperado, o cultivo realizado em condições de ausência de enxofre avultou o acúmulo de lipídeos, sendo este elemento mais uma vez responsável pelas maiores fluorescências obtidas experimentalmente, principalmente nas condições 9 e 10, que tiveram suas fluorescências quintuplicadas em relação ao cultivo realizado em 6 dias. Aumentos significativos foram também observados nas condições 1, 2, 5, 6 e 13 em relação às fluorescências observadas no cultivo de 6 dias. Esta última chama a atenção, pois aumentou mais de 200% em relação à primeira fase de cultivo.

A partir dos resultados de sólidos e fluorescências foi gerado modelo preditivo do experimento fatorial, que será apresentado e discutido adiante.

5.3.3 – Modelagem Experimento Fatorial

Como foram utilizados dados de sólidos e fluorescências, o modelo pôde gerar pontos ótimos para a produção de biomassa, fluorescência de lipídeos e para ambos simultaneamente. O modelo sugeriu a mudança da escala dos dados de fluorescência para a escala logarítmica ($\log_{10}$), o que foi acatado.

As tabelas das análises de variância (ANOVA) revelaram que todos os fatores escolhidos foram significativos e incluídos no modelo para a previsão de sólidos e da fluorescência de lipídeos. Esse fato também pode ser observado nas Figuras 53 e 54 que representam o Diagrama de Pareto, gráfico de barras que ordena as frequências das ocorrências em ordem decrescente.

Observa-se que para a modelagem com vistas à biomassa, enxofre e nitrogênio foram os fatores mais representativos, com o fósforo e a luz vindo logo em seguida. Além disso, a interação entre nitrogênio, fósforo e enxofre (ABC) foi a mais significativa estatisticamente. Para a fluorescência de lipídeos, o enxofre, como já visto anteriormente, foi o fator mais significativo, com fósforo e nitrogênio, nesta ordem, aparecendo em menor patamar. A interação mais significativa foi do fósforo com o enxofre (BC).

Observa-se ainda que há barras abaixo dos limites que também foram consideradas para a modelagem. Esse fato explica-se pelas interações observadas, pois o modelo leva em consideração que se um elemento foi estatisticamente significativo, as suas interações também o são, estabelecendo uma espécie de hierarquia.

Na Figura 55 estão representadas as superfícies de respostas geradas pelo modelo para prever a produtividade ótima de biomassa de acordo com os fatores inseridos no modelo. Verifica-se que as condições otimizadas pelo modelo apontam para maiores valores de produtividade no entorno das concentrações 62 mg/L para o fósforo e 98 mg/L para o nitrogênio.

Figura 55 (a)

Figura 55 (b)

Figura 55 (a) e 55 (b) - Superfícies de respostas produtividade de biomassa em função de nitrogênio, fósforo, enxofre e luz de acordo com o modelo preditivo. Pontos em vermelho indicam os pontos experimentais que foram utilizados para gerar o modelo.

Da mesma forma, na Figura 56 estão representadas as superfícies de respostas preditas pelo modelo para a otimização da fluorescência de lipídeos neutros. Verifica-se que as condições otimizadas pelo modelo apontam para maiores valores de fluorescências (Log_{10}) nos pontos próximos às concentrações de 31 mg/L de fósforo e 49 mg/L de nitrogênio.

Figura 56 - Superfícies de respostas para fluorescências de lipídeos neutros em função de nitrogênio, fósforo, enxofre e luz de acordo com o modelo preditivo. Pontos em vermelho indicam os pontos experimentais que foram utilizados para gerar o modelo.

O modelo preditivo gerado pela modelagem em relação à produtividade de biomassa compreendido nas faixas experimentais definidas para os fatores testados foi:

$$\text{Produtividade} = 150,81343 - (1,37964 \times \text{Nitrogênio}) - (4,18072 \times \text{Fósforo}) - (18,17572 \times \text{Enxofre}) - (0,35946 \times \text{Luz}) + (0,059925 \times \text{Nitrogênio} \times \text{Fósforo}) + (0,29611 \times \text{Nitrogênio} \times \text{Enxofre}) + (0,51152 \times$$

$$\text{Fósforo} \times \text{Enxofre}) + (0,014120 \times \text{Enxofre} \times \text{Luz}) - (5,78836 \times 10^{-3} \times \text{Nitrogênio} \times \text{Fósforo} \times \text{Enxofre}) - (1,05141 \times 10^{-3} \times \text{Fósforo} \times \text{Enxofre} \times \text{Luz})$$

Já em relação à fluorescência de lipídeos, o modelo preditivo gerado foi:

$$\begin{aligned} \text{Log}_{10}\text{Fluorescência} = & 0,60463 + (4,90525 \times 10^{-5} \times \text{Nitrogênio}) + 5,30085 \times 10^{-3} (\text{Fósforo}) + (4,25346 \times 10^{-3} \times \text{Enxofre}) - (3,16164 \times 10^{-4} \times \text{Luz}) - (1,37013 \times 10^{-4} \times \text{Nitrogênio} \times \text{Fósforo}) - 4,35323 \times 10^{-4} \times \text{Nitrogênio} \times \text{Enxofre} + (2,17543 \times 10^{-5} \times \text{Nitrogênio} \times \text{Luz}) - (8,64799 \times 10^{-4} \times \text{Fósforo} \times \text{Enxofre}) - (3,65320 \times 10^{-5} \times \text{Fósforo} \times \text{Luz}) - (2,00473 \times 10^{-4} \times \text{Enxofre} \times \text{Luz}) + (1,02952 \times 10^{-5} \times \text{Nitrogênio} \times \text{Fósforo} \times \text{Enxofre}) + (4,80722 \times 10^{-6} \times \text{Fósforo} \times \text{Enxofre} \times \text{Luz}) \end{aligned}$$

Foram preditos pontos ótimos para a produtividade de biomassa, fluorescência de lipídeos neutros e para ambas as condições simultaneamente. Os pontos referentes à otimização da produtividade de biomassa estão contidos na Tabela 33.

Tabela 33 - Ponto ótimo para a produtividade de biomassa.

Fator	Níveis otimizados	Valor otimizado previsto no modelo
Nitrogênio	98 mg/L	272,3
Fósforo	62 mg/L	
Enxofre	15,49 mg/L	
Luz	200 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$	

O ponto ótimo para os fatores em relação à fluorescência de lipídeos neutros encontra-se na Tabela 34.

Tabela 34 - Ponto ótimo para a fluorescência de lipídeos neutros.

Fator	Níveis otimizados	Valor otimizado previsto no modelo
Nitrogênio	49 mg/L	3,63
Fósforo	31 mg/L	
Enxofre	0 mg/L	
Luz	60 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$	

E por fim, o ponto ótimo para ambas as respostas está inserido na Tabela 35.

Tabela 35 - Ponto ótimo para ambas as respostas (sólidos e fluorescências).

Fator	Níveis otimizados	Valor otimizado previsto no modelo
Nitrogênio	98 mg/L	Biomassa = 176,8 Log ₁₀ Fluorescência = 1,57
Fósforo	51 mg/L	
Enxofre	0 mg/L	
Luz	200 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$	

5.4. ETAPA 3 – Cultivo em média escala utilizando fotobiorreatores de 10 L

Para a etapa 3 da pesquisa, foi preciso decidir sobre qual condição otimizada escolher para atuar como meio base no cultivo. Sendo assim, optou-se por utilizar a condição otimizada para a produtividade de biomassa, pois um novo fator iria entrar no cultivo, a adição de 2% de CO₂ na composição do ar atmosférico para aeração das culturas.

Utilizando-se a condição da produtividade de biomassa, o efeito do CO₂ na produção de lipídeos poderia ser avaliado. Os reatores e as condições do cultivo foram apresentados no item 4.3 da seção 4.

5.4.1. Cultivo na condição controle (0 % CO₂)

A pureza das culturas observadas até o experimento fatorial não foi mantida para o experimento nos reatores, principalmente para o airlift, que apresentou alta densidade bacteriana (constatação microscópica). Só o fato de abrir os reatores para entrada do meio de cultura e inóculo foi suficiente para a grande contaminação observada. Por este motivo, as curvas de crescimento não se referem somente à alga, pois nas leituras de absorbâncias houve, notadamente, interferência das bactérias.

Na tentativa de avaliar essa interferência, também foram construídas curvas de crescimento levando em conta a clorofila-a através da leitura espectrofotométrica no comprimento de onde 683 nm (pico da clorofila), pigmento produzido por seres fotossintetizantes, não sintetizado por bactérias.

A Figura 57 representa as curvas de crescimento nos dois comprimentos de onda (550 nm e 683 nm), o perfil de O₂ e o pH para o cultivo na condição controle e no reator (airlift).

Figura 57 - Curvas de crescimento (550 nm e 683 nm), perfil de O₂ e pH ao longo do cultivo no reator (airlift) na condição controle.

Pelas curvas de crescimento, observa-se que o comprimento de onda não interferiu no monitoramento do crescimento, pois as curvas estão sobrepostas e só diferem na fase estacionária do cultivo. O pH manteve-se praticamente constante ao longo de todo o cultivo. Em relação ao oxigênio, observa-se que durante a fase exponencial há consumo quase que em sua totalidade do oxigênio disponível no meio. Como a cultura esteve contaminada por bactérias, a taxa líquida entre produção (fotossíntese) e consumo (respiração) após o primeiro dia esteve à beira da nulidade, chegando a 0 mg/L no final do cultivo (Dia 3).

O cultivo nas *bags* se deu em triplicata, e da mesma forma que para os reatores, as curvas de crescimento ($n=3$), perfil de O_2 e pH ($n=3$) são apresentados na Figura 58.

Figura 58 - Curvas de crescimento, perfil de O_2 e pH ao longo do cultivo nas bags (sem adição de CO_2) na condição controle. Barras verticais indicam desvio padrão ($n=3$).

Em consonância ao que foi observado no reator, as curvas de crescimento não apresentaram discrepâncias entre os comprimentos de onda, e assim, não foi possível chegar à uma conclusão concreta sobre a interferência ou não das bactérias no monitoramento do crescimento. Em relação ao oxigênio dissolvido, em detrimento ao que foi observado no reator, a produção foi contrabalanceada ao consumo. No meio da fase exponencial houve um consumo intenso de oxigênio, o que é plausível frente à necessidade de respiração pela alga na fase escura no ápice do crescimento. Pode-se concluir também que essa oscilação no consumo de oxigênio pode ser atribuída a menor contaminação por bactérias (também constatada microscopicamente), pois quando a cultura chegou na fase estacionária, por volta do 3º dia, o oxigênio dissolvido voltou ao patamar inicial tendo sua produção atribuída ao processo fotossintético, e como não havia grandes quantidades de bactérias, não houve consumo, caso contrário ao reator, que apresentava grandes quantidade de bactérias para consumo do oxigênio.

5.4.2. Cultivo com adição de CO₂ (2%)

No cultivo com adição de CO₂, as mesmas constatações feitas para o cultivo sem CO₂ são válidas, ou seja, curvas de crescimento nos comprimentos de onda sem permitir uma conclusão sobre a interferência das bactérias no monitoramento do crescimento da alga, maior contaminação no reator airlift, o que ocasionou a não recuperação do oxigênio consumido e pH praticamente constante em todo o cultivo, de acordo com as Figuras 59 e 60.

Figura 59 - Curvas de crescimento (preto) e perfil de O₂ (cinza) ao longo do cultivo no reator (airlift) com adição de CO₂ ao ar atmosférico para aeração das culturas.

Figura 60 - Curvas de crescimento (preto) e perfil de O₂ (cinza) ao longo do cultivo nas bags com adição de CO₂ ao ar atmosférico para aeração das culturas. Barras verticais indicam desvio padrão (n=3).

Outro fato que pode ser observado nas curvas de crescimento é a existência de uma fase lag (adaptação) com duração de 0,5 dias, fato que não foi observado nos cultivos realizados em pequenas escalas nos tubos (20 mL de cultura) e em erlenmeyers (1 L de cultura). Outro ponto interessante diz respeito à fase estacionária da cultura que teve seu início bem definido com aproximadamente 1,5 dias de cultivo, sendo que para o cultivo em tubos, o início da fase estacionária aconteceu por volta do 6° dia.

5.4.3. Modelagem do crescimento nos fotobiorreatores

A modelagem também foi realizada no software *Origin 8.0* através da função de Gompertz. As curvas de ajuste com seus respectivos R quadrados para o experimento controle estão apresentadas na Figura 61.

Figura 61 - Curvas de crescimento e ajustes realizados com a modelagem de Gompertz para os fotobiorreatores utilizados na pesquisa com seus respectivos R quadrados.

As velocidades de crescimento e os tempos de geração para o experimento controle estão contidos na Tabela 38.

Tabela 36 - Velocidade máximas específicas de crescimento para o experimento controle nos fotobiorreatores.

Reator/Comprimento de onda	Velocidade específica de Crescimento (UFC/mL)/tempo	Tempo de geração (tempo)
Airlift (550 nm)	4,29	0,16
Airlift (683 nm)	3,40	0,20
Bags (550 nm)	2,13±0,720093	0,35±0,127671
Bags (683 nm)	2,08±0,52259	0,35±0,090185

Para o experimento com enriquecimento de CO₂, as curvas de ajuste e os R quadrados são apresentados pela Figura 66.

Figura 62 - Curvas de crescimento e ajustes realizados com a modelagem de Gompertz para os fotobiorreatores utilizados na pesquisa com seus respectivos R quadrados.

As velocidades e os tempos de geração são mostrados na Tabela 37.

Tabela 37 - Velocidade máximas específicas de crescimento para o experimento controle nos fotobiorreatores.

Reator/Comprimento de onda	Velocidade específica de Crescimento (UFC/mL)/tempo	Tempo de geração (tempo)
Airlift (550 nm)	5,77	0,12
Airlift (683 nm)	4,69	0,15
Bags (550 nm)	1,88 ± 0,0153	0,37 ± 0,0000
Bags (683 nm)	2,01 ± 0,0100	0,35 ± 0,0057

As maiores velocidades de crescimento foram observadas para os reatores aerados com ar enriquecido em CO₂ para o monitoramento do crescimento realizado no comprimento de onda de 550 nm. As velocidades de crescimento para as bags foram menores nos dois experimentos, confirmando o que havia sido constatado visualmente nas curvas de crescimento, onde a fase estacionária para as bags é tardia em relação aos fotobiorreatores.

Em comparação com o cultivo em tubos, as velocidades obtidas nos reatores chegam a ser de 4 a 5 vezes maiores. Esse fato pode ser atribuído à aeração das culturas, pois, juntamente com o aumento de escala, foram as únicas alterações realizadas. Os tempos de geração também foram menores em relação aos tubos.

Em relação à produção de biomassa, as Figuras 63 e 64 mostram os quantitativos de sólidos obtidos nos experimentos nos reatores. Cada par de barras da esquerda para à direita representa um dia para cada experimento.

Figura 63 - Sólidos Dissolvidos Totais (mg/L) para os experimentos realizados no airlift.

No experimento controle, sem adição de CO₂, foram atingidas as 2550,0 g L⁻¹ no airlift, porém vale ressaltar que houve contaminação da cultura, e esse pode não ser exclusivamente atribuído ao peso seco da microalga.

No experimento com as *bags* foram alcançados os resultados apresentados na Figura 64.

Figura 64 - Sólidos Dissolvidos Totais (mg/L) para os experimentos realizados nas bags.

Com as *bags* foram alcançados 1450 g L^{-1} , valor inferior ao obtidos no *airlift*, porém com maior confiabilidade por ter ocorrido menor contaminação das culturas.

Em relação às fluorescências, a Figura 65 apresenta os resultados obtidos.

Figura 65 - Comparação entre as fluorescências para lipídeos neutros para os experimentos controle e com adição de CO_2 realizados nos reatores e nas bags. Barras verticais indicam desvio padrão ($n=3$).

A partir desses valores obtidos, verifica-se que para os dois experimentos os valores de fluorescência ultrapassaram 1 u.a., valor muito aquém das encontradas quando da limitação de nutrientes e privação de enxofre. Além disso, não foram verificadas grandes diferenças entre as condições de cultivo.

6. DISCUSSÃO

O conhecimento sobre a biotecnologia de microalgas não é recente. Em meados da década de 80 já existiam estudos que apresentavam uma visão geral dos diferentes aspectos, promessas, e também das limitações deste ramo tecnológico. Noue e Pauw (1988), por exemplo, comentam que o desenvolvimento da pesquisa aplicada em biotecnologia com a utilização de microalgas desenvolveu-se na Alemanha na década de 40, e expandiu-se para os Estados Unidos, Japão, Israel e Itália. Como resultados, os pesquisadores mostram que a produção comercial de *Chlorella* no Japão e em Taiwan teve início por volta de 1960. Devotando-se ao tratamento de águas residuárias, o interesse surgiu na década de 1950, com o desenvolvimento de sistemas que suportassem tal objetivo. Tratando-se da produção de biomassa de microalgas para combustíveis e fertilizantes, a atenção para tal tema surgiu na década de 1970, e, na década de 1980, a tendência foi utilizar a biomassa de microalgas como fonte de produtos químicos comuns e da química fina (NOUE; PAUW, 1988).

Primeiramente, vale ressaltar alguns conceitos sobre microalgas. Formalmente, o termo algas não tem legitimidade taxonômica. É usado tradicionalmente para designar um grupo polifilético que inclui organismos que não têm uma origem comum compartilhada, mas que seguem linhas evolutivas múltiplas e independentes. Às algas unicelulares, que podem ser encontradas tanto em águas doces como em águas salinas, dá-se o nome de microalgas (BARSANTI; GUALTIERI, 2006).

Microalgas são conversores biológicos primários de dióxido de carbono em oxigênio, e representam uma fonte potencial de produtos valiosos, tais como pigmentos e vitaminas. Na atualidade são o foco de intensa pesquisa devido ao potencial apresentado para serem utilizadas como matéria-prima renovável com vistas à produção de biodiesel, pois apresentam a capacidade de acumular significativos níveis de lipídeos como compostos de armazenamento de carbono (GARDNER et al., 2013). As altas taxas de crescimento e produção de biomassa associadas ao armazenamento significativo de lipídeos são os principais fatores que corroboram para a utilização das microalgas no campo da biotecnologia. Algumas espécies de microalgas podem ser induzidas a acumular até 60% de lipídeos em peso seco, sendo denominadas de microalgas oleaginosas (SHEEHAN et. al., 1998 apud DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2010).

O acúmulo de lipídeos pelas microalgas oleaginosas pode ainda ocorrer como resposta a estresses ambientais, como limitação de nitrogênio, salinidade e temperatura elevada. Porém, a utilização destes seres no processo de produção de biocombustíveis ainda requer profundo conhecimento da bioquímica e genética das vias biossintéticas utilizadas na síntese lipídica. (KHOZIN-GOLDBERG; COHEN, 2011).

Essa pesquisa comparou o crescimento mixotrófico de *Chlorella sp.* em pequena escala (20 mL de cultura) e média escala (fotobiorreatores de 10 L). As respostas analisadas foram produção de biomassa e fluorescência de lipídeos neutros, uma medição indireta do acúmulo de lipídeos nas células das microalgas. Os parâmetros de crescimento: velocidade máxima específica

de crescimento ($\pi_{\text{máx}}$) e tempo de geração, também foram analisados, nos meio WC e TAP (padrões e com adição de glicose)

As técnicas de axenização das cepas de *Chlorella spp.* utilizadas na pesquisa foram eficientes na obtenção de culturas puras. A primeira varredura realizada teve como objetivo de avaliar, entre as cepas DAM5%₀₄ e FAZ₁₁, a que apresentasse as maiores velocidades específicas de crescimento e os menores tempos de geração. Os meios utilizados foram o WC padrão e o WC com adição de 1 g L⁻¹ de glicose. Após os experimentos, observou-se que a cepa DAM5%₀₄ apresentou velocidades específicas de crescimento maiores em até 4 vezes do que àquelas encontradas com a cepa FAZ₁₁ (Tabela 29). O efeito da glicose nessa etapa da pesquisa foi observada e revelou aceleração na chegada da fase estacionária das culturas, que tiveram seus inícios por volta do 6º dia de cultivo, em contraponto ao meio WC sem glicose, que por volta do 22º dia de cultivo ainda não tinham suas fases estacionárias bem definidas.

Abreu et. Al. (2012) comparou o cultivo de *Chlorella vulgaris* em diferentes condições de mixotrofia com o cultivo fotoautotrófico, e concluiu que a microalga cultivada mixotroficamente apresentou maiores taxas de crescimento específico (0,47 d⁻¹) e concentração de biomassa (2,24 g L⁻¹), o que mostra que os valores encontrados nessa pesquisa são coerentes. Os mesmos autores relatam que o cultivo que utiliza uma fonte orgânica de carbono é mais eficiente, e que a glicose pode ser considerada um dos melhores substratos orgânicos para o crescimento de microalgas, o que corrobora mais uma vez com os resultados obtidos.

Liang, Sarkayny e Cui (2009) investigaram as produções de biomassa e de lipídeos a partir de *Chlorella vulgaris* em diferentes condições de crescimento. Concluíram que o cultivo mixotrófico, em relação às respostas estudadas, foi o mais eficiente para a microalga utilizada. Como resultados, para biomassa foram obtidas 2 g L⁻¹, e para produtividade lipídica, 54 mg L⁻¹ d⁻¹ no cultivo com 1% de glicose. Concentrações superiores de glicose apresentaram efeitos inibitórios no cultivo. Os resultados obtidos por esses pesquisadores servem como sustentação para o tipo de cultivo e concentração de glicose utilizados e para os resultados obtidos nessa pesquisa.

O trabalho de Li et al. (2014) comparou o crescimento de *Chlorella sorokiniana* em condições fotoautotróficas, heterotróficas e mixotróficas, onde a maior taxa de crescimento específico e máxima produção de biomassa foram observadas no crescimento mixotrófico, valores estes que chegaram a ser maiores que a soma dos cultivos autotróficos e heterotróficos. Foram alcançados aumentos de aproximadamente 7 vezes no cultivo que utilizou 6 g/L de glicose em relação ao cultivo fotoautotrófico (de 0,68 g/L para 4,57 g/L) (0 g/L de glicose) na temperatura de 25° C, e 7,5 vezes com 8 e 10 g/L de glicose (de 0,68 g/L para 5,01 g/L e 5,08 g/L, respectivamente). A temperatura de 37° C também foi investigada no trabalho, e através da análise dos resultados obtidos observou-se aumentos nas produções de biomassa nas concentrações de 8 e 10 g/L de glicose (de 0,27 g/L de biomassa para 6,15 g/L e 6,04 g/L de biomassa), e pequeno decréscimo na concentração de 6 g/L (de 0,27 g/L para 4,31 g/L). A temperatura e a concentração de glicose foram fixadas nesta pesquisa (24° C e 1 g/L, respectivamente), sendo assim, era de se esperar que os resultados obtidos no cultivo nos fotobiorreatores estivessem abaixo dos alcançados por Li et. al. (2014), pois a concentração de glicose utilizada foi inferior; o que se

confirmou. Vale salientar que a espécie de *Chlorella* utilizada na pesquisa não foi identificada e que os resultados podem variar de espécie para espécie.

Em relação aos meios de cultura, o meio TAP foi escolhido para o prosseguimento da pesquisa, pois apresentou resultados mais satisfatórios, como foi visto na seção 5, sendo o cultivo no meio TAP com adição de glicose o que apresentou a maior produtividade de Sólidos Suspensos Totais ($1,090 \text{ g. L}^{-1}$) no cultivo realizado nos tubos de ensaio, o que representou o dobro da biomassa obtida com o meio TAP padrão.

No que diz respeito ao acúmulo de óleos, é sabido que microalgas oleaginosas têm a capacidade de acumular grandes quantidades de lipídeos, principalmente os Triagliceróis (TAG), em resposta a estresses ambientais, como limitação de nitrogênio, salinidade ou temperatura elevada (KHOZIN-GOLDBERG; COHEN, 2011). TAG é um éster de ácidos graxos e glicerol. Todos os organismos eucarióticos têm a capacidade de sintetizar TAG, que é o principal componente do óleo vegetal, lipídeos de algas e gorduras animais. De acordo com Cakmak et. al (2012), mudanças nas condições ambientais, tais como temperatura, intensidade luminosa ou nutrientes característicos do meio, tais como nitrogênio, enxofre e fósforo, são conhecidos como impulsionadores da acumulação de lipídeos.

Cakmak et.al. (2012) relatam em seu trabalho que o nitrogênio e o enxofre têm impactos inter-relacionados e distintos no metabolismo das microalgas. O nitrogênio tem sido estudado na indução de níveis elevados de TAG, enquanto que a produção de biohidrogênio é associada ao enxofre. A limitação de nitrogênio causa mudanças anatômicas, principalmente no cloroplasto, que é degradado em compartimentos semelhantes à uma esfera e as gotículas lipídicas citoplasmáticas são formadas. No trabalho citado, os autores observaram que no cultivo da microalga com limitação de nitrogênio houve diminuição de 83 % no crescimento celular, 61% na diminuição de clorofila e aumentos de 2,3 e 2,4 vezes nos níveis de amido e de lipídeos neutros, respectivamente.

O enxofre, assim como o nitrogênio, é necessário para um vasto espectro de funções celulares. Estudos com *Chlamydomonas* têm mostrado que a privação de enxofre induz uma rápida diminuição na atividade fotossintética, acompanhado por um declínio no transporte de elétrons no fotossistema II. Visto a grande importância do enxofre nas funções vitais da célula, o cloroplasto requer fornecimento contínuo desse elemento, e quando não o é fornecido, a capacidade do cloroplasto de sintetizar proteínas é reduzida. Cakmak et. al. (2012) relatam também que nos seus experimentos com a retirada de enxofre do meio de cultura foram observados 65 % de diminuição no crescimento celular, 26% na diminuição de clorofila, e aumentos de 3,4 vezes e 2,6 vezes dos níveis de amido e lipídeos neutros, respectivamente. Dois fatos interessantes para essa pesquisa foram observados nesse trabalho: 1) a degradação do cloroplasto é mais rápida em células microalgais de *Chlamydomonas reinhardtii* quando o cultivo é realizado com limitação de nitrogênio; 2) os autores sugerem que a retirada de enxofre do meio é preferível para aumentar a produção de lipídeos.

Outra característica atribuída a ausência de enxofre nos cloroplastos é a produção fotossintética de H_2 , que se torna viável quando a formação de O_2 é superada pelo seu consumo,

onde a via da hidrogenase é induzida para gerar energia em forma de ATP. Ainda sobre a limitação de nitrogênio, os principais efeitos atribuídos à sua limitação são o cessamento da divisão celular e dos níveis de proteína e clorofila em detrimento do aumento do volume da célula, dos lipídeos neutros totais, de carotenóides e do conteúdo de carboidrato (IRIHIMOVITCH & YEHUDAI-RESHEFF, 2008).

Há inúmeros trabalhos publicados quanto a produção de hidrogênio em meios de cultivo com depleção de enxofre, elemento vital à vida. Antal, Krendelewa e Rubin (2011) relatam que a falta de enxofre no meio modifica drasticamente o metabolismo celular, o que inclui a acumulação de amido e inativação do PS II e do ciclo de Calvin - Benson.

Em relação ao fósforo, grandes quantidades são requeridas para as várias funções do cloroplasto, e sua limitação pode afetar os processos que acontecem nessa organela, que incluem a geração de energia (ATP), a fosforilação das proteínas da fotossíntese e a síntese de fosfolipídeos, além de ser necessário para síntese de DNA e RNA (IRIHIMOVITCH & YEHUDAI-RESHEFF, 2008).

Em suma, os nutrientes necessários ao desenvolvimento de organismos fotossintéticos apesar de alguns serem comumente limitados no ambiente, são requeridos em quantidades relativamente grandes, entretanto, a abundância desses elementos pode também limitar o crescimento destes microrganismos. Diante disto, as algas devem responder a essas mudanças de forma coordenada, desenvolvendo mecanismos para detectar e se ajustar às condições em que os nutrientes se encontram limitados. Segundo Irihimovitch e Yehudai-Resheff (2008), estudo com *Chlamydomonas reinhardtii* demonstraram que as limitações de fósforo e enxofre induzem à várias respostas similares, tais como: diminuição do metabolismo, cessação da divisão celular e redução na atividade fotossintética. Além disso, mudanças no padrão da expressão gênica também são atribuídas às limitações desses dois elementos.

No *screening* para biomassa e fluorescência de lipídeos neutros, quando foi testada a limitação de nitrogênio no meio TAP padrão, observou-se que os menores crescimentos foram atribuídos às menores concentrações de nitrogênio testadas (0mM, 0,35mM e 1,75mM). Nas concentrações que tiveram o nitrogênio limitado em torno da metade da concentração padrão do meio TAP (1,75 e 5,75 mM) foram constatadas as maiores fluorescências para lipídeos neutros. A partir desses resultados, como já discutido, foi possível concluir que a limitação de nitrogênio para acumulação de óleos é maior para concentrações mais elevadas, ou seja, limitar nitrogênio impulsiona maior acumulação de óleo, porém, pela vitalidade deste elemento para as células, é necessário que haja uma quantidade significativa no meio de cultura.

Nas concentrações mais baixas foram observadas as menores amplitudes de crescimento e a entrada na fase estacionária da cultura antecipada em relação às outras concentrações. Na parte visual do cultivo, os tubos com as concentrações mais baixas apresentaram um tom de verde mais claro em contraste com as concentrações mais altas, pois a clorofila, pigmento protéico (proteína) que fornece a cor verde característica, necessita de nitrogênio em quantidades adequadas para a sua síntese, como já comentado e discutido por Irihimovitch & Yehudai-resheff (2008).

No segundo período de cultivo (13 dias), as fluorescências foram maiores para as concentrações de 5,75 mM e 7 Mm (padrão), tornando-se maior que o dobro na concentração de 5,75 Mm do 13º dia quando comparada à mesma concentração do 6º dia.

No cultivo realizado no meio TAP com adição de 1 g L⁻¹ de glicose, em detrimento ao que foi verificado no meio TAP padrão, a presença de glicose parece inibir o acúmulo de óleos, assim como, de alguma forma, interfere na influência da concentração de nitrogênio na síntese lipídica. No segundo período de cultivo, também não foram verificadas grandes modificações no processo de acumulação de lipídeos. Pode-se observar que houve um pequeno aumento nas concentrações intermediárias, mas nada que possa efetivamente caracterizar um acúmulo significativo. Um fato curioso observado tanto no meio TAP padrão como no meio com adição de glicose foi o desenvolvimento da fase exponencial na concentração 5,75 mM, que diferiu das demais sendo inferior até por volta do 7º dia de cultivo, quando depois alcança a posição esperada, ou seja, abaixo da concentração superior (7Mm).

Os resultados positivos obtidos no meio TAP com adição de glicose foram para a produção de biomassa. Em contrapartida, foi observada inibição na fluorescência de lipídeos neutros, com valores menores em relação ao meio TAP padrão, o que vem a ratificar que a otimização da produção de biomassa e lipídeos concomitantemente ainda é um desafio para a biotecnologia de microalgas.

Com o objetivo de estudar a acumulação de TAG através da utilização de carbono inorgânico em *Chlamydomonas reinhardtii*, Gardner et. al (2013) utilizaram CO₂ nas concentrações de 5% e 0,04% (com ou sem 50 mM de bicarbonato), o que permitiu comparar o cultivo entre concentrações altas e baixas de CO₂ com bicarbonato complementar, sendo o cultivo realizado até próximo da depleção de nitrogênio. Antes da depleção de nitrogênio, as culturas mantiveram crescimento exponencial e exibiram uma taxa de crescimento exponencial de 1,6 dia⁻¹. Foi observado que o nitrogênio se esgotou com 2,8 dias, e que o ciclo celular foi interrompido nas culturas às quais foi adicionado bicarbonato. Porém, nas culturas aeradas com 5% de CO₂, sem adição de bicarbonato, as células continuaram a se dividir em média 1,7 vezes mais do que com a adição de bicarbonato (5mM).

Na pesquisa, o bicarbonato foi testado na segunda fase (concentração de 1 g/L) e observou-se que, assim como na pesquisa de Gardner et. Al (2013), e mesmo em concentrações diferentes, este também foi o fator que causou o cessar do ciclo celular, observado pelo não desenvolvimento da cultura. Porém, quando associado à limitação de nitrogênio (metade da quantidade do meio TAP padrão) e ao excesso de fósforo (dobro da quantidade do meio TAP padrão) apresentou um efeito em relação à fluorescência de lipídeos neutros.

A retirada total de enxofre do meio de cultura foi a condição que apresentou as maiores fluorescências para lipídeos, com valores obtidos muito acima das outras condições, como será observado na Figura 48. O enxofre faz parte do grupo dos macroelementos fundamentais ao crescimento das microalgas, e por este fato, o cultivo nessas condições foi o que apresentou as menores quantidades de biomassa, o que confirma mais uma vez a dificuldade de se encontrar

uma forma viável de cultivo que apresente resultados satisfatórios tanto para biomassa como para lipídeos, simultaneamente, com vistas à produção de biodiesel.

As fotomicrografias ampliadas na Figura 49 mostra as vesículas de lipídeos (em amarelo) sobressaindo-se nas condições em que o enxofre foi retirado do meio. Ainda são poucos os trabalhos publicados que tratam a falta de enxofre como impulsionador da acumulação de lipídeos. Nesse sentido, essa pesquisa pode contribuir nesse quesito.

De acordo com os resultados obtidos anteriormente, foi montado o experimento fatorial completo 2^4 (1 bloco, incluindo um ponto central em sextuplicata) com os fatores nitrogênio, fósforo, enxofre e luz (os níveis testados estão expostos na Tabela 30), em duas fases: 6 e 13 dias de cultivo. O software utilizado para prever os modelos foi o *Design Expert 7.0*, e após os experimentos foram preditos pontos ótimos para produtividade de biomassa (Nitrogênio: 98 mg L⁻¹; Fósforo: 62 mg L⁻¹, Enxofre: 15,49 mg L⁻¹; Luz: 200 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), fluorescência de lipídeos neutros (Nitrogênio: 49 mg L⁻¹; Fósforo: 31 mg L⁻¹, Enxofre: 0 mg L⁻¹; Luz: 60 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), e por fim, o ponto ótimo para ambas as respostas (Nitrogênio: 98 mg L⁻¹; Fósforo: 51 mg L⁻¹, Enxofre: 0 mg L⁻¹; Luz: 200 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). A condição otimizada para biomassa foi a escolhida para a 3ª etapa do cultivo, ou seja, no cultivo em média escala em fotobiorreatores de 10 L. Essa escolha se baseou no fato de que outro fator novo iria entrar no cultivo, a aeração com ar enriquecido de 2% de CO₂, e assim, a produção de lipídeos poderia ser avaliada.

A terceira etapa do cultivo foi marcada logo de início pela contaminação das culturas, principalmente no reator *airlift*, e em menor proporção nas bags, pois mesmo com a esterilização feita anteriormente ao cultivo, a abertura do retor para introdução do meio de cultura e do inóculo foi suficiente para tal.

Li et al. (2014) ainda relatam que na fotossíntese há tendência para uma rápida acumulação de oxigênio durante o cultivo, mais precisamente quando a taxa fotossintética aumenta. Sendo assim, é de se esperar que a produção de oxigênio a partir da fotossíntese sob condições mixotróficas também resulte em aumento do nível de oxigênio dissolvido, porém, em níveis mais baixos em relação ao cultivo fotoautotrófico, pois o metabolismo da glicose aparece como fator extra de consumo de oxigênio no processo mixotrófico.

Na pesquisa foram utilizadas duas fontes de oxigênio no cultivo realizado em fotobiorreatores: a fotossíntese e o fornecimento através da aeração (2 L/min de ar /volume de meio). No *airlift*, observou-se que o teor de oxigênio chegou à 0 mg/L logo que a cultura começou a se estabelecer em sua fase estacionária, não se recuperando mais. Já nas *bags*, o teor de oxigênio chegou próximo do valor nulo, mas houve recuperação do oxigênio, onde provavelmente a produção foi maior que o consumo. Diante do que foi observado, medido e exposto, pode-se concluir que a produção de oxigênio e a aeração fornecida, quando do cultivo realizado no *airlift*, não foi suficiente para promover a degradação da glicose e sustentar a respiração das células no período escuro. Essas mesmas constatações foram observadas quando o cultivo foi realizado com aeração por CO₂, ou seja, mesmo com esse reforço de oxigênio, o consumo ainda foi maior.

No trabalho de Costa et. al. (2006), *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutíssima* foram cultivadas no Meio Bistrol Modificado, fotobiorreatores de 2 L (erlenmeyers) e aeração com 1% de

CO₂ por bombas de diafragma, e NaHCO₃ (16,8 g/L) como fonte orgânica de carbono. O fotoperíodo foi o mesmo dessa pesquisa, 12h claro/escuro. Apesar da menor escala e de utilizar uma fonte de carbono orgânica diferente, quando o cultivo foi realizado com aeração de 1% de CO₂ (v/v) foram obtidos 2,62 g L⁻¹ de biomassa, valor próximo ao obtido nessa pesquisa. Yanagi et al. (1995), obtiveram aproximadamente 0,40 g L⁻¹ no cultivo de *Chlorella spp.* Com 10 % de CO₂ no meio. Sung et al. (1999), também estudando o cultivo de *Chlorella spp.* alcançaram concentração de 5,70 g L⁻¹ com adição de 10% de CO₂. Lee et al. (2002) obtiveram aproximadamente 2,00 g L⁻¹ também com *Chlorella spp.* Com 15% de CO₂.

Chiu et al. (2009) investigaram o cultivo de *Nannochloropsis oculata* com diferentes concentrações de CO₂ (2%, 5%, 10% e 15%), no cultivo realizado em fotobiorreator cilíndrico de vidro (30 cm de altura e 7 cm de diâmetro), 26° C e 300 μmol fótons m⁻² s⁻¹. Foram obtidas 1.277 ± 0.043 g L⁻¹ na concentração de 2% de CO₂, e crescimento da microalga inibido nas outras concentrações. As taxas específicas de crescimento no cultivo sem aeração com ar enriquecido em CO₂ e com ar enriquecido (2% de CO₂) foram, respectivamente, 0,191 d⁻¹ e 0,571 d⁻¹.

Em comparação com essa pesquisa, as velocidades específicas de crescimento foram maiores que as obtidas por Chiu et al. (2009), sendo 5,77 d⁻¹ a maior obtida (cultivo com 2% de CO₂). Com relação à biomassa, no *airlift* foram obtidos 2550,0 g L⁻¹ na aeração com ar atmosférico (controle), e 2355,3 g L⁻¹ na aeração com ar enriquecido em CO₂. Já nas *bags*, foram obtidos 1450,0 g L⁻¹ na aeração com ar atmosférico, e 1450,0 g L⁻¹ com 2% de CO₂, valores estes que são próximos aos obtidos pelos pesquisadores citados acima.

Os valores encontrados para produção de biomassa em sistemas fechados foram ainda coerentes com os valores apresentados no trabalho de Breennan e Owende (2010), da mesma forma que os problemas associados com o aumento da escala referentes a condição de cultivo utilizada se apresentaram de forma coesa com o trabalho de Chen et. al (2011).

No tocante aos lipídeos, os valores foram muito aquém dos obtidos nos tubos. Roleda et.al (2013) mostraram que para todas as espécies de microalgas oleaginosas estudadas em seu trabalho foi observada forte correlação negativa entre a taxa de crescimento e o teor de lipídeos. Além disso, ficou constatado também que múltiplos fatores de estresse não têm efeito aditivo sobre o acúmulo de lipídeos, bem como que a limitação nutricional tem maior efeito no conteúdo de óleos do que o estresse de temperatura, o que foi observado nessa pesquisa

Em suma, as recentes aplicações da biotecnologia demandam produtos com baixo custo e alta qualidade, e, para estes produtos serem alcançados, os processos devem ser traduzidos para a escala comercial com a mesma precisão em que foram realizados na escala laboratorial. O grande desafio para possíveis próximas pesquisas será o de realizar o cultivo em duas fases para aumentar tanto o acúmulo de óleo na biomassa, como sua produtividade.

7. CONCLUSÕES

O cultivo da microalga estudada em condições mixotróficas revelou-se satisfatório tanto no cultivo em pequena escala (tubos) quanto nos fotobiorreatores de 10 L. As técnicas empregadas para axenização das cepas de *Chorella sp.* utilizadas revelaram-se satisfatórias, o que foi de suma importância para a interpretação dos resultados obtidos.

Em relação às duas cepas estudadas, a isolada do lago do condomínio Damha (São Carlos/SP) apresentou melhores performances metabólicas em relação aos fatores que foram estudados, destacando-se no tocante as velocidades máximas específicas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e produção de biomassa. Dentre os meios estudados, o TAP com glicose (1 g/L) atuando como fonte orgânica de carbono foi o responsável pela maior produção de biomassa (1090 mg/L) quando comparados ao TAP padrão (610 mg/L) e WC com adição de glicose (1 g/L) (550 mg/L).

A modelagem do crescimento em toda a pesquisa mostrou-se adequada quando os dados de absorbâncias foram normalizados (escala logarítmica), o que confirmou a adequabilidade da função de Gompertz para traduzir crescimentos celulares.

O cultivo no meio TAP com adição de glicose (1 g/L) em ausência total de enxofre destacou-se na síntese e acumulação de lipídeos neutros, com aumentos de fluorescências de até 7 vezes em comparação ao meio TAP com enxofre. Limitação de nitrogênio também agiu como impulsionador na acumulação de lipídeos neutros, sobretudo na faixa de concentrações entre 3,5 mM e 5,75 mM. Esses fatores (nitrogênio e enxofre) juntamente com o fósforo e a luz foram os utilizados na busca por pontos ótimos do cultivo pelos resultados satisfatórios que foram obtidos. O experimento fatorial, com desenho experimental e posterior modelagem realizados no software *Design Expert 7.0*, forneceu pontos ótimos para a produtividade de biomassa, fluorescência de lipídeos neutros e para ambas as condições dentro das concentrações testadas dos fatores envolvidos (subitem 5.3.3 - Tabelas 33, 34 e 35).

A produção de biomassa atingiu a faixa de 2500 mg/L no experimento controle no *airlift*, e em relação à síntese e acumulação de lipídeos, as fluorescências foram maiores nos experimentos com ar enriquecido em CO₂ 1% (0,5 u.a no *airlift* (550 nm) e 0,9 u.a. nas *bags* (683 nm), porém, bem abaixo das fluorescências observadas no cultivo em privação de enxofre e/ou limitação de nitrogênio nos tubos.

Na comparação entre os fotobiorreatores o cultivo nas *bags* apresentou-se mais vantajoso em comparação ao *airlift*. A contaminação observada microscopicamente para as *bags* foi muito menor em relação ao *airlift*, assemelhando-se às culturas axênicas nos tubos. Esse fato, atrelado à fácil acessibilidade ao reator (simples bolsa de polietileno de baixo custo), torna as *bags* viáveis para utilização no cultivo de microalgas.

Diante do que foi exposto, espera-se que as informações levantadas orientem e aperfeiçoem o cultivo de microalgas com vistas à produção de biodiesel, fonte renovável de energia que pode, ao menos, minimizar os efeitos negativos causados pelos combustíveis fósseis. Porém, a viabilidade do processo precisa ser bastante melhorada, principalmente em relação aos custos envolvidos e métodos de cultivo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, A. P.; FERNANDES, B.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J.; DRAGONE. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 61 – 66, 2012.

ANDERSEN, R. A. **Algal Culturing Techniques**. 2005. Elsevier: China, 588 p. ISBN: 0-12-088426-7.

ANTAL, T. K.; KRENDELEVA, T. E.; RUBIN, A. B. Acclimation of green algae to sulfur deficiency: underlying mechanisms and application for hydrogen production. **Appl. Microbiol Biotechnology**, v. 89, p. 3 – 15, 2011.

APHA – American Public Health Association, **Standard Methods for the examination of water and wastewater**. 21th edition Washington, 2005.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 313–21, 1999.

BRAGA, B.; HESPAHOL, B.; CONEJO, J. G. L.; BARROS, M. T. L.; SPENCER, M.; PORTO, M.; NUCCI, N.; JULIANO, N.; EIGER, S. **Introdução à Engenharia Ambiental: O desafio do desenvolvimento sustentável**. São Paulo: Prentice Hall, 2005.

BECKER, E. W. **Microalgae. Biotechnology and Microbiology**. 2008. Cambridge University Press. 295 p. ISBN: 0-521-35020-4.

BREENAM, L.; OWENDE, P. Biofuel from microalgae – A review of Technologies for Production, Processing, and Extractions of Biofuels and Co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 557 – 577, 2009.

BICUDO, C. E. de M.; MENEZES. **Gêneros de Algas de Águas Continentais do Brasil – Chave para identificações e descrições**. 2a edição. Rima: São Carlos, 2006. ISBN: 85-7656-064-X.

CAKMAK, T.; ANGUN, P.; OZKAN, A. D.; CAKMAK, Z.; OLMEZ, T. T.; TEKINAY, T. Nitrogen and sulfur deprivation differentiate lipid accumulation targets of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Bioengineered**, v. 3, p. 343 – 346, 2012.

CAKMAK, T.; ANGUN, P.; DEMIRAY, Y. E.; OZKAN, A. D.; ELIBOL, Z.; TEKINAY, T. Differential Effects of Nitrogen and Sulfur Deprivation on Growth and Biodiesel Feedstock Production of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, p. 1947 – 1957, 2012.

CALIJURI, M. L.; ASSEMAN; SANTIAGO. In: **Engenharia Ambiental: Conceitos, Tecnologia e Gestão**. Maria do Carmo Calijuri e Davi Gasparini Fernandes Cunha – Coordenadores. Editora Elsevier. 832 p. São Paulo, 2012.

CHEN, C.; YEH, K.; AISYAH, R.; LEE, D.; CHANG, J. Cultivation, Photobioreactor Design and Harvesting of Microalgae for Biodiesel Production: A Critical Review. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 71-81, 2011.

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

CONTRERAS, A.; GARCIA, F.; E. MOLINA. MERCHUK, J. C. Interaction between CO₂ – mass transfer, light availability, and hydrodynamic stress in the growth of *phaedactylumtricornutum* in a concentric tube airlift photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 60, p. 317-325, 1998.

COSTA, J. A. V.; RADMANN, E. M.; CERQUEIRA, V. S.; CALHEIROS, M. N. Perfil de Ácidos Graxos das Microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* Cultivadas em Diferentes 8eCondições. **Alim. Nutr.**, v. 17, nº 4, p. 429 – 436, 2006.

CUARESMA, M.; JANSSEN, M.; VILCHEZ, C.; WIJFFELS, R. H. Horizontal or Vertical Photobioreactors? How to Improve Microalgae Photosynthetic Efficiency. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 5129 – 5137, 2011.

DALCANTON, F. **Modelagem matemática do crescimento de cianobactérias ácido lácticas em condições isotérmicas e não isotérmicas**. 190 f. Tese (Doutorado em Engenharia dos Alimentos). Centro de Tecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

DEMIRBAS, A. Biodiesel from oilgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: A solution to pollution problems. **Applied Energy**, v. 88, p. 3541 – 3547, 2011.

DEMIRBAS, A.; DEMIRBAS, M. F. **Algae Energy. Algae as a New Source of Biodiesel**. Editora Springer. Londres, 2010. ISBN: 978-1-84996-050-2. 204 p.

ESTEVES, F. de A. **Fundamentos de Limnologia**. 2a edição. Interciência: Rio de Janeiro, 225 p.

FAN, J.; YAN, C.; ANDRE, C.; SHANKLIN, J.; SCHWENDER, J. XU, C. Oil accumulation is controlled by carbon precursor supply for fatty acid synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant & Cell Physiology**, v. 53, p. 1380 – 1390, 2012.

FOLCH, J; LEES, M. STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem**, v. 22, p. 497-509, 1957.

GARDNER, R. D.; LOHMAN, E.; GERLACH, R.; COOKSEY, K. E.; PEYTON, B. M. Comparison of CO₂ and Bicarbonate as Inorganic Carbon Sources for Triacylglycerol and Starch Accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 1, p. 87 – 96, 2013.

GUALTIERI, P.; BARSANTI, L. **Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology**. CRC Press, Taylor and Francis Group, 2006, 301 p.

GUILLARD, R.R.L.; LORENZEN, C.J. WC Medium. In: ANDERSEN, R.A. **Algal culturing techniques**. Academic Press, 2005. 578 p.

HIRATA, S. et al. Carbon dioxide fixation in batch culture of *Chlorella* sp. using a photobioreactor with a sun light-collection device. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.81 (5) p.470-472, 1996.

HO, S.; LU, W.; CHANG, J. Photobioreactor strategies for improving the CO₂ fixation efficiency of indigenous *Scenedesmus obliquus* CNW-N: Statistical optimization of CO₂ feeding, illumination, and operation mode. **Bioresource Technology**, v. 105, p. 106 – 113, 2012.

IRIHIMOVITCH, V.; YEHUDAI-RESHEFF, S. Phosphate and sulfur limitation responses in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. **FEMS Microbiol Lett**, v.283, p. 1-8. 2008.

JANSON, M.; OLSSON, H.; PETTERSSON, K. Phosphatases; origin, characteristics and function in lakes. **Hydrobiologia**, v. 170, p. 157-175, 1998.

JORQUERA, O.; KIPERSTOK, A.; SALES, E. A.; EMBIRUÇU, M.; GHIRARDI, M. L. Comparative Energy Life-Cycle Analyses of Microalgal Biomass Production in Open Ponds and Photobioreactors. **Bioresource Technology**, v. 101, 1406 – 1413, 2010.

KHOZIN – GOLDBERG, I.; COHEN, Z. Unraveling algal lipid metabolism: Recent advances in gene identification. **Biochimie**, v. 93, p. 91 – 100, 2011.

KUMAR, K.; DAS, D. Growth characteristics of *Chlorella sorokiniana* in airlift and bubble column photobioreactors. **Bioresource Technology**, v. 116, p. 307 – 313, 2012.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2000. 531 p.

LEE, J. S. et. al. Effects of SO₂ and NO on growth of *Chlorella* sp. KR – 1. **Bioresource Technology**, v. 82, p. 1 – 4, 2002.

LI, T.; ZHENG, Y.; YU, L.; CHEN, S. Mixotrophic cultivation of a *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production. **Biomass and Bioenergy**, v. 30, p. 1 – 10, 2014.

LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1043 – 1049, 2009.

LIMA, G. F. da C. O. Debate da Sustentabilidade na Sociedade Insustentável. **Revista Eletrônica “Política e Trabalho”**, v. 21, p. 201 – 202, 1997

LIU, J.; HUANG, J.; FAN, K.W.; JIANG, Y.; ZHONG, Y.; SUN, Z.; C, F. Production Potencial of *Chlorella zofingienensis* as a Feedstock for Biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8658 – 8663, 2010.

LUO, H; AL-DAHMAN, M. H. Airlift Column Photobioreactors for *Porphyridium* sp. Culturing: Part I. Effects of Hidrodynamics and Reactor Geometry. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, p. 932 – 941, 2012.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A Review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 217 – 232, 2010.

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

MELO, M. A. V. **Perspectivas sobre o uso de microalgas como fonte de energia renovável e mitigação do dióxido de carbono**. 2010. 74f. Trabalho de Conclusão do Curso (Engenharia de Produção). Universidade Anhembi Morumbi, São Paulo, 2010. Disponível em: <engenharia.anhembi.br/tcc-10/prod-15.pdf> Acessado em outubro de 2011.

NOUE, J. DE LA; PAUW, N DE. The potential of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae. **Biotechnology Advanced**, vol. 6, p. 725 – 770, 1988.

RAWAT, I.; KUMAR, R.; MUTANDA, T.; BUX, F. Biodiesel from Microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. **Applied Energy**, v. 103, 444-467, 2013.

REIS, A. **Novas tecnologias de fotobiorreatores para produção de microalgas**. Laboratório de Energia e Geologia de Portugal. Curso ministrado -Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Agosto de 2011.

ROLEDA, M. Y.; SLOCOMBE, S. P.; LEAKEY, R. J. G.; DAY, J. G.; BELL, E. M.; STANLEY, M. S. Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 439 – 449, 2013.

SANTOS, P. V. **Seleção de cepas oleaginosas da microalga *Chlorella* spp. e otimização do seu cultivo em meio sintético e vinhaça visando à produção sustentável de biodiesel**. 139 f. Tese (Doutorado em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento. Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo. São Paulo, São Carlos. 2013.

SHINGH, R. N.; SHARMA, S. Development of sustainable photobioreactor for algal production – A review. **Renewable and Sustainable**, v. 16, p. 2347 – 2353, 2012.

SPERLING, M. V. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 3a edição. 2005. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – DESA. Universidade Federal de Minas Gerais. Volume 1, 452 p. ISBN: 85 – 7041-114-6.

SUNG, K.D. et al. CO₂ fixation by *Chlorella* sp. KR – 1 and its cultural characteristics. **Bioresource Technology**, v. 68, p. 269 – 273, 1999.

TANG, D.; HAN, W.; LI, P.; MIAO, X.; ZHONG, J. CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. **Bioresource Technology**, v. 102, 3071-3076, 2011.

UGWU, C. U.; AOYAGI, H. U. Photobioreactors for Mass Cultivation of Algae. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4021 – 4028, 2008.

VALDÉS, F.J.; HERNÁNDEZ, M.R.; CATALÁ, L.; MARCILLA, A. Estimation of CO₂ stripping/CO₂ microalgae consumption ratios in a bubble column photobioreactor using the analysis of the pH profiles. Application to *Nannochloropsis oculata* microalgae culture. **Bioresource Technology**, v. 119, 1-6, 2012.

WILLIAMS, P. J le B.; LAURENS, L. M. L. L. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. **Energy & Environmental Science**, v. 3, p. 554 – 590, 2010.

YANAGI, M.; WATANABE, Y.; SAIKI, H. CO₂ Fixation by *Chlorella* sp. HA-1 and its utilization. **Energy Conversion and Management**, v. 36, p. 713 – 716, 1995.

YOO, C.; JUN, S.; L. J.; A, C.; Oh, H. Selection of microalgae for lipid production under high level carbon dioxide. **Bioresource Technology**, v. 101, 571-574, 2010.

ZWIETERING, M. H.; JONGENBURGUER, I.; ROMBOUTS, F. M.; RIET, K. V. Modeling of the Bacterial Growth Curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1875 – 1881, 1990.