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

ADILSON DE JESUS CHAVES

Cultivo de *Chlorella* sp. em fotobiorreatores enriquecidos com CO₂ e avaliação da biomassa
para produção de biocombustíveis

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos – SP

2016

ADILSON DE JESUS CHAVES

Cultivo de *Chlorella* sp. em fotobiorreatores enriquecidos com CO₂ e avaliação da biomassa para produção de biocombustíveis

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: Prof^a. Titular Maria do Carmo Calijuri

São Carlos – SP

2016

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.

C225c Chaves, Adilson de Jesus
Cultivo de *Chlorella* sp. em fotobiorreatores enriquecidos com CO₂ e avaliação da biomassa para produção de biocombustíveis / Adilson de Jesus Chaves; orientadora Maria do Carmo Calijuri. São Carlos, 2016.

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, 2016.

1. Biocombustíveis. 2. *Chlorella* sp.. 3. Biofixação de CO₂. 4. Assimilação de nutrientes. 5. Fotobiorreator bag. 6. Fotobiorreator placa plana. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Bacharel **ADILSON DE JESUS CHAVES**.

Título da dissertação: "Cultivo de *Chlorella* sp. em fotobiorreatores enriquecidos com CO₂ e avaliação da biomassa para produção de biocombustíveis".

Data da defesa: 23/09/2016.

Comissão Julgadora:

Resultado:

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

Reprovado

Profa. Dra. **Patricia Bortoletto de Falco Perna**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

APROVADO

Prof. Dr. **Vanildo Luiz Del Bianchi**
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP-São José do Rio Preto)

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 **Luis Fernando Costa Alberto**

Dedico este trabalho aos meus
entes-queridos que estiveram ao
meu lado em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu pai acadêmico Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi que, em um almoço diário no restaurante universitário do IBILCE/UNESP, me convidou para trabalhar com cultivo de microalga e propiciou conhecer a linha de pesquisa existente na EESC/USP.

À minha mãe acadêmica Prof^a. Titular Maria do Carmo Calijuri que aceitou me orientar e possibilitou que eu tivesse acesso a uma infraestrutura e todos os recursos necessários para realização deste trabalho.

Ao meu irmão acadêmico Prof. Dr. Paulo Vagner dos Santos que, sem o qual o surgimento, desenvolvimento e finalização desse trabalho não teria sido possível. Obrigado pela dedicação, paciência, ensinamentos e toda contribuição à vida acadêmica e pessoal que me proporcionou.

Às minhas parceiras de laboratório Me. Andréia Vanessa Stocco Ortolan, Me. Amanda Menegante Neri e Me. Gabriela Albino Marafão que fizeram dos dias de trabalho momentos felizes e de aprendizado. Agradeço incommensuravelmente as tardes de café e prosa.

À especialista em laboratório Dr^a. Adriana Cristina Poli Miwa que me auxiliou na realização de experimentos e na interpretação de resultados.

À toda equipe do laboratório BIOTACE no qual pude desfrutar de momentos de descontração e colaboração mútua.

Especialmente à minha companheira Karina Silvia Mateus que mesmo na distância se fez presente em todos os momentos de minha existência, me completando com todo bem querer que há e me roubando de mim.

À minha irmã acadêmica Dr^a. Fernanda de Matos Ferraz que apoiou e acolheu do momento em que entrei em contato para prestar o mestrado até o final desse ciclo.

A todos os meus amigos e amigas que moram em meu coração e acreditam em meu potencial, me incentivando e se fazendo família.

A todos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento que contribuíram para minha formação e para realização deste trabalho.

Às agências de fomento CNPq e CAPES que financiaram esse projeto e concederam minha bolsa de pesquisa.

Meu muito obrigado ☺

“O homem é a medida de todas as coisas”

Protágoras

RESUMO

CHAVES, A. J. **Cultivo de *Chlorella* sp. em fotobiorreatores enriquecidos com CO₂ e avaliação da biomassa para produção de biocombustíveis**. 2016. 92 f. Dissertação (mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

A busca por fontes de energia renovável acontece em ritmo crescente em função do superaquecimento da Terra e mudanças climáticas causadas, especialmente, pela emissão de CO₂. Entre as possibilidades de obter-se energia renovável, os biocombustíveis produzidos a partir do cultivo de microalgas apresentam-se como alternativa potencial. Microalgas podem alcançar altas taxas de produção a partir do consumo de energia luminosa, assimilação de nutrientes e biofixação de CO₂ e sua biomassa pode dar origem a bioetanol, biogás, biodiesel e a outros bioprodutos de interesse biotecnológico. Visando avaliar a produção de biomassa e atividade metabólica, sob processo fotoautotrófico, 3 cepas de *Chlorella* sp. foram cultivadas em triplicata em fotobiorreatores *bag* (1ª ETAPA) e a cepa selecionada como mais produtiva foi cultivada em um fotobiorreator placa plana (2ª ETAPA) dimensionado para melhoramento de processos fotossintéticos. Para o cultivo, realizado em batelada, utilizou-se o meio M-8 com adição de 5% de CO₂, radiação luminosa de 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo 12h claro/escuro. Foram monitoradas a assimilação de nutrientes, a taxa de CO₂ biofixado, a produção de biomassa e determinado o perfil bioquímico. Na 1ª ETAPA, a cepa DAM04 apresentou o melhor desempenho com assimilação de 37,5% ($157,61 \pm 17,39$ de 420,00 mg.L^{-1}) do nitrogênio e 16,1% ($34,42 \pm 3,96$ de 213,90 mg.L^{-1}) do fósforo presente no meio de cultivo, taxa de CO₂ biofixado de $0,193 \pm 0,019$ $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e produção de biomassa de $2,22 \pm 0,21$ g.L^{-1} . A determinação do perfil bioquímico revelou acúmulo de lipídeos de $18,0 \pm 0,5\%$, constituídos por 50,0% de ácidos graxos saturados, 21,3% de monoinsaturados e 18,0% de polinsaturados e produtividade lipídica, proteica e de carboidratos de $25,20 \pm 1,80$ $\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, $62,02 \pm 4,43$ $\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e $17,78 \pm 1,27$ $\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, respectivamente. Devido ao seu desempenho, a cepa DAM04 foi utilizada na 2ª ETAPA e o cultivo no fotobiorreator placa plana aumentou o desempenho da cepa em todos os parâmetros, implicando na assimilação de 89,1% ($374,12 \pm 27,76$ de 420,00 mg.L^{-1}) do nitrogênio e 40,9% ($87,37 \pm 10,12$ de 213,90 mg.L^{-1}) do fósforo, cerca de 3 vezes (de $0,193 \pm 0,019$ para $0,593$ $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) da taxa de CO₂ biofixado e da produção de biomassa (de $2,22 \pm 0,21$ para $5,4$ g.L^{-1}) em relação ao fotobiorreator *bag*. O perfil bioquímico apresentou aumento na produtividade lipídica e proteica de, aproximadamente, 3 vezes (de $25,20 \pm 1,80$ para $79,16 \pm 1,52$ $\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) e (de $62,02 \pm 4,43$ para $168,44 \pm 1,25$ $\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), respectivamente, e 2 vezes na produtividade de carboidratos (de $17,78 \pm 1,27$ para $40,46 \pm 0,33$ $\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) quando comparados ao fotobiorreator *bag*. A 2ª ETAPA reforçou o potencial da cepa DAM04 para aplicação na biossíntese de compostos bioenergéticos de aplicação na produção de biocombustíveis e coloca como desafio para futuros trabalhos a exploração do potencial das cepas para biofixação de maiores concentrações de CO₂ e otimização da captação de radiação luminosa.

Palavras-chave: Biofixação, Fotossíntese, Energia renovável.

ABSTRACT

CHAVES, A. J. **Cultivation of *Chlorella* sp. in photobioreactors enriched with CO₂ and evaluation of biomass for biofuel production.** 2016. 92 f. Dissertação (mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

The search for renewable energy sources happens at an increasing rate due to the overheating of the earth and climate change caused especially by the emission of CO₂. Some of the possibilities to obtain renewable energy, biofuels produced from microalgae cultivation are presented as potential alternative. Microalgae can achieve high production rates from light energy consumption, nutrient assimilation and CO₂ biofixation and their biomass can give rise to bioethanol, biogas, biodiesel and other bio-products of biotechnological interest. Aiming to evaluate the production of biomass and metabolic activity under photoautotrophic process, 3 strains of *Chlorella* sp. was grown in triplicate in photobioreactor *bag* (1^a STAGE) and the most productive strain was selected and grown in a photobioreactor flat plate (2^a STAGE) dimensioned for enhancing photosynthetic processes. For growing, performed, sequencing batch, we used the medium M-8 with addition of 5% CO₂, light radiation 200 $\mu\text{mol.photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and a photoperiod 12h light/dark. Were monitored assimilation of nutrients, CO₂ biofixation rate, biomass production and determined the biochemical profile. In 1^a STAGE, the DAM04 strain showed best performance with assimilation of 37,5% (157,61 $\pm$ 17,39 of 420,00 mg.L⁻¹) of nitrogen and 16,1% (34,42 $\pm$ 3,96 of 213,90 mg.L⁻¹) of phosphorus present in the medium, CO₂ biofixation rate of 0,193 $\pm$ 0,019 g.L⁻¹.d⁻¹ and biomass production 2,22 $\pm$ 0,21 g.L⁻¹. The determination of biochemical profile showed accumulation of lipids to 18,0 $\pm$ 0,5%, consisting of 50,0% of saturated fatty acids, 21,3% of monounsaturated and 18,0% polyunsaturated and lipid productivity, protein and carbohydrates of 25,2 $\pm$ 1,80 mg.L⁻¹.d⁻¹, 62,02 $\pm$ 4,43 mg.L⁻¹.d⁻¹ and 17,78 $\pm$ 1,27 mg L⁻¹.d⁻¹, respectively. Due to its performance, DAM04 strain was used in STAGE 2^a and cultivation in the photobioreactor flat plate increased strain performance in all parameters, resulting in the assimilation of 89,1% (374,12 $\pm$ 27,76 of 420,00 mg.L⁻¹) of nitrogen and 40.9% (87,37 of 213,90 $\pm$ 10,12 mg.L⁻¹) of phosphorus, about 3 times (of 0,193 $\pm$ 0,019 to 0,593 g.L⁻¹.d⁻¹) of CO₂ biofixation rate and biomass production (of 2,22 $\pm$ 0,21 to 5,4 g.L⁻¹) relative to the photobioreactor *bag*. The biochemical profile showed an increase in lipid and protein productivity of approximately 3 times (of 25,20 $\pm$ 1,80 to 79,16 $\pm$ 1,52 mg.L⁻¹.d⁻¹) and (of 62,02 $\pm$ 4,43 to 168,44 $\pm$ 1,25 mg.L⁻¹.d⁻¹), respectively, and 2 times in the productivity of carbohydrates (of 17,78 $\pm$ 1,27 to 40,46 $\pm$ 0,33 mg.L⁻¹.d⁻¹) compared to the photobioreactor *bag*. The 2^a STAGE reinforced the potential of DAM04 strain for use in the biosynthesis of bioenergetic compounds application in the production of biofuels and puts as a challenge for future studies exploring the potential of strains to biofixation of higher CO₂ concentrations and optimization capture light radiation.

Keywords: Biofixation, Photosynthesis, Renewable Energy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fontes de energia via conversão de biomassa microalgal usando bioquímica, termoquímica, química e processo de combustão direta. Fonte: Tsukahara e Sawayama (2005) com adaptação de Wang (2008).	32
Figura 2 - Curva de crescimento e efeito de fotoinibição em função da intensidade luminosa. Fonte: Adaptado de Chisti (2007)	38
Figura 3 - Esquema de fotobiorreator placa plana. Fonte: Adaptado de Sierra et al. (2008) ...	45
Figura 4 - Fotobiorreatores <i>bag</i> em diferentes disposições. Fonte: Retirado de a) Lehr e Posten (2009), b) Phytoplankton Culture for Aquaculture Feed, c) POWER: NMSU explores algal biofuel production from wastewater e d) Algal Cell Culture Media.	47
Figura 5 - 1ª Etapa com as principais atividades a serem realizadas.....	48
Figura 6 - 2ª Etapa com as principais atividades a serem realizadas.....	49
Figura 7 - Esquema de funcionamento do fotobiorreator <i>bag</i> alimentado com ar e CO ₂	53
Figura 8 - Configuração dos fotobiorreatores <i>bag</i> , da esquerda à direita, os 3 primeiros referem-se ao cultivo controle e os outros 3 referem-se ao cultivo enriquecido com 5% de CO ₂ , sendo (a) após inoculação e (b) no 10º dia.	53
Figura 9 - Esquema de fotobiorreator placa plana dimensionado para cultivo de microalgas. Legenda: 1 – Parafuso borboleta; 2 – Abertura para sensores; 3 – Saída de gás; 4 – Tampa removível; 5 – Entrada de gás; 6 – Entrada de Meio de Cultura; 7 – Placa de vidro temperado; 8 – Parede de aço inox; 9 – Suporte; 10 – Coletor de amostra; 11 – Bocal difusor.	55
Figura 10 - Configuração do fotobiorreator placa plana para o cultivo da cepa DAM04 no (a) 1º dia e (b) 5º dia de cultivo enriquecido com 5% de CO ₂	56
Figura 11 - Variação de pH no meio de cultivo (a) M-8 e (b) BG-11 sob adição de 2 e 5% de CO ₂	61
Figura 12 - Perfil de crescimento das cepas de <i>Chlorella</i> (a) DAM04, (b) C203 e (c) VIN01.	65

Figura 13 - Perfil de pH para as cepas de *Chlorella* a) DAM04, b) C203 e c) VIN01 e OD para d) DAM04, e) C203 e f) VIN01..... 68

Figura 14 - Perfil de crescimento da cepa DAM04 cultivada em fotobiorreator placa plana.. 76

Figura 15 - Perfil de pH e OD durante cultivo da cepa de *Chlorella* DAM04 em fotobiorreator placa plana..... 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Conteúdo dos principais componentes químicos de <i>Chlorella protothecoides</i> cultivada em processo autotrófico e heterotrófico.....	28
Tabela 2 - Teor celular de cepas de <i>Chlorella</i> crescendo em meio de cultivo Watanabe com baixa concentração de nitrogênio.	28
Tabela 3 - Empresas de tecnologia de cultivo de microalgas e cianobactérias.	30
Tabela 4 - Características da biomassa e potencial da digestão anaeróbica.....	34
Tabela 5 - Cultivo de <i>Chlorella</i> sobre diferentes concentrações de CO ₂ , produção de biomassa e CO ₂ biofixado.	36
Tabela 6 - Produção de biomassa para <i>Chlorella</i> em função da luminosidade e do fotoperíodo.	39
Tabela 7 - Variação da solubilidade de CO ₂ com a temperatura.....	40
Tabela 8 - Solubilidade de sais (g.Kg ⁻¹) com a temperatura.	41
Tabela 9 - Produção e produtividade de <i>Chlorella</i> cultivada em sistema fechado e temperatura do sistema.	41
Tabela 10 - Comparação entre sistemas abertos e fechados para cultivo de microalgas em larga escala.	44
Tabela 11 - Características e desempenho de fotobiorreatores para cultivo de microalgas.	45
Tabela 12 - Especificações de fotobiorreatores.....	46
Tabela 13 - Composição química dos meios de cultivo W.C, M-8 e BG-11.	51
Tabela 14 - Análises, métodos e equipamentos utilizados.	58
Tabela 15 - Assimilação de carbono, nitrogênio e fósforo pelas cepas DAM04, C203 e VIN01.....	62
Tabela 16 - Taxa de biofixação de CO ₂ pelas cepas DAM04, C203 e VIN01.....	63

Tabela 17 - Biofixação de CO ₂ pelas cepas DAM04, C203, VIN01 e outras cepas.....	64
Tabela 18 - Produção final de biomassa e parâmetros de crescimento para as cepas DAM04, C203 e VIN01.	66
Tabela 19 - Teor de lipídeos, carboidratos, proteínas e cinzas para as cepas DAM04, C203 e VIN01.....	70
Tabela 20 - Perfil de ácidos graxos referente à porção lipídica das cepas DAM04, C203 e VIN01.....	71
Tabela 21 - Teor e produtividade celular de cepas de <i>Chlorella</i> cultivadas sob baixa concentração de nitrogênio.	73
Tabela 22 - Assimilação de nutrientes pela cepa DAM04 no fotobiorreator placa plana.	74
Tabela 23 - Biofixação de CO ₂ pela cepa DAM04 no fotobiorreator placa plana.....	75
Tabela 24 - Produção de biomassa e parâmetros de crescimento.	76
Tabela 25 - Teor de lipídeos, carboidratos, proteínas e cinzas.	79
Tabela 26 - Perfil de ácidos graxos referente à porção lipídica da cepa DAM04.....	80
Tabela 27 - Compilação de produtividade de biomassa, lipídeos e carboidratos de <i>Chlorella</i> em diferentes fotobiorreatores.	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ	Velocidade Específica de Crescimento
APHA	American Public Health Association
B	Produção de Biomassa
BIOTACE	Laboratório de Biotoxicologia em Águas Continentais e Efluentes
C	Fração de Massa do Carbono pela Biomassa
C203	Cepa de <i>Chlorella</i> sp.
CI	Carbono Inorgânico
COD	Carbono Orgânico Dissolvido
COT	Carbono Orgânico Total
CO ₂ biofixado	Taxa de CO ₂ biofixado
CT	Carbono Total
DAM04	Cepa de <i>Chlorella</i> sp.
EESC	Escola de Engenharia de São Carlos
FBR	Fotobiorreator
LED	Light Emitting Diode
m _C	Massa Molar de Carbono
m _{CO2}	Massa Molar de CO ₂
NTK	Nitrogênio Total Kjeldahl
OD	Oxigênio Dissolvido
P	Produtividade de Biomassa
pH	Potencial Hidrogeniônico

rpm	Rotação por Minuto
SSI	Sólidos Suspensos Inorgânicos
SSO	Sólidos Suspensos Orgânicos
SST	Sólidos Suspensos Totais
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
T	Teor (%)
t	Tempo
T _g	Tempo de Geração
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
USP	Universidade de São Paulo
V	Volume
VIN01	Cepa de <i>Chlorella</i> sp.
vvm	Volume de gás por Volume de meio por Minuto
X	Biomassa

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	23
2.	OBJETIVO GERAL	25
	1ª ETAPA.	25
	2ª ETAPA.	25
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
3.1	Microalgas	26
3.2	<i>Chlorella</i> sp.....	27
3.3	Aplicação	29
3.4	Microalgas e Biocombustíveis.....	30
3.5	Fatores relacionados ao cultivo.....	35
3.5.1	Fonte de Carbono: processo fotoautotrófico	35
3.5.2	Nutrientes	36
3.5.3	Luminosidade	38
3.5.4	pH	39
3.5.5	Temperatura.....	40
3.5.6	Agitação e Aeração.....	41
3.5.7	Sistemas Abertos e Fechados de Cultivo.....	43
4.	MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1	Fluxograma Experimental.....	48
4.2	Local da pesquisa.....	49
4.3	Microalga	50
4.4	1ª ETAPA	50
4.4.1	Seleção de meio de cultivo rico em nutrientes	50
4.4.2	Determinação de CO ₂ para enriquecimento do cultivo	52
4.4.3	Determinação das condições de cultivo e monitoramento	52
4.4.4	Cultivo de 3 cepas de <i>Chlorella</i> sp. em fotobiorreator <i>bag</i>	52

4.4.5	Seleção da cepa com maior produtividade para 2ª ETAPA.....	54
4.5	2ª ETAPA.....	54
4.5.1	Dimensionamento de fotobiorreator placa plana	54
4.5.2	Cultivo da cepa de <i>Chlorella</i> sp. mais produtiva, selecionada na 1ª ETAPA, em fotobiorreator placa plana	56
4.5.3	Comparação do potencial bioenergético apresentado pela cepa entre fotobiorreator <i>bag</i> e placa plana.....	57
4.5.4	Avaliação da assimilação de nutrientes e biofixação de carbono pelas cepas ...	57
4.5.5	Determinação da produção de biomassa e do perfil bioquímico	57
4.5.6	Análises físicas e bioquímicas realizadas	58
4.6	Cálculo dos parâmetros de produtividade e biofixação de CO ₂	59
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
5.1	1ª ETAPA	60
5.1.1	Seleção de meio de cultivo rico em nutrientes.....	60
5.1.2	Determinação da concentração de CO ₂ para adição no meio de cultivo	61
5.1.3	Assimilação de nutrientes e biofixação de CO ₂	62
5.1.4	Produção de biomassa e cinética de crescimento.....	64
5.1.5	Análise bioquímica de lipídeos, carboidratos e proteínas.....	69
5.1.6	Seleção da cepa para 2ª ETAPA	74
5.2	2ª ETAPA	74
5.2.1	Assimilação de nutrientes e biofixação de CO ₂	74
5.2.2	Produção de biomassa e cinética de crescimento.....	75
5.2.3	Análise bioquímica de lipídeos, carboidratos e proteínas.....	79
6.	CONCLUSÕES	83
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

1. INTRODUÇÃO

Estudos visando o uso de energias renováveis estão em voga e têm se intensificado a cada ano. Isso porque assuntos como superaquecimento da Terra e mudanças climáticas têm sido frequentemente discutidos. A causa encontrada para esses fenômenos são os gases emitidos durante a combustão de combustíveis fósseis. Entre esses gases, o CO_2 é considerado o principal contribuinte para o efeito estufa.

Combustíveis fósseis, além de contribuírem para emissão de CO_2 , levam milhares de anos para se formar a partir da decomposição da matéria orgânica, sendo, por esse motivo, considerados recursos finitos. Assim, têm-se buscado por fontes de energia renovável e entre elas destacam-se os biocombustíveis que são produzidos a partir de matéria orgânica. Biodiesel, biogás e bioetanol são exemplos de biocombustíveis que, através de processos termoquímicos, físico-químicos ou biológicos, podem ser produzidos a partir da utilização de matéria-prima, como cana-de-açúcar, milho, soja, resíduos vegetais e animais ou micro-organismos, como microalgas. As microalgas apresentam maior potencial à obtenção de energia renovável, pois taxas de crescimento e de produção de biomassa são maiores em relação a vegetais vasculares, além de não competirem por terras aráveis e poderem ser usadas, concomitantemente, como biorremediadores na remoção de nutrientes de efluentes e biofixação de gases como CO_2 .

Microalgas utilizam energia luminosa e, principalmente, CO_2 como fonte de carbono no processo fotoautotrófico e produzem biomassa contendo carboidratos, lipídeos, proteínas e outros bioprodutos utilizados por indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas. Seu cultivo é realizado através de sistemas abertos ou fechados. No sistema fechado são utilizados fotobiorreatores que possibilitam maior controle sobre os fatores relacionados ao cultivo, tais como enriquecimento do meio com adição de CO_2 , iluminação do sistema e cultivo de diferentes espécies de microalgas. Dentre os fotobiorreatores, o placa plana apresenta melhor desempenho para controle dos fatores, além de possibilitar maior disponibilidade de energia luminosa devido sua maior relação de área por volume.

O grupo de pesquisa coordenado pela pesquisadora Maria do Carmo Calijuri isolou e selecionou cepas potencialmente oleaginosas de *Chlorella* sp. e tem investigado e selecionado fatores químicos, físicos e tróficos para melhorar a produtividade de biocomponentes de aplicação na produção de biocombustíveis. As cepas de *Chlorella* sp. foram isoladas e cultivadas em vinhaça, pelo pesquisador Paulo Vagner dos Santos, e apresentaram produtividade de biomassa de $154,4 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, lipídeos de $18,7 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, além de remover $57,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de nitrogênio e $13,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de fósforo.

O desafio dessa pesquisa foi cultivar cepas de *Chlorella* sp. em processo fotoautotrófico, analisar o potencial de produtividade, assimilação de nutrientes e biofixação de CO_2 pela microalga e sua caracterização com vista para o uso na produção de biocombustíveis. Deste modo, pretende-se contribuir para a ampliação do conhecimento referente a processos biotecnológicos e condições de cultivo.

2. OBJETIVO GERAL

O principal objetivo dessa pesquisa foi cultivar *Chlorella* sp. em meio de cultivo sintético enriquecido com CO₂ sob processo fotoautotrófico, avaliar a produtividade e atividade metabólica da microalga utilizando fotobiorreator *bag* e placa plana e o potencial da biomassa para produção de biocombustíveis.

Para atingir o objetivo proposto, esta pesquisa foi dividida em 2 etapas:

1ª ETAPA.

- Cultivar 3 cepas de *Chlorella* sp. em fotobiorreator *bag*;
- Avaliar a assimilação de nutrientes e biofixação de carbono pelas culturas;
- Determinar a produtividade e o perfil bioquímico da biomassa produzida no final do cultivo;
- Selecionar a cepa com maior produtividade para 2ª ETAPA.

2ª ETAPA.

- Cultivar a cepa mais produtiva de *Chlorella* sp., selecionada na 1ª ETAPA, em fotobiorreator placa plana;
- Avaliar a assimilação de nutrientes e biofixação de carbono pelas culturas;
- Determinar a produtividade e o perfil bioquímico da biomassa produzida no final do cultivo;
- Comparar o potencial de produtividade de biomassa e perfil bioquímico apresentado pela cepa entre fotobiorreator *bag* e placa plana.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Microalgas

Microalgas são micro-organismos fotoautotróficos que possuem envoltório nuclear e organelas e utilizam radiação luminosa como fonte de energia e CO₂ como fonte de carbono.

No processo fotoautotrófico, os mecanismos metabólicos acontecem no cloroplasto em duas etapas:

Etapa fotoquímica: no tilacóide, a radiação luminosa absorvida pelas clorofilas promove a excitação de elétrons que se deslocam a partir do complexo do citocromo até o centro de reação, levando à fosforilação oxidativa e à fotólise da água que resulta na formação de O₂ e geração de ATP e NADPH₂, que são compostos energéticos utilizados na segunda etapa.

Etapa química: no estroma, independente da presença de radiação luminosa, ATP e NADPH₂ são utilizados no ciclo de Calvin-Benson e o CO₂ é biofixado, dando origem a diferentes compostos de valor agregado, como carboidratos, proteínas e lipídeos.

Desse modo, temos:

Equação da etapa fotoquímica.

Equação da etapa química.

Enquanto os cloroplastos transformam energia luminosa em compostos orgânicos, as mitocôndrias realizam processo inverso e consomem parte da energia estocada e do O₂ para sua manutenção. Deste modo, simplificadamente, a representação para fotossíntese e respiração celular é:

Equação fotossíntese *versus* respiração celular.

Além disso, existem linhagens capazes de obter energia e carbono de matéria orgânica, denominadas quimioheterotróficas, ou que assimilam tanto matéria orgânica quanto CO₂, nesse caso, denominadas mixotróficas (MARQUEZ et al., 1993; CHOJNACKA; NOWORYTA, 2004; ANDRADE; COSTA, 2007). As microalgas evoluíram a partir de um ancestral há, aproximadamente, 3 milhões de anos e foram responsáveis pela formação atmosférica, contribuindo, no mar, com 90% da fotossíntese e 60% pela produção primária na Terra, absorvendo CO₂ e produzindo O₂ (LOURENÇO, 2006; CHISTI, 2007). A reprodução, normalmente, acontece em velocidade inferior a 24 horas, dependendo da microalga, e, principalmente, das condições de cultivo. Segundo Mata, Martins e Caetano (2010), é possível observar 5 fases no crescimento celular de microalgas, sendo: adaptação ou fase lag, exponencial ou fase log, final da exponencial, estacionária e de senescência. A fase exponencial é a faixa de interesse para se estabelecer aspectos como produção de biomassa e produtividade alcançada no cultivo de microalgas como *Chlorella* sp. (SANTOS, 2013).

3.2 *Chlorella* sp.

O gênero *Chlorella* possui estrutura unicelular eucariótica e, a partir das diferentes espécies existentes, pode assumir forma elipsoidal, ovóide ou esférica, pertencendo à classe *Chlorophyceae*, ordem *Chlorococcales* e família *Oocystaceae* (HOEK; MANN; JAHNS, 1995). Sua composição é variável e, além da espécie estudada, as condições do meio no qual ela cresce tem influência direta na sua constituição.

Chlorella protothecoides, ao ser cultivada em processo fotoautotrófico e heterotrófico, apresentou diferente composição química (Tabela 1).

Tabela 1 - Conteúdo dos principais componentes químicos de *Chlorella protothecoides* cultivada em processo autotrófico e heterotrófico.

Componente (%)	Autotrófico	Heterotrófico
Proteína	52,64±0,26	10,28±0,10
Lípido	14,57±0,16	55,20±0,28
Carboidrato	10,62±0,14	15,43±0,17
Cinza	6,36±0,05	5,93±0,04
Umidade	5,39±0,04	1,96±0,02

Fonte: Adaptado de Xu, Miao e Wu (2006).

No trabalho realizado por Illman, Scragg e Shales (2000), foram avaliadas diferentes espécies de *Chlorella* em processo fotoautotrófico, com baixa concentração de nitrogênio no meio de cultivo e foi possível observar que cada espécie apresentou variação no teor dos seus constituintes havendo maior teor de carboidratos no cultivo controle e de lipídeos sob limitação de nitrogênio (Tabela 2).

Tabela 2 - Teor celular de cepas de *Chlorella* crescendo em meio de cultivo Watanabe com baixa concentração de nitrogênio.

Cepa	Condição	Componente (%)		
		Proteína	Carboidrato	Lipídio
<i>C. vulgaris</i>	Controle	29 ± 2.5	51 ± 2	18 ± 2.1
	Baixo-N	7 ± 1.6	55 ± 3.2	40 ± 2.1
<i>C. emersonii</i>	Controle	32 ± 2.9	41 ± 2.5	29 ± 2.5
	Baixo-N	28 ± 3.8	11 ± 2.2	63 ± 1.0
<i>C. protothecoides</i>	Controle	38 ± 3.0	52 ± 2.3	11 ± 3.2
	Baixo-N	36 ± 3.0	41 ± 3.0	23 ± 1.2
<i>C. sorokiniana</i>	Controle	45 ± 2.9	38 ± 2.2	20 ± 1.6
	Baixo-N	42 ± 1.6	32 ± 2.5	22 ± 2.6
<i>C. minutissima</i>	Controle	24 ± 3.1	42 ± 3.5	31 ± 3.2
	Baixo-N	9 ± 2.0	14 ± 2.1	57 ± 2.5

Fonte: Adaptado de Illman; Scragg; Shales (2000).

Entre o gênero *Chlorella* têm-se o uso de *Chlorella vulgaris*, *Chlorella minutissima*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella protothecoides* e *Chlorella pyrenoidosa* no qual são, comumente, explorados o potencial de produtividade de biomassa e óleos e a capacidade para aplicação na fixação de CO₂ e bioremediação na remoção de compostos orgânicos, nitrogênio e fósforo dentre outros (KOTHARI et al., 2012; ZHENG et al., 2013; BELOTTI et al., 2014; ESPINOSA-GONZALEZ; PARASHAR; BRESSLER, 2014; LI et al., 2011).

3.3 Aplicação

A indústria de biotecnologia tem explorado significativamente, nos últimos anos, as potencialidades de microalgas, devido aos bioprodutos de alto valor agregado que podem ser produzidos, sendo utilizados em diversos setores, como alimentício, farmacêutico, biorremediação e produção de biocombustíveis (ANDRADE; COSTA, 2007; DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2011; SINGH; OLSEN, 2011). A clorofila é o pigmento natural que confere coloração verde à microalga e que, embora seja utilizada na produção de alimentos e cosméticos, não foi completamente investigada (BERTOLDI; SANT'ANNA; OLIVEIRA, 2008; CHIA; LOMBARDI; MELÃO, 2013). Microalgas, por possuírem altos teores de proteínas, vitaminas, biopolímeros e polissacarídeos, são utilizadas como fertilizantes e suplemento alimentar, tanto humano como animal (DOUCHA et al., 2009; BRENNAN; OWENDE, 2010; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

Em termos de composição, apesar da diversidade de microalgas, proteínas, carboidratos e lipídeos aparecem em maior quantidade (COUTTEAU, 1996). A partir disso, pesquisas são realizadas a fim de analisar, compreender e manipular as melhores condições de cultivo para produzir em maior proporção o bioproduto de interesse (BROWN; ZEILER, 1993; SANTOS, 2013).

Microalgas possuem vantagens em relação a vegetais vasculares na velocidade de crescimento, eficiência fotossintética e por poderem ser cultivadas em terras não aráveis, águas salgadas, salobras e residuárias. Além de reduzirem carga orgânica, consomem fósforo e nitrogênio presentes no meio de cultivo (CHISTI, 2007; MEZZOMO et al., 2010). Desse modo, ao apresentarem tais características seus bioprodutos, como ácidos graxos, esteróis, carotenóides, ficocolóides, compostos halogenados entre outros, são largamente explorados por diversos setores, especialmente pela indústria de bioenergia, como apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Empresas de tecnologia de cultivo de microalgas e cianobactérias.

Empresa	Tecnologia	Localidade	Mercados/Produtos
Algatech	Reatores fechados	Israel	Nutrição e Saúde
Algenol	Reatores fechados	EUA (Flórida)	Biocombustíveis, Produtos Químicos
PetroAlgae	Tanques abertos	EUA (Flórida)	Biocombustíveis, Proteína
Solazyme	Reatores fechados	EUA (Califórnia)	Biocombustíveis, Nutrição e Saúde, Produtos Químicos
Seambiotic	Tanques abertos	Israel	Tecnologia

Fonte: Adaptado de Cruz (2011)

3.4 Microalgas e Biocombustíveis

Aquecimento global e mudanças climáticas são assuntos discutidos com relação aos danos causados, especialmente, devido ao uso intenso de combustíveis fósseis no qual são constituídos pelo petróleo, carvão e gás natural que foram formados pela decomposição de matéria orgânica animal e vegetal em milhões de anos, tendo sua exploração elevada com a revolução industrial e com o uso de motor à combustão interna (ROCKSTRÖM, 2009; BRENNAN; OWENDE, 2010). Através da combustão, há a liberação de diversos gases poluentes, como monóxido de carbono, metano, óxido nítrico, hidrofluorcarbonetos, perfluorcarbonetos e, considerado o principal responsável pelo superaquecimento da Terra, dióxido de carbono (STERN et al., 2006). Desse modo, a diminuição de reservas fósseis e problemas ambientais conduzem para busca de fontes de energia alternativas e renováveis.

Existem diversas pesquisas sendo realizadas, como uso de energia eólica, solar, geotérmica, hidroelétrica, hidrogênio e biocombustíveis (GUSTAVSSON et al., 1995; BARBIER, 1997; GARCÍA-RODRÍGUEZ, 2002). Entre essas formas de se obter energia renovável, o biocombustível é a fonte com maior potencial para substituição do combustível fóssil (HUBER; IBORRA; CORMA, 2006).

A partir da biomassa utilizada no processo de produção, os biocombustíveis podem ser divididos em primeira, segunda ou terceira geração.

Biocombustíveis de primeira geração são produzidos a partir de cultivos alimentares com alto teor de amido, como milho, trigo e batatas; sacarose, como cana-de-açúcar ou óleos vegetais, como soja e girassol, passando por processos de prensagem, transesterificação, hidrólise e fermentação. (HAVLIK et al. 2011; PAULO, 2011). Embora tenha alta produção, o principal problema nesse processo é que seu cultivo necessita de terras aráveis, vindo a competir com a produção de alimentos. Esse fator pode influenciar no preço de alimentos ou em sua escassez pela competição entre essas produções (NAIK et al., 2010).

Biocombustíveis de segunda geração utilizam biomassa contendo compostos lignocelulósicos, cascas de vegetais, bagaço de cana-de-açúcar, madeira, entre outros (SIMS et al., 2010). A parede da lignocelulose é formada por celulose, hemicelulose e lignina e necessita ser quebrada para se utilizar os monossacarídeos no processo de fermentação. Antes da fermentação é realizado pré-tratamento, para desagregar a estrutura de carboidrato-lignina, e hidrólise, através de enzimas ou ácidos, que craqueiam moléculas longas de carboidratos em monômeros e, através de fermentação, é produzido bioetanol. Sua principal vantagem é que não compete, na agricultura, com a produção de alimentos e equivale a mais de 50% de biomassa produzida mundialmente (ESCOBAR, et al., 2009). Contudo, a etapa de pré-tratamento é a mais trabalhosa, tornando a produção em larga escala um processo inviável (HARUN et al., 2010).

Biocombustíveis de terceira geração, a partir da utilização de microalgas como fonte de biomassa, surgem como alternativa potencial para se atingir a sustentabilidade na geração de energia (CHISTI, 2007). Microalgas possuem diversas vantagens no seu cultivo como: não competir por terra arável, eficiência fotossintética, alta produtividade, baixo custo na produção, quando realizada em sistemas abertos, entre outros. Além de serem renováveis, absorvem CO_2 da atmosfera, crescem em águas residuárias, dependendo do processo aplicado e podem dar origem a diferentes biocombustíveis. Inúmeros estudos em universidades, centros de pesquisa e instituições privadas estão sendo realizados para compreender metabolismos e vias sintéticas, fatores que influenciam na produção e melhoramento genético para potencializar a produtividade de espécies para seu cultivo (BOROWITZKA, 1999; AMARO; GUEDES; MALCATA,

2011). Além de bioálcool, biogás e biodiesel, principais formas de biocombustível produzidas, é possível obter outras formas (Figura 1).

Figura 1 - Fontes de energia via conversão de biomassa microalgal usando bioquímica, termoquímica, química e processo de combustão direta. **Fonte:** Tsukahara e Sawayama (2005) com adaptação de Wang (2008).

A partir do biocombustível de interesse são extraídos diferentes componentes da biomassa com capacidade bioenergética e convertidos por processos biológicos, mecânicos e termoquímicos. Carboidratos podem originar bioálcool, biomassa originar biogás e lipídeos, o biodiesel (DERMIBAS, 2001; TSUKARANA; SAWAYAMA, 2005).

O bioálcool é obtido a partir de carboidratos extraídos de microalgas que passam pelo processo de fermentação, consistindo de pré-tratamento para rompimento da parede celular, a partir de processos enzimáticos, mecânicos ou químicos; hidrólise enzimática ou química para formar carboidratos simples e fermentação através de leveduras levando à conversão de bioetanol (HARUN et al., 2010). Hirano et al. (1997) cultivaram *Chlorella vulgaris*, fotoautotroficamente, com 0,5% de CO₂ e luminosidade constante de 15000 lux e obtiveram produtividade 32 g.m⁻².d⁻¹ e 37% de carboidratos. No estudo realizado por Rodjaroen et al. (2007), visando alta produção de biomassa e acumulação de carboidratos, ao cultivar 3 cepas de *Chlorella* sp., sob 60 μmol.fótons.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo 12/12h, obteve de 21,5% a 27,0% de carboidratos. Entre as estratégias para induzir o acúmulo de carboidratos tem-se a limitação de nutrientes que Dragone et al. (2011) adotaram no cultivo de *Chlorella vulgaris*, em processo

fotoautotrófico, 2% de CO₂ e luminosidade de 70 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, obtendo o acúmulo de 41% de carboidratos na ausência de nitrogênio e 3,2% de carboidratos na presença de 36,6 μM de nitrogênio na forma de uréia. Buscando aumentar a eficiência na produção de carboidratos da *Chlorella vulgaris*, Brányiková et al. (2011) variaram a intensidade luminosa de 215 para 330 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e a concentração de carboidrato foi de 8,5% para 40%. Já, ao limitar sulfato no meio de cultivo a cepa elevou o rendimento de 18% para 50%. Deste modo, os estudos demonstram que as condições de cultivo como luminosidade e limitação de nutrientes influenciam diretamente no acúmulo de carboidratos que podem ser utilizados na produção de bioálcool.

O biogás é produzido a partir da digestão anaeróbia da biomassa microalgal, sendo o metano o principal gás de interesse e, além do dióxido de carbono dependendo da fonte utilizada, pode dar origem a outros gases, como sulfeto de hidrogênio que é corrosivo, prejudicando sistemas de combustão e quando liberado para atmosfera reage com água e precipita na forma de ácido sulfúrico desregulando o pH do solo e deteriorando construções. Para obtenção de metano é realizada a fermentação da biomassa que envolve a participação de diferentes micro-organismos em quatro processos: hidrólise, acidogênese, acetogênese/dehidrogenação e metanação (WEILAND, 2010). Cada processo é realizado em condições controladas de temperatura e pH que mantém as condições metabólicas adequadas, porém, nem todos os detalhes dos processos estão definidos e carecem de conhecimento (BAGI et al., 2007).

No trabalho realizado por Ras et al. (2011), *Chlorella vulgaris* foi cultivada e aplicada na produção de biogás a partir de digestão anaeróbia e Collet et al. (2011) utilizaram esse mesmo cultivo na avaliação do ciclo de vida na produção de metano. A produção apresentou potencial competitivo em relação a outras fontes de bioenergia e algumas características da biomassa e geração de metano obtidas são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Características da biomassa e potencial da digestão anaeróbica.

	Parâmetros	Valores
Características da Biomassa	gSSV/gSST	0,9
	gCOD/gSSV	1,429
	gCOT/gCOD	0,286
	gNKT/gCOT	0,167
Potencial da Digestão Anaeróbica	mLCH ₄ /gSSV	292
	%CH ₄ no biogás	70

Fonte: Adaptado de Collet et al. (2011)

O biodiesel tem sua produção realizada através de reações de craqueamento, esterificação ou transesterificação. Esta última é a mais utilizada e consiste na reação entre triglicerídeos, álcool, sendo o etanol o mais utilizado no Brasil devido ao seu baixo custo, e adição de catalisador, podendo ser utilizado ácido, base ou enzima, que dão origem ao alquil éster e, como subproduto, o glicerol (KNOTHE; SHARP; RYAN, 2006). Na classe de lipídeos, os triglicerídeos são a principal forma utilizada na produção do biodiesel e podem ser formados a partir de diferentes rotas. Entre as formas de ácidos graxos têm-se os saturados, monoinsaturados e poliinsaturados, os ácidos graxos saturados de cadeia (C14-C18) são o principal componente na produção de biodiesel (Huang et al., 2010). Como exemplo de ácidos de melhor qualidade, têm-se o ácido palmítico (C16:0) que melhora a estabilidade oxidativa e em uma menor emissão de NO_x e o ácido oleico (C18:1n9) que melhora a qualidade de ignição e no calor de combustão (YANG et al., 2016). Os ácidos graxos possuem aplicação em diferentes setores como na área de saúde e nutricional, por isso são largamente explorados (RADMANN; COSTA, 2008). A partir do grau de pureza dos lipídeos, o glicerol gerado poderá ter boa ou má qualidade. Quando a qualidade é boa facilita o processo de refinamento e utilização em setores industriais, como o farmacêutico, na composição de produtos cosméticos. Sua má qualidade implica em rejeito orgânico industrial que pode ser danoso ao ambiente. Em nível de pesquisa, a destinação que vem sendo realizada é a aplicação de glicerol como fonte de carbono no cultivo de microalgas em processos mixotróficos (IVANOVA et al., 1999; MORAIS et al., 2011; ESTÉVEZ-LANDAZÁBAL et al., 2013). Como no trabalho realizado por Ren et al. (2016) em que *Chlorella protothecoides* foi cultivada em diferentes vias, acumulando 5,9±0,4% de lipídeos ao consumir, como fonte de carbono, somente CO₂, 13,2±2,1% quando disponibilizado glicose e 10,3±1,2% ao ser disponibilizado as duas fontes de carbono.

Deste modo, o potencial de microalgas para aplicação na produção de biocombustíveis pode resultar em diferentes rendimentos dos compostos bioenergéticos e os fatores aplicados no cultivo possuem influência direta no desempenho alcançado.

3.5 Fatores relacionados ao cultivo

A produção de microalgas é determinada por vários fatores que influenciam diretamente sua produtividade e composição bioquímica. Entre os fatores determinantes estão a fonte de carbono, nutrientes, luminosidade, pH, agitação e aeração, temperatura e o sistema de cultivo utilizado.

3.5.1 Fonte de Carbono: processo fotoautotrófico

O carbono é o elemento fundamental nos processos metabólicos realizados por microalgas e sua disponibilidade resulta em diferentes processos tróficos. O processo fotoautotrófico pode ser otimizado pela injeção de CO₂ ao meio de cultivo no qual a microalga está inserida e sua aplicação tem origem a partir do ar atmosférico que representa cerca de 0,03% da composição total do ar, de resíduo gasoso industrial que possui diferentes concentrações ou cilindros pressurizados que apresentam até 99% de pureza (CARVALHO; MEIRELES; MALCATA, 2006; WANG et al., 2008).

O desempenho na assimilação de CO₂ e a otimização na fixação de carbono por microalgas, mostra-se peculiar a cada espécie e como tema de diversos estudos, nos quais é variada a concentração de carbono injetado e observa-se, que à medida que se aumenta a concentração de CO₂, diminui-se progressivamente a eficiência na produção de biomassa ou na fixação do carbono (Tabela 5).

Tabela 5 - Cultivo de *Chlorella* sobre diferentes concentrações de CO₂, produção de biomassa e CO₂ biofixado.

Microalga	CO ₂ (%)	B (g.L ⁻¹)	CO ₂ biofixado	Referência
<i>Chlorella</i> sp.	0,03	0,682±0,007	-	Chiu et al. (2008)
	2	1,445±0,015	58 ^a	
	5	0,899±0,003	27 ^a	
	10	0,106±0,001	20 ^a	
	15	0,099±0,001	16 ^a	
<i>Chlorella kessleri</i>	0,03	1,45±0,01	-	Morais; Costa (2007)
	6	0,98±0,01	-	
	12	0,80±0,01	-	
	18	0,88±0,01	-	
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	0,03	0,87±0,01	0,134±0,004 ^b	Tang et al. (2011)
	5	1,44±0,01	0,244±0,020 ^b	
	10	1,55±0,01	0,260±0,007 ^b	
	20	1,22±0,08	0,223±0,002 ^b	
	30	0,95±0,05	0,152±0,002 ^b	
	50	0,69±0,01	0,108±0,006 ^b	

Legenda: B – Biomassa, a – (%) e b – (g.L⁻¹.d⁻¹)

A adição de CO₂ é fundamental à produção de microalga, de modo que, quando pouco disponível, resulta em baixa taxa fotossintética, limitando o crescimento e, quando em maiores concentrações, acidifica o meio de cultivo podendo resultar na inibição do crescimento celular. Portanto, é necessário encontrar uma concentração de CO₂ adequada para proporcionar alta produtividade e não se tornar fator de inibição ao crescimento celular.

3.5.2 Nutrientes

A disponibilidade de nutrientes é essencial à realização de mecanismos sintéticos e sua concentração no meio pode induzir a microalga a diferentes comportamentos metabólicos (ILLMAN; SCRAGG; SHALES, 2000; DRAGONE et al. 2011; REN et al., 2016). Os nutrientes que devem estar em maior quantidade, denominados macronutrientes, são, além do carbono já abordado, o nitrogênio, fósforo, enxofre, cálcio, magnésio e potássio, todos na forma de sais que compõem o meio

aquoso no qual a microalga será cultivada. Micronutrientes, presentes em menor quantidade, como ferro, manganês e cobre são essenciais na realização de determinadas funções metabólicas e podem ser associados a agentes quelantes como EDTA que proporciona estabilidade a esses elementos implicando em uma maior disponibilidade.

O nitrogênio é disponibilizado na forma de nitrato (N-NO_3^-), nitrogênio amoniacal (N-NH_4^+) ou ureia ($\text{CO(NH}_2)_2$) e o fósforo na forma de hidrogenofosfato (HPO_4^{2-}) e são essenciais na síntese de proteínas (GROBBELAAR, 2000; GREENWELL et al., 2009).

Segundo estudo realizado por Redfield (1958), a relação molar entre carbono, nitrogênio e fósforo, também chamada de razão de Redfield, necessários ao fitoplâncton, é 106C:16N:P, sendo o fósforo o elemento limitante. Essa relação é uma média e possui variações a partir do micro-organismo de estudo, como no trabalho realizado por Geider e La Roche (2002) que, ao analisarem a composição elementar do fitoplâncton marinho, encontraram razão inferior a 5N:P quando o fósforo estava presente em excesso com relação ao nitrato ou amônio e, relação superior a 100N:P quando o nitrato estava em excesso com relação ao fósforo. Já na condição de equilíbrio entre nitrogênio e fósforo, a razão variou de 5 a 19N:P. As relações de N:P com carbono tendem a ser maior conforme a taxa de crescimento celular da microalga aumenta, enquanto que, N:P tendem a diminuir porque a assimilação dos nutrientes acontece em cadeia, de modo que, para fixar o carbono é necessário nitrogênio, constituído na forma de proteína e para produzi-la, faz-se necessário a disponibilidade de fósforo. As relações entre esses nutrientes variam, não somente pela concentração disponível, mas também, por outros fatores como temperatura e radiação luminosa (ÅGREN, 2004).

Deste modo, ao realizar a análise elementar dos nutrientes para o cultivo de microalga faz-se necessário atentar à relação estequiométrica entre N:P para não limitar o crescimento pela via fotoautotrófica.

3.5.3 Luminosidade

A luz que incide sobre o meio onde microalgas são cultivadas, aliada ao CO_2 , é fundamental para que possam crescer pela via fotoautotrófica e a disponibilidade de energia luminosa pode acontecer pela exposição à radiação solar ou artificial. Embora radiação solar seja gratuita como fonte de energia, está sujeita a variação de intensidade no decorrer do ano e disponibilidade durante o dia. Além disso, sua intensidade é maior em determinadas regiões do globo terrestre, como na faixa equatorial, sendo aplicada, principalmente, em sistemas abertos de cultivo.

No cultivo fotoautotrófico o adensamento da biomassa pode levar ao sombreamento da luz, impedindo que seja distribuída homogeneamente ao sistema, implicando na indisponibilidade de energia e, consequentemente, na diminuição do crescimento (HUANG et al., 2010).

Em sistemas fechados há a possibilidade de se controlar tanto a luminosidade quanto o fotoperíodo, podendo proporcionar maior produção fotossintética. Além disso, o controle desses fatores pode evitar fotoinibição devido à alta intensidade luminosa (Figura 2).

Figura 2 - Curva de crescimento e efeito de fotoinibição em função da intensidade luminosa. **Fonte:** Adaptado de Chisti (2007)

Deste modo, fotoperíodo e intensidade luminosa são dois fatores que influenciam no crescimento e na produção celular alcançada no cultivo. A produção de biomassa para *Chlorella* a partir da luminosidade e fotoperíodo aplicado é apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 - Produção de biomassa para *Chlorella* em função da luminosidade e do fotoperíodo.

Microalga	Luminosidade ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	Fotoperíodo claro/escuro (h)	Produção (g.L^{-1})	Referência
<i>Chlorella emersonii</i>	25	16/8	1,11	Illman; Scragg; Shales (2000)
<i>C. zofingiensis</i>	30	contínuo	1,9	Liu et al. (2011)
<i>Chlorella</i> sp.	60	12/12	0,1	Rodjaroen et al. (2007)
<i>C. protothecoides</i>	60	-	5,04	Ren et al. (2016)
<i>Chlorella</i> sp.	300	contínuo	1,44	Chiu et al. (2008)

Portanto, a radiação luminosa e o fotoperíodo adotado no sistema devem ser adequados para propiciar uma alta taxa fotossintética e evitar fotoinibição no processo de cultivo fotoautotrófico.

3.5.4 pH

O pH está relacionado à concentração de íons H^+ presente no meio aquoso e seu valor está relacionado diretamente com a forma e disponibilidade de componentes essenciais à manutenção das microalgas. No cultivo fotoautotrófico, CO_2 é o principal composto que influencia na mudança de pH, acidificando o meio de cultivo quanto maior a concentração e vazão aplicada e dissocia-se nas formas HCO_3^- e CO_3^{2-} , conforme aumento do pH, afetando diretamente a produção de microalgas (BECKER, 1994; LOURENÇO, 2006).

Microalgas crescem naturalmente em meio alcalino, havendo espécies capazes de crescer em pH ácido como a *Chlorella kessleri* que, ao ser cultivada em pH de 7,5 a 4,5 apresentou uma redução do pH interno de 1,43, influenciando a capacidade de assimilação de CO_2 e HCO_3^- e a atividade metabólica (EL-ANSARI; COLMAN, 2015).

A partir do trabalho de Tang et al. (2011) é possível observar a influência da adição de 0,03% para 50% de CO_2 no meio de cultivo que, de pH 8,7, decresceu para 5,2 e pode implicar diretamente na redução de atividade da enzima anidrase carbônica extracelular que catalisa a conversão entre HCO_3^- e CO_2 facilitando à assimilação de CO_2 . No estudo realizado por Malis-Arad et al. (1980), *Chlorella vulgaris* apresentou tendência a precipitar quando o pH do meio de cultivo atingiu valor superior a 9,5,

havendo, consequentemente, redução na produção de biomassa. Mayo e Noike (1994) avaliaram a produtividade de *Chlorella vulgaris* em diferentes valores de pH e identificaram diminuição na taxa de crescimento com a elevação do pH, sendo a velocidade específica de crescimento 2,03, 1,12 e 0,75 d⁻¹ em pH 7,0, 9,0 e 10,0, respectivamente.

Estudos com *Chlorella* visando produção de biomassa e acúmulo de lipídeos para produção de biodiesel tem sido realizados com pH inicial na faixa 7, podendo ser adicionado agentes tamponantes para manter o pH controlado, como exemplo TRIS (Tris Hidróximetil Amino Metano) (TANG et al., 2011; SANTOS, 2013).

3.5.5 Temperatura

A temperatura pode aumentar devido à radiação luminosa que incide sobre a superfície do meio de cultivo. Em sistemas abertos passa por variações sazonais e no período noturno tem leve redução, sendo que as maiores temperaturas se encontram, em função da disponibilidade de luz, na região equatorial da Terra.

A temperatura influencia a disponibilidade de compostos de acordo com a faixa em que se encontra, sendo que seu aumento leva à diminuição da solubilidade de CO₂ no meio aquoso (Tabela 7).

Tabela 7 - Variação da solubilidade de CO₂ com a temperatura.

Temperatura (°C)	CO ₂ (mg.L ⁻¹)
10	2,318
15	1,970
20	1,737
25	1,449
30	1,257

Fonte: Adaptado de Schoeller (1962)

Para nutrientes como CaCO₃, o aumento da temperatura também implica na diminuição da solubilidade, mas com outros sais pode levar ao aumento da disponibilidade, conforme observado na Tabela 8.

Tabela 8 - Solubilidade de sais (g.Kg⁻¹) com a temperatura.

Temperatura (°C)	NaCl	KCl	CaCl ₂	Na ₂ SO ₄	CaSO ₄	MgCl ₂	MgSO ₄
20°	264,4	255	427	160,2	2016	351	262
30°	265,5	272	501	291,0	2095	357	290

Fonte: Adaptado de Schoeller (1962)

Sistemas abertos de cultivo, como tanques, possuem pouca possibilidade de controle de temperatura e ficam sujeitos às condições do ambiente, já sistemas fechados podem ter a temperatura controlada e, portanto, potencializar o crescimento de microalga (SIERRA et al. 2008). Na literatura, o valor mais utilizado para cultivo de *Chlorella* é de 25°C ±2°C, havendo tolerância pela cepa para valores maiores que 35°C a partir do processo aplicado. Na Tabela 9 é apresentada a produção de biomassa para *Chlorella* em função da temperatura.

Tabela 9 - Produção e produtividade de *Chlorella* cultivada em sistema fechado e temperatura do sistema.

Microalga	Sistema	Temperatura (°C)	Produção (g.L ⁻¹)	Produtividade (g.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	Referência
<i>C. zofingiensis</i>	Fechado	25	10,63	-	Sun et al. (2008)
<i>C. pyrenoidosa</i>	Fechado	25	6,8	-	Kothari et al. (2012)
<i>C. vulgaris</i>	Fechado	30	4,83	-	Ma et al. (2014)
<i>C. sorokiniana</i>	Fechado	37	11,2	10,2	Zheng et al. (2013)

Deste modo, faz-se imprescindível a fixação de valor adequado da temperatura, bem como sua manutenção, de modo a proporcionar maior solubilidade de CO₂ e nutrientes ao processo fotoautotrófico.

3.5.6 Agitação e Aeração

A agitação e aeração têm por finalidade proporcionar distribuição de nutrientes, impedir estratificação térmica, recebimento de luz de forma homogênea pelas células, transferência de gases na interface ar-líquido e circulação de biomassa no sistema de cultivo, evitando sua sedimentação (GARCIA-OCHOA et al., 2010).

Em sistemas abertos, o processo de movimentação do cultivo acontece pela turbulência causada pelo movimento de pás giratórias que funcionam em baixa rotação, podendo haver aplicação de aeradores. Em sistemas fechados, normalmente, há injeção de gás no meio de cultivo e, nesse caso, é outro parâmetro que pode ser facilmente controlado através da vazão de entrada. A disponibilidade de CO₂ na atmosfera limita o crescimento da microalga e dessa maneira a utilização de sistemas fechados possibilita a suplementação de CO₂ ao meio de cultivo, aumentando a taxa metabólica em processos fotoautotróficos. A adição de gás deve ser adequada às dimensões do sistema, pois o fluxo de ar, quando insuficiente, leva a não suplementação das microalgas e quando muito intenso, pode prejudicar o crescimento celular devido ao estresse hidrodinâmico (GARCIA-OCHOA et al., 2010).

Ogbonna e Tanaka (1996) investigaram o comportamento bioquímico de *Chlorella pyrenoidosa* sob condições fotoautotróficas e trabalharam em meio enriquecido com 5% de CO₂ e 0,3 de vvm e, juntamente com outros parâmetros, observaram diminuição no teor de nutrientes em função da agitação.

Entre as formas de aeração há a possibilidade de injeção de biogás, utilizando-se fotobiorreatores adequados para sua purificação. Existe, inclusive, uma patente internacional, CN102392052 (A) – 2012, de fotobiorreator cilíndrico desenvolvido para essa finalidade, no qual microalgas podem ser cultivadas fotoautotroficamente sobre fluxo de biogás de 100-500 mL.min⁻¹ (MIYAWAKI, 2014).

Miyawaki (2014) utilizou biogás proveniente da biodigestão de efluente suíno como fonte de CO₂ e, ao aplicar o fluxo de 0,5% do gás no cultivo de *Scenedesmus disciformis*, obteve 2,0 g.L⁻¹ de biomassa seca. Com isso, observou que, além de suprir a necessidade por fonte de carbono pela microalga e promover sua movimentação, houve também purificação do gás levando-o a maior poder calorífico.

Portanto, estabelecer uma vazão adequada para as condições de cultivo aplicadas faz-se necessário para garantir homogeneização e circulação do CO₂, nutrientes, radiação luminosa, temperatura e biomassa no sistema.

3.5.7 Sistemas Abertos e Fechados de Cultivo

Microalgas podem ser cultivadas de diferentes maneiras sendo através de sistemas abertos (tanques), sistemas fechados (fotobiorreatores) ou mistura dos dois sistemas. Cada um desses sistemas possui características que lhes conferem vantagens e desvantagens e são aplicados de diferentes formas a partir das necessidades ou interesses no cultivo (BRENNAN; OWENDE, 2010).

Sistemas abertos são reservatórios naturais ou artificiais, tendo maior utilização os tanques de recirculação que podem possuir diferentes formatos, mas o mais utilizado é o de pista, também chamado *raceway*, no qual o comprimento varia amplamente e a profundidade varia entre 20 e 50 cm (BRENNAN; OWENDE, 2010). Suas principais vantagens são o menor custo na sua construção e manutenção e contar com fonte natural para fornecimento de energia luminosa. Contudo, está sujeito à contaminação por outros micro-organismos que podem competir pelos recursos, além da variação de luminosidade e temperatura.

Fotobiorreatores (FBRs) são sistemas fechados que possuem ampla variedade de formatos e são construídos com material transparente, como fibra de vidro e plásticos, que garantem distribuição de radiação luminosa para que microalgas realizem fotossíntese (CHISTI, 2007). A produção de biomassa nesse sistema, apesar de possuir maior custo de investimento e manutenção, apresenta mais vantagens principalmente sobre o controle do processo, possibilitando analisar individualmente cada fator relacionado ao cultivo (Tabela 10).

Tabela 10 - Comparação entre sistemas abertos e fechados para cultivo de microalgas em larga escala.

Fatores	Sistemas Fechados (FBRs)	Sistemas Abertos (Tanques)
Controle de contaminação	Fácil	Difícil
Risco de contaminação	Reduzido	Alto
Esterilidade	Possível	Nenhuma
Controle do processo	Fácil	Difícil
Regime de operação	Batelada ou semi-contínuo	Batelada ou semi-contínuo
Razão área/volume	Alta (20-200 m ⁻¹)	Baixa (5-10 m ⁻¹)
Densidade de células	Alta	Baixa
Investimento	Alto	Baixo
Custo operacional	Alto	Baixo
Eficiência na utilização de luz	Alto	Baixa
Controle de temperatura	Temperatura mais uniforme	Difícil
Produtividade	3-5 vezes mais produtivo	Baixa
Estresse hidrodinâmico na alga	Baixo-Alto	Muito baixo
Evaporação do meio de cultivo	Baixo	Alto
Controle na transferência de gás	Alto	Baixo
Perda de CO ₂	Dependo de pH, alcalinidade, etc.	FBRs ~ Tanques
Concentração de biomassa	3-5 vezes maior em (FBRs)	FBRs > Tanques

Fonte: Adaptado de Mata; Martins; Caetano (2010)

Existe grande variedade de fotobiorreatores e que apresentam diferentes eficiências no controle de parâmetros, podendo ser selecionados a partir de condições de interesse para o cultivo.

Em projetos realizados com culturas axênicas há necessidade de o sistema ser esterilizado e possuir baixo risco de contaminação. Além disso, monitoramento e controle da adição de CO₂ são pontos importantes para realização do cultivo. Desse modo, o uso do sistema fechado possui características mais adequadas para esses objetivos.

No cultivo fotoautotrófico a elevada razão de área-volume para penetração de luz e controle na transferência de gases é crucial para que a produção de biomassa seja satisfatória. Portanto, essa característica deve ser levada em consideração durante o dimensionamento de um fotobiorreator. As características dos principais fotobiorreatores mais utilizados são apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11 - Características e desempenho de fotobiorreatores para cultivo de microalgas.

Características	Fotobiorreator			
	Tubular em serpentina	“Air lift”	Placa plana	Bag plástica
Agitação	Uniforme	Geralmente uniforme	Uniforme	Variável
Eficiência na utilização de luz	Excelente	Boa	Excelente	Razoável-Boa
Controle de temperatura	Excelente	Excelente	Excelente	Boa
Transferência de gás	Baixa-Alta	Alta	Alta	Baixa-Alta
Stress hidrodinâmico nas algas	Baixa-Alta	Baixa	Baixa-Alta	Baixa
Controle de espécies	Fácil	Fácil	Fácil	Fácil
Esterilidade	Atingível	Fácil de atingir	Atingível	Fácil de Atingir

Fonte: Adaptado de Borowitzka (1999)

Dentre os fotobiorreatores, o placa plana e a *bag* possuem características adequadas para o cultivo fotoautotrófico e se destacam pela alta eficiência no controle e pelo baixo custo na implementação, respectivamente.

Fotobiorreatores placa plana são constituídos por placas finas que podem ser dispostas verticalmente, horizontalmente ou orientadas pela direção do sol, quando cultivados em ambiente aberto e possuem como principal característica maior área superficial para incidência luminosa, quando comparado aos demais tipos de fotobiorreatores, possibilitando maior captação de luz pela microalga e alta produtividade (Figura 3) (CARVALHO; MEIRELES; MALCATA, 2006).

Figura 3 - Esquema de fotobiorreator placa plana. **Fonte:** Adaptado de Sierra et al. (2008)

Cuaresma et al. (2009) cultivaram *Chlorella sorokiniana* em fotobiorreator placa plana sob radiação luminosa contínua de $2100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e obtiveram produtividade máxima de $12,2 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e Tuantet et al. (2014), também cultivando *Chlorella*

sorokiniana, obtiveram $14,8 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. No estudo realizado por Bosma et al. (2014), foram comparadas especificações em diferentes fotobiorreatores sob ambiente aberto e sujeito às condições climáticas, sendo notável a maior eficiência no caminho óptico, volume iluminado, taxa de iluminação superficial e expectativa de biomassa produzida para o fotobiorreator placa plana (Tabela 12).

Tabela 12 - Especificações de fotobiorreatores.

Especificações	Tanque <i>raceway</i>	Tubular horizontal	Tubular vertical empilhado	Placa plana
Caminho óptico (m)	0,20	0,046	0,046	0,02 ^a
Volume iluminado (%)	100	73	71	100
Taxa de iluminação superficial ($\text{m}^2.\text{m}^{-3}$)	5	63,7	61,6	100
Expectativa de biomassa ^b (g.L^{-1})	0,2-1	2-4	1-3	2-5

Legenda: a – valor médio b – expectativa. **Fonte:** Adaptado de Bosma et al (2014)

Fotobiorreator *bag* tem se destacado na produção de biomassa, pois consiste na utilização de sacos de polietileno, polipropileno, entre outros, que, devido à maleabilidade do material, possibilitam grande variedade em sua conformação, além de possuir baixo custo (EIBL et al., 2010, LEHR; POSTEN, 2009). Podem ser expostas à iluminação artificial ou natural, como realizado no trabalho de Moheimani (2013) que cultivou *Chlorella* sp. e *Tetraselmis suecica* no período de 11 meses e apresentaram produtividade de $0,14 \pm 0,08$ e $0,11 \pm 0,09 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, respectivamente. Yan e Zheng (2013) avaliaram o crescimento *Chlorella* sp. sob adição de biogás contendo $26,14 \pm 2,57\%$ de CO_2 e diferentes intensidades luminosas. A produção alcançada foi de $0,554 \pm 0,027$, $0,616 \pm 0,033$ e $0,437 \pm 0,025 \text{ g.L}^{-1}$ em cultivo realizado com intensidade luminosa de 300, 350 e $400 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente.

Yan et al. (2016) cultivaram *Chlorella* sp. em diferentes comprimentos de onda através de LED (light emitting diode), sob adição de $31,02 \pm 4,21\%$ de CO_2 , $1000 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e obtiveram a seguinte produção: $0,330 \pm 0,021 \text{ g.L}^{-1}$ para luz vermelha, $0,302 \pm 0,028 \text{ g.L}^{-1}$ para luz branca, $0,286 \pm 0,025 \text{ g.L}^{-1}$ para luz amarela e $0,236 \pm 0,024 \text{ g.L}^{-1}$ para luz azul.

Algumas disposições utilizadas em cultivos são apresentadas na Figura 4.

Figura 4 - Fotobiorreatores *bag* em diferentes disposições. **Fonte:** Retirado de a) Lehr e Posten (2009), b) Phytoplankton Culture for Aquaculture Feed, c) POWER: NMSU explores algal biofuel production from wastewater e d) Algal Cell Culture Media.

Através dos estudos apresentados, cepas de *Chlorella* apresentam diferentes rendimentos de biomassa, lipídeos e outros compostos em consequência das condições de cultivo, podendo ser limitadas, principalmente, em função da disponibilidade de CO_2 , nutrientes e radiação luminosa. De modo que, faz-se necessário avaliar o perfil de crescimento, metabolismo e explorar parâmetros que potencializem a fixação de CO_2 , a partir do processo fotoautotrófico e maximizem a produção de biomassa com vistas à produção de biocombustíveis.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A seguir é apresentado fluxograma experimental para melhor visualização das etapas desta pesquisa.

4.1 Fluxograma Experimental

Figura 5 - 1ª Etapa com as principais atividades a serem realizadas.

2ª ETAPA

Figura 6 - 2ª Etapa com as principais atividades a serem realizadas.

4.2 Local da pesquisa

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Biotoxicologia em Águas Continentais e Efluentes - (BIOTACE) no Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos - USP (SHS/EESC/USP).

4.3 Microalga

A microalga utilizada na pesquisa foi a clorofícea *Chlorella* sp. obtida por Santos (2013) de amostras coletadas de diferentes locais em ambientes de água doce. As cepas selecionadas, DAM04, VIN01 e C203, foram mantidas axênicamente em meio de cultivo BG-11 (pH 8,0 tamponado com 250 mg.L⁻¹ de TRIS) em sala climatizada de cultivo à 24°C, 60 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fotoperíodo 12h claro/escuro no banco de microalgas e cianobactérias do BIOTACE.

4.4 1ª ETAPA

4.4.1 Seleção de meio de cultivo rico em nutrientes

Foram selecionados os meios de cultivo W.C, M-8 e BG-11 (Tabela 13), utilizados no cultivo de *Chlorella* e comparadas suas composições químicas a partir da relação N:P, com vistas aos nutrientes não se tornarem fator limitante ao crescimento celular (CUARESMA et al., 2009; BHATNAGAR et al., 2010; BONINI; BASTO, 2013).

Tabela 13 - Composição química dos meios de cultivo W.C, M-8 e BG-11.

W.C ¹			M-8 ²			BG-11		
Reagentes	(mg.L ⁻¹)	(mM)	Reagentes	(mg.L ⁻¹)	(mM)	Reagentes	(mg.L ⁻¹)	(mM)
NaNO ₃	850	N=10	KNO ₃	3000	N=30,0	NaNO ₃	1500	N=17,6
Na ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	126	P=0,71	KH ₂ PO ₄	740	P=5,4	K ₂ HPO ₄	40	P=0,23
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	114	P=0,65	Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	260	P=1,5	MgSO ₄ .7H ₂ O	75	Mg=0,30
CaCl ₂ .2H ₂ O	368	Ca=2,5	MgSO ₄ .7H ₂ O	400	Mg=1,6	CaCl ₂ .2H ₂ O	36	Ca=0,24
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	Mg=1,50	CaCl ₂ .2H ₂ O	13	Ca=0,09	C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O ³	36	0,17
Na ₂ SiO ₃ .5H ₂ O	212	Si=1,00	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,22	0,2	C ₆ H ₈ O ₇ .Fe ³⁺ + yNH ₃ ⁴	6	Fe=0,02
Na ₂ EDTA	4,36	0,01	EDTA-Fe	110	0,3	EDTA	10	0,03
FeCl ₃ .H ₂ O	3,15	Fe=0,02	MnCl ₂ .4H ₂ O	13,85	Mn=0,07	H ₃ BO ₃	2,86	B=0,05
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01	Cu=4.10 ⁻⁵	ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,88	Zn=0,01	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81	Mn=0,009
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,022	Zn=8.10 ⁻⁵	CuSO ₄ .5H ₂ O	1,75	Cu=0,007	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22	Zn=8.10 ⁻⁴
CoCl ₂ .H ₂ O	0,01	Co=0,7.10 ⁻⁴	H ₃ BO ₃	0,06	B=0,001	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,39	Mo=16.10 ⁻⁴
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,18	Mn=9,1.10 ⁻⁴				CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08	Cu=3.10 ⁻⁴
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,006	Mo=2.10 ⁻⁴				Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,05	Co=2.10 ⁻⁴
H ₃ BO ₃	1	0,016				CoCl ₂ .6H ₂ O (?)	0,04	Co=2.10 ⁻⁴
Tiamina HCl	0,1	37,7.10 ⁻⁵						
Biotina	0,0005	0,2.10 ⁻⁵						

¹Meio de cultivo W.C., modificado de Guillard; Lorenzen (1972); ²Meio de cultivo M-8 modificado por Cuaresma et al. (2009); ³Ácido cítrico e ⁴Citrato de Amônio Férrico.

4.4.2 Determinação de CO₂ para enriquecimento do cultivo

Analizou-se o comportamento dos meios de cultivo com a adição de CO₂ nas faixas de 2 e 5%, através da determinação de pH, adotando-se vvm 0,2 e vazão de gás de 1L.s⁻¹ para estabelecer a concentração adequada e não acidificar em excesso o meio de cultivo.

4.4.3 Determinação das condições de cultivo e monitoramento

As cepas foram mantidas axênicas até a inoculação no meio de cultivo ajustado para pH 7,2. O processo foi realizado em batelada e adotou-se fotoperíodo de 12h claro/escuro, temperatura de 24 °C e radiação luminosa de 200 μmol.fótons.m⁻².s⁻¹. Essas condições foram adotadas a partir de revisão bibliográfica que apresentam esses valores como adequados ao cultivo de *Chlorella*.

No cultivo realizado no fotobiorreator *bag*, o monitoramento e as coletas foram realizadas de 12/12h até o 5º dia de cultivo para obter-se um perfil dos parâmetros analisados adequadamente durante a fase exponencial do crescimento, e posteriormente de 24/24h, igualmente ao cultivo no fotobiorreator placa plana, sendo as coletas realizadas no período claro.

Para as análises bioquímicas foram realizados dois pontos de coleta, chamadas de final da fase exponencial e estacionária. Essa estratégia foi adotada a fim de compreender se houve mudança no teor dos compostos caracterizados no intervalo adotado.

4.4.4 Cultivo de 3 cepas de *Chlorella* sp. em fotobiorreator *bag*

Os fotobiorreatores *bag* utilizados tiveram como material polietileno de baixa densidade e apresentam largura de 35 cm e altura de 74 cm.

A injeção de CO₂ foi realizada continuamente através de mistura com ar atmosférico e controlada por meio de fluxômetros (Cole-Parmer). Para remover impurezas do ar e manter o

sistema de cultivo estéril a mistura de gases passou por filtro de ar de 0,2 μm (Midisart 2000 Sartorius Stedim) implantados na entrada de ar dos fotobiorreatores (Figura 7).

Figura 7 - Esquema de funcionamento do fotobiorreator *bag* alimentado com ar e CO_2 .

Os fotobiorreatores *bag* foram montados e dispostos paralelamente, uns aos outros, a partir das condições de cultivo definidas e a configuração obtida é apresentada (Figura 8).

Figura 8 - Configuração dos fotobiorreatores *bag*, da esquerda à direita, os 3 primeiros referem-se ao cultivo controle e os outros 3 referem-se ao cultivo enriquecido com 5% de CO_2 , sendo (a) após inoculação e (b) no 10º dia.

Os fotobiorreatores foram desinfetados aplicando-se hipoclorito de sódio com teor de cloro ativo entre 2,0 a 2,5% p/p e posteriormente adicionando-se tiosulfato de sódio para neutralizar a ação do cloro (Andersen, 2005). Após desinfecção, o meio de cultivo foi

adicionado e, em seguida, as cepas foram inoculadas a 10% ($V_{\text{inóculo}}/V_{\text{meio}}$), as *bags* foram montadas em triplicatas para o cultivo enriquecido com CO₂ e cultivo controle e dispostas paralelamente às lâmpadas tubulares de 20 W (Osram).

Deste modo, deu-se início ao monitoramento e foram realizadas coletas de biomassa no 10° e 16° dia no cultivo enriquecido com CO₂ e 13° e 19° dia no cultivo controle (contendo apenas ar atmosférico). As amostras foram centrifugadas a 4 °C e 5000 rpm por 5 minutos em centrífuga 5804R (Eppendorf), secas em estufa (NovaÉtica) e armazenadas a -20 °C. As coletas foram realizadas em dois pontos (chamadas de fim da fase exponencial e estacionária) para avaliar se a colheita em diferentes fases de cultivo modifica a composição bioquímica da biomassa.

4.4.5 Seleção da cepa com maior produtividade para 2ª ETAPA

A partir da produtividade de biomassa alcançada pelas cepas e análise dos parâmetros cinéticos, selecionou-se a cepa com maior potencial de crescimento para ser cultivada no fotobiorreator placa plana.

4.5 2ª ETAPA

4.5.1 Dimensionamento de fotobiorreator placa plana

O fotobiorreator placa plana foi selecionado e dimensionado para atender às características necessárias para o cultivo de *Chlorella* sp., selecionada na 1ª ETAPA, com vistas ao processo fotoautotrófico melhorado considerando eficiência na disponibilidade de luz e dissolução de CO₂ no meio de cultivo.

Dimensionou-se um fotobiorreator placa plana com 45 cm de altura, 30 cm de largura de base e 2 cm de espessura, com volume total de operação de 2,7 L. O sistema possui entrada para gás e meio de cultivo, difusor de gás, saída para amostragem e abertura para instalação

de sensores. Contudo, ao ser confeccionado, devido a limitações técnicas, o fotobiorreator resultou em volume total de operação de 3,6 L, sendo a espessura de 2,6 cm (Figura 9).

Figura 9 - Esquema de fotobiorreator placa plana dimensionado para cultivo de microalgas. **Legenda:** 1 – Parafuso borboleta; 2 – Abertura para sensores; 3 – Saída de gás; 4 – Tampa removível; 5 – Entrada de gás; 6 – Entrada de Meio de Cultura; 7 – Placa de vidro temperado; 8 – Parede de aço inox; 9 – Suporte; 10 – Coletor de amostra; 11 – Bocal difusor.

Conforme Bosma et al. (2014), o fotobiorreator placa plana pode oferecer 100 m^{-1} relação área superficial-volume. As dimensões adotadas apresentaram a relação:

$$\frac{\text{Área}}{\text{Volume}} = \frac{0,45 \text{ m} \times 0,30 \text{ m}}{0,45 \text{ m} \times 0,30 \text{ m} \times 0,026 \text{ m}} = 38,5 \text{ m}^{-1}$$

Este cálculo é baseado quando o fator iluminação é aplicado somente em um lado do sistema. Portanto, foi aplicada iluminação nos dois lados do fotobiorreator atingindo relação de 77 m^{-1} .

O fotobiorreator placa plana foi disposto de modo a receber a radiação luminosa em ambas as paredes e a configuração obtida é apresentada na Figura 10.

Figura 10 - Configuração do fotobiorreator placa plana para o cultivo da cepa DAM04 no (a) 1º dia e (b) 5º dia de cultivo enriquecido com 5% de CO₂.

4.5.2 Cultivo da cepa de *Chlorella* sp. mais produtiva, selecionada na 1ª ETAPA, em fotobiorreator placa plana

O fotobiorreator placa plana foi esterilizado em autoclave vertical CS (Prismatex Autoclaves) a 121 °C, 1 atm, 15 minutos e, após temperatura ambiente, foi disposto equidistante de lâmpadas espirais de 90 W (Taschibra). Após adição do meio de cultivo, a cepa de *Chlorella* foi inoculada e monitorada. Nas mesmas condições que para o fotobiorreator *bag*. As amostras foram coletadas, centrifugadas, secas e armazenadas no 8º e 14º dia no cultivo enriquecido e 14º dia no cultivo controle, para posterior caracterização bioquímica. O cultivo controle teve somente um ponto de coleta para que não houvesse influência no volume do meio de cultivo.

4.5.3 Comparação do potencial bioenergético apresentado pela cepa entre fotobiorreator *bag* e placa plana

Produção e produtividade de biomassa e o seu perfil bioquímico (lipídeos, carboidratos e proteínas) foram comparados entre o cultivo realizado no fotobiorreator *bag* e placa plana foram comparados com relação ao rendimento.

4.5.4 Avaliação da assimilação de nutrientes e biofixação de carbono pelas cepas

Foram realizadas análises de carbono orgânico total, carbono inorgânico, nitrogênio total Kjeldahl e fósforo total, seguindo método APHA (2005) para se determinar a quantidade de nutrientes assimilada e a biofixação de CO₂ pelas cepas. Os métodos para determinação de nitrogênio e fósforo disponíveis no meio não foram adotados, pois o método a partir do nitrato e ortofosfato (APHA, 2005) mostrou-se impreciso devido à alta concentração dos nutrientes no meio de cultivo, tornando-se inviável sua utilização.

4.5.5 Determinação da produção de biomassa e do perfil bioquímico

O delineamento do perfil de crescimento celular foi determinado por sólidos suspensos totais (APHA, 2005) para estimar biomassa e clorofila *a*, seguindo método de Nush (1980) modificado de Nederlandse Norm (1981). A partir do perfil de crescimento, foram calculados parâmetros cinéticos de produtividade, velocidade específica de crescimento e tempo de geração.

Na análise bioquímica foram determinados carboidratos por método com fenol e ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), lipídeos por extração clorofórmio:metanol (FOLCH, LEES e STANLEY, 1957), proteínas por método NTK (APHA, 2005) usando fator de conversão 6,25 estabelecido por Readfield (1958) e cinzas por sólidos suspensos inorgânicos (APHA, 2005).

Os lipídeos após serem determinados foram armazenados sob refrigeração para posterior caracterização dos ácidos graxos. As análises foram realizadas no Laboratório de Cromatografia do Departamento de Química da UFMG, em um cromatógrafo a gás HP7820A equipado com detector por ionização de chamas. Utilizou-se uma coluna SP-2560 (Supelco) 25 m x 0,25 mm x 0,20 μ com gradiente de temperatura: 60 °C, 0 min, 7 °C.min⁻¹ até 220 °C; injetor (split de 1/30) a 250 °C e detector a 260 °C. Hidrogênio como gás de arraste (2 ml.min⁻¹) e volume de injeção de 2 μ L. A identificação dos picos foi feita por comparação com padrões de ácidos graxos metilados FAME MIX C14-C22 (Supelco cat. no. 18917), cálculo de equivalente de tamanho de cadeia [ECN-equivalent chain lengths, segundo Christie (1988) e dados espectrais obtidos por CG-EM.

Foram também monitoradas as variáveis pH e oxigênio dissolvido para verificar sua relação com o crescimento celular.

4.5.6 Análises físicas e bioquímicas realizadas

Os métodos e equipamentos utilizados para cada análise é apresentado na Tabela 14.

Tabela 14 - Análises, métodos e equipamentos utilizados.

Análise	Método	Equipamento Modelo/Marca	Referência
SST, SSI e SSO	2540 D. e 2540 E. Gravimétrico	Forno mufla microprocessado (Quimis)	APHA (2005)
Clorofila <i>a</i>	Colorimétrico	Espectofotometro DR/4000V (HACH)	Nush (1980)*
Proteínas	4500 N C. Digestão e 4500 Norg.	AutoKjeldahl unit K-370 (BÜCCHI)	APHA (2005)
Carboidratos totais	Colorimétrico	Espectofotometro DR/4000V (HACH)	Dubois et al. (1956)
Lipídios	Gravimétrico	Estufa (NovaÉtica)	Folch, Lees e Stanley (1957)
CT, COT e CI	5310 B. Combustão	COT TOC-V cph (Shimadzu)	APHA (2005)
Fósforo	4500 P E. Espectrométrico	Espectofotometro DR/4000V (HACH)	APHA (2005)
pH	Potenciométrico	pHmetro TEC-2 mp (TECNAL)	
OD	Potenciométrico	Oxímetro DM-4 (Digimed)	
Temperatura (C)	Termo-resistivo	Termometro (BIOTEMP)	

SST: Sólidos Suspensos Totais; SSI: Sólidos Suspensos Inorgânicos; SSO: Sólidos Suspensos Orgânicos; CT: Carbono Total; COT: Carbono Orgânico Total; CI: Carbono Inorgânico; OD: Oxigênio Dissolvido.

*(NUSH, 1980 modificado de NEDERLANDSE NORM, 1981)

4.6 Cálculo dos parâmetros de produtividade e biofixação de CO₂

Para determinação da produtividade, velocidade específica de crescimento, tempo de geração celular e biofixação de CO₂ foram aplicadas as seguintes equações:

Produtividade de biomassa P (g.L⁻¹.d⁻¹):

$$P = \frac{X_t - X_0}{t - t_0}$$

Em que: X_t representa biomassa determinada no dia (t) e X₀ biomassa determinada no dia 0 (t₀).

Velocidade específica de crescimento específico μ (d⁻¹):

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{X}{X_0}\right)}{t - t_0}$$

Tempo de geração T_g (d):

$$T_g = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Taxa de CO₂ biofixado (g.L⁻¹.d⁻¹):

$$Taxa\ de\ CO_{2\ biofixado} = C.P.\left(\frac{m_{CO_2}}{m_C}\right)$$

Em que: C representa a fração de massa do carbono pela biomassa (g.g⁻¹), P a produtividade microalgal (g.L⁻¹.d⁻¹) e m_{CO₂} e m_C a massa molar de CO₂ e carbono, respectivamente (ADAMCZYK; LASEK; SKAWINSKA, 2016).

Biofixação de CO_2 (g.L^{-1}):

$$\text{Biofixação de } \text{CO}_2 = C.B. \left(\frac{m_{\text{CO}}}{m_c} \right)$$

Em que B representa a produção de biomassa (g.L^{-1})

Os resultados obtidos pelos parâmetros analisados no fotobiorreator *bag* e placa plana foram usados para determinação e comparação da produtividade de biomassa, lipídeos e carboidratos da cepa.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 1ª ETAPA

5.1.1 Seleção de meio de cultivo rico em nutrientes

O meio de cultivo W.C apresentou maior quantidade de reagentes necessários à sua composição incluindo vitaminas, seguido do meio de cultivo BG-11, no qual entre os reagentes inclui-se ácido cítrico e citrato de amônio. O meio de cultivo M-8 apresentou os principais macronutrientes e micronutrientes essenciais às atividades metabólicas de microalgas e contendo maior concentração de nutrientes com relação aos meios W.C e BG-11, apresentando concentração de nitrogênio 3 vezes maior que o meio W.C e 1,7 vezes maior que o meio BG-11 e concentração de fósforo 5 vezes maior que o meio W.C e 30 vezes maior que o meio BG-11.

A relação estequiométrica entre os macronutrientes N:P implicou em 7N:P para o meio de cultivo W.C, 4N:P para o meio M-8 e 76N:P para o meio BG-11. Comparado a razão estabelecida por Redfield (1958) para a concentração de nitrogênio e fósforo, o meio W.C

apresentou concentração de nitrogênio 5 vezes maior e o meio BG-11 e M-8 apresentaram concentração de fósforo 2 e 4 vezes maior, respectivamente.

A concentração de fósforo em excesso com relação ao nitrogênio é um fator presente em meios de cultivo, pois, além de reagir com elementos como ferro e cálcio e ter sua disponibilidade reduzida, sua limitação impossibilita sínteses proteicas e atividades metabólicas (YUN et al., 1997).

Deste modo, considerando o excesso de fósforo com relação ao nitrogênio, os meios de cultivo M-8 e BG-11 foram selecionados para análise do comportamento à adição de 2 e 5% de CO₂ e crescimento das cepas de *Chlorella* sp.

5.1.2 Determinação da concentração de CO₂ para adição no meio de cultivo

Determinou-se o perfil do pH nos meios de cultivo M-8 e BG-11 sob adição de 2 e 5% de CO₂ (Figura 11).

Figura 11 - Variação de pH no meio de cultivo (a) M-8 e (b) BG-11 sob adição de 2 e 5% de CO₂.

A adição de CO₂ foi realizada até a estabilização do pH. O meio de cultivo M-8, sob adição de 2% de CO₂, teve início em pH 7,19 e apresentou saturação com pH 7,00 e, sob adição de 5% de CO₂, iniciou em pH 7,21 e saturou em pH 6,82. O meio de cultivo BG-11, sob adição de 2% de CO₂, iniciou em pH 7,24 e saturou em pH 7,03 e, sob 5% de CO₂, iniciou em pH 7,26 e saturou em pH 6,71.

Os resultados demonstram que o meio M-8 apresentou maior resistência à acidificação decorrente da formação de ácido carbônico. Essa característica permitiu que fosse selecionada a utilização de 5% de CO₂, com o intuito de suplementar o meio, mas não causar prejuízo à produção de biomassa.

Deste modo, a partir das características apresentadas na composição, relação N:P e comportamento à adição de CO₂, o meio de cultivo M-8 foi selecionado para ser utilizado sob adição de 5% de CO₂.

5.1.3 Assimilação de nutrientes e biofixação de CO₂

A disponibilidade de CO₂, limitada à concentração atmosférica de aproximadamente 0,03% no sistema controle, implicou na menor capacidade em assimilação de nitrogênio e fósforo quando comparada ao sistema enriquecido com 5% de CO₂ e, entre o primeiro e o último ponto de coleta, a concentração de nutrientes dobrou em todas as cepas (Tabela 15).

Tabela 15 - Assimilação de carbono, nitrogênio e fósforo pelas cepas DAM04, C203 e VIN01.

		DAM04			C203			VIN01		
Condição	Dia	C (mM)	N (mM)	P (mM)	C (mM)	N (mM)	P (mM)	C (mM)	N (mM)	P (mM)
Controle	13	7,06±1,17	1,20±0,13	0,5*	5,12±0,40	0,89±0,09	0,37±0,08	5,79±1,99	1,15±0,03	0,37±0,08
	19	12,05±1,10	1,73±0,22	0,74±0,07	7,66±1,50	1,35±0,24	0,43±0,07	11,92±3,64	1,84±0,64	0,55±0,13
CO ₂	10	29,29±3,41	4,80±0,78	0,57±0,07	23,99±2,35	4,93±0,61	0,61±0,1	30,41±1,71	4,66±0,49	0,50±0,03
	16	70,57±8,81	11,26±1,24	1,11±0,01	51,00±2,64	9,37±0,84	1,28±0,16	62,43±1,80	9,88±0,71	1,03±0,07

*não foi realizada triplicata

A cepa DAM04 apresentou a maior assimilação de nutrientes com razão 64C:10N:P, representando um consumo de 37,5% do N (157,61±17,39 de 420,00 mg.L⁻¹) e 16,1% do P (34,42±3,96 de 213,90 mg.L⁻¹) presente no meio de cultivo M-8. A cepa VIN01 assimilou 32,9% do N (138,37±10,00 de 420,00 mg.L⁻¹) e 18,5% do P (39,49±5,08 de 213,90 mg.L⁻¹) com razão 62C:10N:P e a cepa C203 apresentou razão 40C:7N:P, assimilando 31,2% (131,24±11,70 de 420,00 mg.L⁻¹) e 15,0% (32,00±2,13 de 213,90 mg.L⁻¹) do nitrogênio e fósforo, respectivamente.

A razão N:P presente na biomassa celular pode variar dependendo da cepa cultivada e do elemento em excesso. O meio M-8 possui 4N:P, apresentando maior concentração de

fósforo com relação ao nitrogênio. No trabalho realizado por Geider e La Roche (2002), o excesso de P implicou em uma razão máxima de 5N:P na biomassa celular. Contudo, neste estudo, as cepas apresentaram razão de 7 e 10N:P.

O meio de cultivo foi selecionado tendo como objetivo a não limitação da produção de biomassa decorrente da escassez de nitrogênio e fósforo. Portanto, ao serem analisados os percentuais de assimilação, os nutrientes não foram fator limitante.

As cepas apresentaram acúmulo na biofixação do carbono disponível no sistema, além de o potencial na taxa de assimilação e no acúmulo total de CO₂ ter sido superior no cultivo enriquecido (Tabela 16).

Tabela 16 - Taxa de biofixação de CO₂ pelas cepas DAM04, C203 e VIN01.

		DAM04	C203	VIN01
Condição	Dia	Taxa de CO ₂ biofixado (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)		
Controle	13	0,022±0,008	0,016±0,001	0,017±0,003
	19	0,027±0,005	0,017±0,003	0,026±0,011
CO ₂	10	0,128±0,068	0,104±0,014	0,130±0,007
	16	0,193±0,019	0,140±0,025	0,170±0,004

A cepa DAM04 apresentou maior assimilação de CO₂ seguida da cepa VIN01. A disponibilidade dos 5% de CO₂ possibilitou assimilação 8 vezes maior (0,123 g.L⁻¹.d⁻¹) de carbono pelas cepas. Contudo, outros trabalhos revelam maior capacidade de biofixação por cepas de *Chlorella*. Tang et al. (2011) ao cultivarem *Chlorella pyrenoidosa* sob adição de 10% de CO₂ obtiveram taxa de biofixação de 0,260±0,007 g.L⁻¹.d⁻¹ e sob 0,03% de CO₂ obtiveram 0,134±0,004 g.L⁻¹.d⁻¹. Adamczyk; Lasek; Skawinska (2016) ao cultivarem *Chlorella vulgaris* em meio enriquecido com 4% de CO₂ alcançaram 0,71 g.L⁻¹.d⁻¹ na biofixação de CO₂. Embora as cepas tenham apresentado taxa de biofixação inferior a outros resultados da literatura, o acúmulo final na biofixação de carbono em função da produção de biomassa alcançada mostrou-se equivalente ou maior (Tabela 17).

Tabela 17 - Biofixação de CO₂ pelas cepas DAM04, C203, VIN01 e outras cepas.

Cepa	Condição	Biofixado CO ₂ (g.L ⁻¹)	Referência
DAM04	Controle	0,53±0,10	o autor
DAM04	CO ₂	3,10±0,32	o autor
C203	Controle	0,33±0,06	o autor
C203	CO ₂	2,25±0,41	o autor
VIN01	Controle	0,52±0,22	o autor
VIN01	CO ₂	2,75±0,07	o autor
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	0,03%	1,64±0,00	Tang et al. (2011)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	5%	2,66±0,00	Tang et al. (2011)
<i>Chlorella vulgaris</i>	4%	2,89±0,03	Adamczyk; Lasek; Skawinska (2016)
<i>Chlorella vulgaris</i>	8%	3,06±0,04	Adamczyk; Lasek; Skawinska (2016)
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,03%	2,46	Yun et al. (1997)
<i>Chlorella vulgaris</i>	5%	3,20	Yun et al. (1997)

A cepa DAM04 apresentou maior biofixação de CO₂ com relação às outras cepas e, a partir do enriquecimento, acumulou 5,8 vezes mais carbono com relação ao controle. As cepas C203 e VIN01 acumularam 6,8 e 5,3 vezes mais carbono com relação ao controle, respectivamente. Com relação aos valores apresentados por Tang et al. (2011) e Yun et al. (1997), as cepas apresentaram menor biofixação de carbono no cultivo controle, mas, sob cultivo enriquecido com 5% de CO₂ apresentaram biofixação equivalente.

Observou-se potencial das cepas para cultivo em sistemas enriquecidos com 5% de CO₂ e, a partir da cinética de crescimento e outros parâmetros, foi possível avaliar se o CO₂ causou inibição ou limitação à produtividade das cepas.

5.1.4 Produção de biomassa e cinética de crescimento

O enriquecimento com 5% de CO₂ do meio de cultivo, com coleta realizada no 10º e 16º dia, proporcionou maior produção de biomassa às 3 cepas, sendo 4 vezes maior em relação ao controle, coleta realizada no 13º e 19º dia (Figura 12).

Figura 12 - Perfil de crescimento das cepas de *Chlorella* (a) DAM04, (b) C203 e (c) VIN01.

Todas as cepas apresentaram aumento da produção de biomassa após o início da fase estacionária, sendo mais expressiva no cultivo enriquecido com 5% de CO₂.

Entre os pontos de coleta, a cepa DAM04 apresentou aumento de 2,4 vezes (de $0,940 \pm 0,156$ para $2,220 \pm 0,212 \text{ g.L}^{-1}$) da biomassa no cultivo enriquecido e de 1,4 vezes (de $0,387 \pm 0,029$ para $0,527 \pm 0,074 \text{ g.L}^{-1}$) no cultivo controle. Já a produção total de biomassa foi 4,2 vezes superior ($1,69 \pm 0,14 \text{ g.L}^{-1}$) no cultivo enriquecido com relação ao controle. A cepa VIN01 apresentou aumento de 2,1 vezes (de $0,927 \pm 0,055$ para $1,942 \pm 0,080 \text{ g.L}^{-1}$) da biomassa no cultivo enriquecido e de 1,6 vezes (de $0,283 \pm 0,061$ para $0,466 \pm 0,095 \text{ g.L}^{-1}$) no cultivo controle, alcançando produção total de biomassa 4,4 vezes ($1,48 \pm 0,03 \text{ g.L}^{-1}$) maior que o controle. O cultivo enriquecido da C203 resultou no aumento da biomassa em 2,0 vezes (de $0,745 \pm 0,084$ para $1,523 \pm 0,142 \text{ g.L}^{-1}$), enquanto no cultivo controle em 1,5 vezes (de $0,244 \pm 0,020$ para $0,358 \pm 0,073 \text{ g.L}^{-1}$), entre os pontos da fase estacionária. Além de 4,2 vezes ($1,16 \pm 0,05 \text{ g.L}^{-1}$) mais biomassa total quando enriquecida com CO_2 com relação ao controle.

A produção de clorofila *a* foi maior no cultivo enriquecido com relação ao controle, sendo 11,5 vezes maior para a cepa C203 seguida das cepas DAM04 e VIN01, com aumento de 8,6 e 5,4 vezes, respectivamente. Ao se relacionar a massa de clorofila *a* com a produção de biomassa, a cepa C203 apresentou 4,3% para o cultivo enriquecido e 1,6% para o cultivo controle, a DAM04 apresentou 2,8% e 1,4% e a VIN01 2,2% e 1,7% para o cultivo enriquecido e controle, respectivamente.

A produção final de biomassa e os parâmetros de crescimento são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 - Produção final de biomassa e parâmetros de crescimento para as cepas DAM04, C203 e VIN01.

Dia	DAM04		C203		VIN01	
	Controle	CO_2	Controle	CO_2	Controle	CO_2
	19	16	19	16	19	16
B (g.L^{-1})	$0,53 \pm 0,07$	$2,22 \pm 0,21$	$0,36 \pm 0,07$	$1,52 \pm 0,14$	$0,47 \pm 0,10$	$1,94 \pm 0,08$
P ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$)	$0,03 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,01$
μ (d^{-1})	0,451	0,662	0,756	0,827	0,510	0,830
T_g (d)	1,537	1,048	0,917	0,838	1,36	0,835
Clorofila <i>a</i> (mg.L^{-1})	$7,30 \pm 0,97$	$62,75 \pm 15,91$	$5,69 \pm 1,96$	$65,43 \pm 7,76$	$7,74 \pm 2,76$	$42,05 \pm 1,88$

Legenda: B - Biomassa, P - Produtividade, μ - Velocidade específica de crescimento, T_g - Tempo de geração

As cepas C203 e VIN01 apresentaram maior velocidade específica de crescimento e, conseqüentemente, menor tempo de geração com relação à cepa DAM04. Contudo, em termos de produtividade e produção de biomassa, a DAM04 expressou resultados melhores.

O cultivo enriquecido com 5% de CO₂ implicou em uma produção ou produtividade de biomassa superior ao de outros autores que cultivaram *Chlorella* em fotobiorreator *bag*. Yan e Zheng (2010) reportaram produção de $0,616 \pm 0,033 \text{ g.L}^{-1}$, Moheimani (2013) obteve produtividade de $0,14 \pm 0,08 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ e Yan et al. (2016) alcançaram produção de $0,330 \pm 0,021 \text{ g.L}^{-1}$, todos ao cultivarem *Chlorella* sp. Chen e Chang (2016) ao cultivarem *Chlorella sorokiniana* CY1 obteve produção de $2,8 \pm 0,1 \text{ g.L}^{-1}$ e produtividade de $0,275 \pm 0,008 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$.

O fotobiorreator *bag* apresentou melhor desempenho, inclusive, com relação a outros tipos de fotobiorreatores. Wong et al. (2016) ao cultivarem *Chlorella vulgaris* em fotobiorreator tubular obtiveram produção de $0,783 \text{ g.L}^{-1}$ e produtividade de $0,054 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ e Borkenstein et al. (2011) ao cultivarem *Chlorella emersonii* em fotobiorreator *airlift* alcançaram produção de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$.

O baixo desempenho na produção de biomassa no cultivo controle pode ser justificado pela limitação de CO₂, disponível somente pela concentração presente na atmosfera de, aproximadamente, 0,03%. O cultivo de *Chlorella* sp. realizado por Chiu et al. (2008) sob adição de 5% de CO₂ apresentou produção de biomassa de $0,899 \text{ g.L}^{-1}$, enquanto que sob adição de ar atmosférico, $0,682 \text{ g.L}^{-1}$. No entanto, no trabalho realizado por Moraes e Costa (2007), o cultivo da *Chlorella kessleri* com adição de 0,038% de CO₂ implicou em um melhor desempenho na produção de biomassa, alcançando uma produção de biomassa de $1,45 \pm 0,01 \text{ g.L}^{-1}$ e velocidade específica de crescimento de $0,0257 \pm 0,016 \text{ d}^{-1}$, quando comparado com 6% de CO₂ que gerou $0,98 \pm 0,01 \text{ g.L}^{-1}$ e velocidade específica de crescimento de $0,267 \pm 0,013 \text{ d}^{-1}$. Deste modo, comparado ao trabalho realizado pelos autores, as cepas além de se adaptarem ao enriquecimento com 5% de CO₂, apresentaram desempenho melhor.

O cultivo enriquecido demonstrou diminuição na produção de biomassa após o 6º e 7º dia de cultivo. A fim de avaliar a influência à adição de CO₂, a acidificação do meio e o perfil na produção de oxigênio durante o cultivo para cada cepa, pH e oxigênio dissolvido foram monitorados (Figura 13).

Figura 13 - Perfil de pH para as cepas de *Chlorella* a) DAM04, b) C203 e c) VIN01 e OD para d) DAM04, e) C203 e f) VIN01.

O cultivo da DAM04 teve pH inicial de $7,30 \pm 0,03$ para o meio enriquecido e o controle. No entanto, enquanto o controle apresentou aumento gradativo atingindo pH $8,16 \pm 0,24$ no 19º dia, o meio enriquecido teve seu pH diminuído a $6,51 \pm 0,02$ e, a partir do 2º dia, aumentou continuamente até atingir pH $7,28 \pm 0,08$ no 16º dia. O cultivo enriquecido com a cepa C203 teve início em pH $6,78$, reduziu a $6,53$ e alcançou ao final pH $7,69 \pm 0,05$. Já o controle, iniciou em pH $7,34 \pm 0,03$ e no 19º dia atingiu pH $8,93 \pm 0,33$. A cepa VIN01 iniciou em pH $6,93 \pm 0,09$ e após reduzir para pH $6,44 \pm 0,01$, alcançou pH $7,47 \pm 0,14$, por sua vez, o controle teve início em pH $7,19 \pm 0,01$ e no final do cultivo atingiu pH $8,94 \pm 0,43$, apresentando os maiores valores dentre as cepas cultivadas.

A limitação do CO₂ implicou no aumento imediato do pH no cultivo controle com valor máximo de 8,9, já o cultivo enriquecido com CO₂ induziu à diminuição, acidificando o meio com valor mínimo de pH 6,4. A partir do 2º dia o pH aumentou gradativamente,

alcançando o valor inicial no cultivo com a cepa DAM04 e valor superior no cultivo com as cepas C203 e VIN01.

Mayo e Noike (1994) relataram que o cultivo de *Chlorella vulgaris* sob pH inferior a 5,5 ou superior a 10 causou inibição no crescimento e que a velocidade específica de crescimento máxima foi alcançada em pH 7,0.

Considerando o fato da adição de CO₂ ter sido um processo contínuo e ininterrupto, os valores de pH se mostraram dentro da faixa de maior tolerância por microalgas e indicaram que a acidificação do meio de cultivo foi breve, não causou inibição no crescimento celular e permitiu a assimilação do CO₂.

Para o oxigênio dissolvido, do 1º ao 5º dia de cultivo o monitoramento foi realizado de 12/12h, o que possibilitou verificar no cultivo enriquecido a oscilação pronunciada na produção de O₂ com picos e vales, decorrente do processo fotoquímico (fase clara com predominância de produção de O₂) e respectivo consumo na fase escura (respiração). Além disso, a concentração de O₂ no cultivo enriquecido apresentou aumento, indicando acúmulo na produção de biomassa ao realizar a fotossíntese.

A cepa DAM04 no cultivo enriquecido iniciou com $7,1 \pm 0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de OD e diminuiu paralelamente ao pH. Em seguida houve aumento e variação do OD, acompanhando a fase clara e escura. Ao final do cultivo a concentração foi de $9,4 \pm 1,3 \text{ mg.L}^{-1}$, enquanto que o controle apresentou durante o cultivo concentração média de $7,3 \pm 0,3 \text{ mg.L}^{-1}$. A cepa C203 iniciou com OD de $7,2 \pm 0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ e $7,5 \pm 0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ para o cultivo enriquecido e controle, respectivamente. No controle o OD atingiu $9,3 \pm 1,4 \text{ mg.L}^{-1}$ e no enriquecido, após aumento expressivo no 4º dia, encerrou com $11,2 \pm 1,3 \text{ mg.L}^{-1}$. A cepa VIN01 no cultivo enriquecido iniciou com OD de $7,4 \pm 0,2 \text{ mg.L}^{-1}$, atingindo $11,5 \pm 1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ no 5º dia e encerrando com $8,9 \pm 0,5 \text{ mg.L}^{-1}$. O controle iniciou com $6,9 \pm 0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, alcançou $9,5 \pm 0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ e encerrou com $6,2 \pm 0,2 \text{ mg.L}^{-1}$.

5.1.5 Análise bioquímica de lipídeos, carboidratos e proteínas

A determinação bioquímica de lipídeos, carboidratos, proteínas e cinzas, realizada nas coletas, mostrou que houve variação na acumulação assim como entre o cultivo enriquecido e o controle (Tabela 19).

Tabela 19 - Teor de lipídeos, carboidratos, proteínas e cinzas para as cepas DAM04, C203 e VIN01.

Cepa	Condição	Dia	Teor (%)			
			Lipídeos	Carboidratos	Proteínas	Cinzas
DAM04	Controle	13	10,4±1,4	13,8±2,2	27,1±2,1	35,1±7,2
		19	10,6±0,8	17,1±1,8	28,8±0,4	25,4±3,9
	CO ₂	10	17,8±0,4	13,5±2,2	44,7±1,4	15,0±3,1
		16	18,0±0,5	12,7±1,4	44,3±1,7	8,9±3,8
C203	Controle	13	12,9±1,1	10,7±0,8	31,8±1,3	27,3±4,7
		19	12,0±0,3	10,3±0,4	33,3±3,7	24,9±1,5
	CO ₂	10	17,9±0,6	7,6±0,3	58,0±4,3	15,4±3,4
		16	17,8±0,5	8,3±2,0	54,1±5,7	10,5±1,6
VIN01	Controle	13	11,1±1,2	14,1±1,0	35,3±3,2	29,2±4,5
		19	12,6±1,1	9,1±1,7	34,1±5,3	17,7±2,8
	CO ₂	10	15,5±1,4	10,0±1,2	42,1±3,9	9,5±2,4
		16	16,3±0,7	8,1±0,1	44,6±3,0	9,5±1,3

O enriquecimento do cultivo com 5% de CO₂ aumentou o teor de lipídeos para todas as cepas e não houve diferença no acúmulo entre as coletas no cultivo controle e enriquecido. As cepas DAM04 e C203 apresentaram maior acúmulo de lipídeos no cultivo enriquecido e VIN01 e C203 no cultivo controle. Com relação à produtividade lipídica, o melhor desempenho foi apresentado pelas cepas DAM04 e VIN01 com 25,20±1,80 e 19,56±1,63 mg.L⁻¹.d⁻¹ no cultivo enriquecido e pelas cepas VIN01 e DAM04 com 3,78±1,26 e 3,18±1,06 mg.L⁻¹.d⁻¹ no cultivo controle, respectivamente.

Lam e Lee (2013) cultivaram *Chlorella vulgaris* sob adição de 0,03 e 5% de CO₂ com vistas à produção de biodiesel e alcançaram 18,1 e 18,7% de lipídeos com produtividade lipídica de 5,68 mg.L⁻¹.d⁻¹ e 13,59 mg.L⁻¹.d⁻¹, respectivamente. Wong et al. (2016) utilizando, aproximadamente, 0,03% de CO₂ no cultivo de *Chlorella vulgaris* obtiveram, ao utilizarem sistema de borbulhamento na injeção do gás, 39,8% de lipídeos com produtividade lipídica de 21,5 mg.L⁻¹.d⁻¹ e, ao utilizarem sistema airlift na injeção do gás, 39,8% de lipídeos com produtividade de 2,73 mg.L⁻¹.d⁻¹. A partir dos resultados encontrados na literatura, o teor de lipídeos e a produtividade lipídica alcançados no fotobiorreator *bag* foram satisfatórios e apresentaram o potencial das cepas DAM04 e VIN01 na produtividade de lipídeos.

A caracterização dos ácidos graxos presente na porção lipídica das cepas referente ao último dia de cultivo mostrou maior proporção de ácidos graxos saturados devido a maior produção do ácido palmítico (Tabela 20).

Tabela 20 - Perfil de ácidos graxos referente à porção lipídica das cepas DAM04, C203 e VIN01.

Ácido graxo		DAM04		VIN01		C203
		Controle	CO ₂	Controle	CO ₂	Controle
Porcentagem relativa (%)						
Ácidos graxos saturados						
C8:0	Caprílico	2,4	2,0	0,9	0,5	2,6
C10:0	Cáprico	2,9	3,4	1,3	1,7	3,5
C13:0	Tridecílico	3,6	3,8	1,6	1,0	3,5
MeC13	-	nd	1,4	0,2	0,5	1,2
MeC13	-	1,4	nd	0,2	0,5	0,7
C14:0	Mirístico	0,6	0,5	0,5	1,0	0,5
C16:0	Palmitico	22,7	27,4	40,1	32,2	28,3
C18:0	Estearico	7,7	11,5	3,4	6,4	5,7
Ácidos graxos monoinsaturados						
C14:1	Miristoléico	nd	0,6	0,1	0,1	0,2
MeC14	-	5,1	4,0	0,8	0,3	2,1
MeC14	-	nd	0,5	0,2	0,3	1,5
C16:1	Palmitoléico	2,2	5,5	3,6	12,1	12,2
MeC16	-	4,4	1,2	5,4	2,4	1,4
C18:1t	Elaídico	6,2	1,7	3,0	4,4	2,6
C18:1n9	Oleico	2,1	2,4	1,1	2,3	2,5
C18:1n7	cis-Vacênico	1,3	1,0	2,3	2,1	0,8
C19:1n8	-	3,3	4,4	1,7	0,9	2,1
Ácidos graxos polinsaturados						
C18:2n9	cis-trans-Linoléico	7,9	5,7	13,8	8,0	5,0
C18:3n3	α -Linolênico	12,8	8,3	7,3	12,1	10,9
C18:4n3	Estearidônico	2,7	4,0	1,4	1,0	2,0
Outros		10,9	10,6	11,1	10,2	10,8

nd – não detectado

A cepa DAM04 apresentou maior produção de ácidos graxos saturados entre os cultivos enriquecidos, com 50,0% e a VIN01, 48,2% entre os cultivos controle. Esses valores são em função da maior quantidade de ácido palmítico e estearico. Os ácidos graxos monoinsaturados representaram para DAM04 no cultivo controle (24,6%) e enriquecido (21,3%), para VIN01 o cultivo enriquecido apresentou 24,9% e controle 18,2% e a C203 apresentou a maior quantidade no cultivo controle com 25,4%, estando o ácido palmitoléico em maior proporção. Os ácidos polinsaturados representaram 23,4 e 18,0% na DAM04, 22,5 e 21,1% na VIN01 para o cultivo controle e enriquecido, respectivamente, e para C203 17,9% no cultivo controle estando o ácido α -linolênico em maior proporção.

A proporção de ácidos graxos saturados foi semelhante ao trabalho realizado por Radmann e Costa (2008) que, ao cultivar *Chlorella vulgaris* sob adição de 12% de CO₂, obtiveram 37,2% de ácidos saturados, 51% de ácidos monoinsaturados e 11,9% de polinsaturados, respectivamente. Essa proporção pode acontecer em função dos fatores aplicados ao cultivo como, por exemplo, a maior concentração de CO₂ utilizada pelo autor.

Considerando a importância da produção de ácidos graxos saturados para utilização na produção de biodiesel, as cepas mostraram alta capacidade de biossíntese desses compostos e de outros ácidos graxos que podem ser aplicados em outros setores industriais.

As cepas apresentaram diminuição no teor de carboidratos no cultivo enriquecido com 5% de CO₂ e, dentre as cepas, a DAM04 apresentou o maior acúmulo, tanto cultivo enriquecido ($12,7 \pm 1,4$ %) quanto no cultivo controle ($17,1 \pm 1,8$ %). Entre os pontos coleta, no cultivo controle, a cepa DAM04 apresentou aumento (de $13,8 \pm 2,2$ para $17,1 \pm 1,8$ %), a cepa VIN01 apresentou diminuição (de $14,1 \pm 1,0$ para $9,1 \pm 1,7$ %) e a cepa C203 não apresentou variação no acúmulo de carboidratos ($10,7 \pm 0,8$ e $10,3 \pm 0,4$ %). Com relação à produtividade de carboidratos, o melhor desempenho foi apresentado pelas cepas DAM04 e VIN01 com $17,78 \pm 1,27$ e $9,72 \pm 0,81$ mg.L⁻¹.d⁻¹ no cultivo enriquecido e pelas cepas DAM04 e VIN01 com $5,13 \pm 1,71$ e $2,73 \pm 0,91$ mg.L⁻¹.d⁻¹ no cultivo controle, respectivamente.

O teor de proteínas foi favorecido no cultivo enriquecido com 5% de CO₂ e todas as cepas apresentaram aumento no acúmulo de proteínas. No cultivo enriquecido a cepa C203 apresentou o maior valor ($58,0 \pm 4,3$ %) e entre os pontos de coleta as cepas não apresentaram diferença na acumulação de proteínas. As maiores produtividades proteicas foram para as cepas DAM04 com $62,02 \pm 4,43$ mg.L⁻¹.d⁻¹ e VIN01 com $53,52 \pm 4,46$ mg.L⁻¹.d⁻¹ no cultivo enriquecido e para as cepas VIN01 e DAM04 com $10,23 \pm 3,41$ e $8,64 \pm 2,88$ mg.L⁻¹.d⁻¹ no cultivo controle, respectivamente.

O teor de cinzas apresentou diminuição do cultivo controle para o cultivo enriquecido e entre os pontos de coleta. O excesso de nutrientes pode ter precipitado com a biomassa.

Lourenço (2006) reportou que elevados teores de proteínas na biomassa de microalgas são explicados pela alta concentração de nitrogênio no meio de cultivo. Contudo, a partir do experimento tem-se que a disponibilidade de CO₂ no meio foi essencial para que houvesse assimilação do nitrogênio e conversão em proteínas.

Os resultados foram semelhantes ao encontrado por Xu; Miao; Wu (2006) no cultivo fotoautotrófico de *Chlorella protothecoides* que obtiveram $14,57 \pm 0,16$ % de lipídeos, $52,64 \pm 0,26$ % de proteínas, $10,62 \pm 0,14$ % de carboidratos e $6,36 \pm 0,05$ % de cinzas. Harun et al. (2010) reportaram o teor de proteínas e carboidratos presente em diferentes espécies de

microalgas e, *Chlorella vulgaris* e *Chlorella pyrenoidosa*, apresentaram em sua composição, entre 51-58% e 57% de proteínas e 12-17% e 26% de carboidratos, respectivamente.

Estudos demonstram que para haver maior acúmulo de lipídeos ou carboidratos, a microalga deve passar por estresse como limitação de nitrogênio. Illman; Scragg; Shales (2000) ao cultivarem 5 espécies de *Chlorella* sob limitação de nitrogênio obtiveram para todas as espécies acúmulo de lipídeos e aumento ou diminuição no teor de carboidratos (Tabela 21).

Tabela 21 - Teor e produtividade celular de cepas de *Chlorella* cultivadas sob baixa concentração de nitrogênio.

Cepa	Condição	Componente					
		Proteína		Carboidrato		Lipídeos	
		T (%)	P (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	T (%)	P (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	T (%)	P (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)
<i>C. vulgaris</i>	Controle	29	11,9	51	20,9	18	7,4
	Baixo-N	7	2,6	55	20,4	40	14,8
<i>C. emersonii</i>	Controle	32	9,0	41	11,5	29	8,1
	Baixo-N	28	22,1	11	8,7	63	49,8
<i>C. protothecoides</i>	Controle	38	1,0	52	1,3	11	0,3
	Baixo-N	36	8,3	41	9,4	23	5,3
<i>C. sorokiniana</i>	Controle	45	1,2	38	1,0	20	0,5
	Baixo-N	42	2,0	32	1,5	22	1,1
<i>C. minutissima</i>	Controle	24	7,7	42	13,4	31	9,9
	Baixo-N	9	1,4	14	2,2	57	9,1

Legenda: T – teor P – Produtividade

Hamed (2015) para estimular a produção de lipídeos e carboidratos em *Chlorella vulgaris*, após determinado período de cultivo, modificou as condições do meio para causar estresse celular e induzir ao aumento dos compostos de interesse. O estresse implicou no aumento de 9,7 para 14,8% de lipídeos e de 14,0 para 26,7% de carboidratos e na diminuição de 48,0 para 32,1% de proteínas.

O cultivo realizado no fotobiorreator *bag* demonstrou que, embora o cultivo enriquecido com 5% de CO₂ tenha implicado em uma menor porcentagem no teor de carboidratos, com relação ao cultivo controle, a produtividade de carboidratos foi maior, inclusive com relação a trabalhos em que são aplicados mecanismos para estresse celular da microalga para induzir o acúmulo de carboidratos e lipídeos.

Deste modo, as cepas mostraram potencial de produtividade dos compostos de interesse para aplicação na produção de biocombustíveis a partir do meio de cultivo rico em nutrientes e enriquecido com 5% de CO₂ e os resultados expressaram o potencial das cepas na

assimilação de nutrientes e a modificação das características bioquímicas que favoreceram acúmulo de lipídeos e proteínas.

5.1.6 Seleção da cepa para 2ª ETAPA

Considerando a produção de lipídeos, carboidratos e biomassa, a cepa DAM04 apresentou maior produção de biomassa e produtividade. Essa característica mostrou-se como fator de escolha na utilização da DAM04 na 2ª Etapa da pesquisa, na qual utilizou-se um fotobiorreator placa plana projetado com vistas a potencializar as atividades fotossintéticas e, por consequência, melhorar os parâmetros analisados.

5.2 2ª ETAPA

5.2.1 Assimilação de nutrientes e biofixação de CO₂

A assimilação de carbono, nitrogênio e fósforo foi expressiva no cultivo enriquecido (Tabela 22).

Tabela 22 - Assimilação de nutrientes pela cepa DAM04 no fotobiorreator placa plana.

DAM04				
Condição	Dia	C (mM)	N (mM)	P (mM)
Controle	14	17,51±0,13	2,78±0,01	0,44±0,07
CO ₂	8	72,35±1,51	12,26±0,33	2,85±0,03
	14	189,32±1,53	26,72±1,98	2,82±0,33

A cepa DAM04, no cultivo controle, apresentou razão de 40C:6N:P, assimilando 9,3% (38,89±0,14 de 420,00 mg.L⁻¹) de N e 6,4% de P (13,58±2,20 de 213,90 mg.L⁻¹) e, no cultivo enriquecido, assimilou 89,1% (374,12±27,76 de 420,00 mg.L⁻¹) de N e 40,9% (87,37±10,12 de 213,90 mg.L⁻¹) de P, apresentando relação de 67C:10N:P. O cultivo enriquecido resultou

em uma assimilação 9,6 vezes maior de nitrogênio e 6,4 vezes maior de fósforo com relação ao controle.

A razão N:P no cultivo enriquecido para a DAM04 mostrou-se igual no fotobiorreator *bag* e placa plana. Contudo, a assimilação de nitrogênio foi 2,4 vezes maior (de $157,61 \pm 17,39$ para $374,12 \pm 27,76$ mg.L⁻¹) no fotobiorreator placa plana com relação ao fotobiorreator *bag*. Além disso, entre os pontos de coleta, enquanto no cultivo enriquecido realizado no fotobiorreator *bag* a cepa aumentou em 2 vezes (de $17,76 \pm 2,05$ para $34,42 \pm 3,96$ mg.L⁻¹) a concentração de fósforo assimilado, no fotobiorreator placa plana a concentração de fósforo manteve-se invariável ($88,32 \pm 1,01$ e $87,38 \pm 10,12$ mg.L⁻¹).

O desempenho apresentado pela cepa DAM04 demonstrou que o fotobiorreator placa plana possibilitou maior assimilação dos nutrientes, implicando diretamente na produção de biomassa e demais parâmetros de crescimento.

O cultivo realizado no fotobiorreator placa plana possibilitou uma biofixação de CO₂ superior com relação ao fotobiorreator *bag* (Tabela 23).

Tabela 23 - Biofixação de CO₂ pela cepa DAM04 no fotobiorreator placa plana

Cepa	Condição	Dia	Taxa de CO ₂ biofixado (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	CO ₂ biofixado (g.L ⁻¹)
DAM04	Controle	14	0,053	0,77
	CO ₂	14	0,593	8,34

A cepa DAM04 apresentou uma taxa de CO₂ biofixado 11,2 vezes superior ao controle e 3,1 vezes superior (de $0,193 \pm 0,019$ para $0,593$ g.L⁻¹.d⁻¹) ao cultivo realizado no fotobiorreator *bag*. Além disso, possibilitou 10,8 vezes mais CO₂ biofixado no cultivo enriquecido e 2,7 vezes mais (de 3,10 para 8,34 g.L⁻¹) CO₂ biofixado com relação ao cultivo no fotobiorreator *bag*.

O fotobiorreator placa plana possibilitou maior assimilação do CO₂ disponibilizado, tanto no cultivo controle quanto no cultivo enriquecido, indicando a possibilidade de aplicação da cepa de *Chlorella* sp. DAM04 na biofixação de maiores concentrações de CO₂.

5.2.2 Produção de biomassa e cinética de crescimento

O cultivo no fotobiorreator placa plana aumentou a produção de biomassa para a DAM04, tanto no sistema enriquecido quanto no controle (Figura 14).

Figura 14 - Perfil de crescimento da cepa DAM04 cultivada em fotobiorreator placa plana

Entre os pontos da fase estacionária, a DAM04 apresentou aumento na biomassa de, aproximadamente, 2,4 vezes (de 2,23 para 5,40 g.L⁻¹) no cultivo enriquecido e 2, 5 vezes (de 0,234 para 0,580 g.L⁻¹) cultivo controle.

A produção final e os parâmetros de crescimento são apresentados na Tabela 24.

Tabela 24 - Produção de biomassa e parâmetros de crescimento.

DAM04		
	CO ₂	Controle
Dia	14	14
B (g.L ⁻¹)	5,40	0,580
P (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	0,389	0,040
μ (d ⁻¹)	0,957	0,293
Tg (d)	0,724	2,363
Clorofila a (mg.L ⁻¹)	217,07	13,68

Legenda: B: Biomassa, P: Produtividade, μ: Velocidade específica de crescimento, T_g: Tempo de geração.

O cultivo enriquecido com 5% de CO₂ apresentou, respectivamente, produção e produtividade de 9,3 e 9,7 vezes, maior que o controle, além de atingir uma velocidade específica de crescimento 3,3 vezes superior. Deste modo, o tempo de geração foi, igualmente, 3,3 vezes menor no cultivo controle.

Ao relacionar o desempenho alcançado para cepa DAM04 entre os fotobiorreatores, constatou-se que o cultivo enriquecido no placa plana melhorou todos os parâmetros de

crescimento, sendo a produção 2,4 vezes (de $2,22 \pm 0,21$ para $5,4 \text{ g.L}^{-1}$), a produtividade 2,8 vezes (de $0,138 \pm 0,013$ para $0,389 \text{ g.L}^{-1}$) e a velocidade específica de crescimento específica 1,5 vezes maior (de $0,662$ para $0,957 \text{ d}^{-1}$), respectivamente.

A produção de clorofila *a* foi 15,9 vezes maior no cultivo enriquecido com relação ao controle e, quando comparado à produção no fotobiorreator *bag*, 3,5 vezes (de $62,75 \pm 15,91$ para $217,07 \text{ mg.L}^{-1}$) e 1,9 vezes (de $7,30 \pm 0,96$ para $13,68 \text{ mg.L}^{-1}$) no cultivo enriquecido e controle, respectivamente. Ao relacionar a massa de clorofila *a* com a produção de biomassa, a cepa apresentou valor superior ao cultivo realizado no fotobiorreator *bag*, sendo de 4,0% (2,8% na *bag*) no cultivo enriquecido e 2,4% (1,4% na *bag*) no cultivo controle.

No estudo realizado por Bosma et al. (2014), fotobiorreator placa plana com espessura de 20 mm entre as paredes apresenta expectativa de produção de biomassa de 2 a 5 g.L^{-1} . Feng et al. (2011) cultivaram *Chlorella zofingiensis* em fotobiorreator placa plana com 170 mm de espessura entre as paredes em ambiente, sob influência da radiação luminosa e temperatura ambiente, e alcançaram produção de biomassa de $1,587 \pm 0,016 \text{ g.L}^{-1}$ e maior produtividade de $0,058 \pm 0,001 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ na primavera. Cuaresma et al. (2009) ao cultivar *Chlorella sorokiniana* em fotobiorreator placa plana com espessura de 14 mm entre as paredes, meio de cultivo M-8 e iluminação de $2100 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ com LED alcançaram produção de biomassa de $5,7 \text{ g.L}^{-1}$ e produtividade de $12,2 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e no estudo realizado por Tuantet et al. (2014), foram aplicados 5 mm de espessura entre as paredes do fotobiorreator placa plana e *Chlorella sorokiniana* alcançou produção de biomassa de $15,4 \text{ g.L}^{-1}$ e produtividade de $14,8 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$.

O desempenho alcançado pela cepa DAM04 atendeu a expectativa de produção de biomassa estimada por Bosma et al. (2014) e apresentou produção de biomassa semelhante a Cuaresma et al. (2009) que utilizaram sistema com menor espessura para passagem de luz. Além disso, a partir dos trabalhos de Cuaresma et al. (2009) e Tuantet et al. (2014) têm-se que a diminuição na espessura entre as paredes do fotobiorreator placa plana pode influenciar diretamente na captação de luz e aumento de produtividade.

O perfil de pH e oxigênio dissolvido no fotobiorreator placa plana foi monitorado e é apresentado na Figura 15.

Figura 15 - Perfil de pH e OD durante cultivo da cepa de *Chlorella* DAM04 em fotobiorreator placa plana.

O perfil de pH no cultivo enriquecido para o fotobiorreator placa plana, após iniciar com pH 7,29 apresentou acidificação de forma semelhante ao cultivo no fotobiorreator *bag* e OD inicial 7,0 mg.L⁻¹, no cultivo enriquecido e controle. Contudo, a partir do enriquecimento com CO₂ do sistema, a oxigenação apresentou um pico de 15,7 mg.L⁻¹ no 6º dia e, em seguida, decaiu, chegando ao final do cultivo com 7,7 mg.L⁻¹. O controle, por sua vez, apresentou ao longo do cultivo média de 8,02±0,48 mg.L⁻¹ apresentando, ao final, 8,9 mg.L⁻¹.

O cultivo enriquecido realizado no fotobiorreator *bag*, a partir do 4º dia, apresentou concentração média de 9,1±0,8 mg.L⁻¹ que se manteve até o final do cultivo. O fotobiorreator placa plana, de modo semelhante, a partir do 4º dia, apresentou constância de 12,0±1,8 mg.L⁻¹, que se manteve até 12º dia e, nos dois pontos de monitoramento que se seguiram, apresentou redução. Ao observar os valores de pH e produção de biomassa no período de redução do OD, houve estabilidade e maior tendência à fase estacionária. Nesse sentido, há indicativo de um saldo maior na respiração, revelando incapacidade fotossintética.

O fotobiorreator placa plana foi dimensionado para melhorar a captação de luz, a partir da aplicação de 26 mm de espessura entre as paredes. Além disso, o sistema de aeração possibilitou melhor difusão de gases contendo CO₂. Desta forma, as características permitiram maior eficiência no armazenamento de energia e, consequentemente, maior biofixação de CO₂, produção de biomassa e síntese de pigmentos (clorofila *a*).

5.2.3 Análise bioquímica de lipídeos, carboidratos e proteínas

A determinação bioquímica de lipídeos, carboidratos, proteínas e cinzas realizada nas coletas, mostrou maior acúmulo de lipídeos no cultivo enriquecido, carboidratos e cinzas no cultivo controle e valores próximos de proteínas nas duas condições de cultivo (Tabela 25).

Tabela 25 - Teor de lipídeos, carboidratos, proteínas e cinzas.

Teor (%)						
Cepa	Condição	Dia	Lipídeos	Carboidratos	Proteínas	Cinzas
DAM04	Controle	14	15,9±0,7	12,1	41,9±0,2	14
	CO ₂	8	19,8±0,7	9,5	48,6±1,2	7,7
		14	20,3±0,4	10,4	43,3±3,2	8,1

O enriquecimento do cultivo com 5% de CO₂ implicou para cepa DAM04 em 4,4% mais lipídeos com relação ao cultivo controle e não apresentou diferença no acúmulo entre as coletas. Com relação à produtividade lipídica, a cepa DAM04 apresentou 79,16±1,52 e 6,36±0,26 mg.L⁻¹.d⁻¹ no cultivo enriquecido e controle, respectivamente. Quando comparado ao fotobiorreator *bag*, no fotobiorreator placa plana a cepa DAM04 não apresentou aumento expressivo teor de lipídeos e apresentou 3 e 2 vezes maior produtividade lipídica no cultivo enriquecido e controle, respectivamente.

O perfil de ácidos graxos para DAM04, de modo semelhante ao cultivo no fotobiorreator *bag*, apresentou maior proporção de ácidos graxos saturados em função dos ácidos palmítico e esteárico (Tabela 26).

Tabela 26 - Perfil de ácidos graxos referente à porção lipídica da cepa DAM04.

Ácido graxo		DAM04	
		Controle	CO ₂
		Porcentagem relativa (%)	
Ácidos graxos saturados			
C8:0	Caprílico	3,8	0,9
C10:0	Cáprico	4,2	0,9
C13:0	Tridecílico	4,4	1,8
MeC13	-	nd	1,0
MeC13	-	1,0	nd
C14:0	Mirístico	0,7	0,6
C16:0	Palmítico	27,6	37,5
C18:0	Estearico	10,8	6,4
Ácidos graxos monoinsaturados			
C14:1	Miristoléico	nd	0,5
MeC14	-	4,4	0,8
MeC14	-	nd	0,4
C16:1	Palmitoléico	3,3	3,5
MeC16	-	1,8	3,2
C18:1t	Elaídico	2,9	4,9
C18:1n9	Oleico	1,9	2,5
C18:1n7	cis-Vacênico	0,9	1,9
C19:1n8	-	3,8	1,2
Ácidos graxos polinsaturados			
C18:2n9	cis-trans-Linoléico	2,6	8,8
C18:3n3	α -Linolênico	10,5	11,4
C18:4n3	Estearidônico	3,9	1,2
Outros		11,6	10,4
nd – não detectado			

nd – não detectado

Os ácidos graxos representaram 52,5% e 49,1% para ácidos graxos saturados, 19,0% e 18,1% para ácidos monoinsaturados e 17,0% e 21,4% para ácidos polinsaturados no cultivo controle e enriquecido, respectivamente. Quando comparado com perfil de ácidos graxos apresentado no cultivo realizado no fotobiorreator *bag*, tem-se como mais expressivo o aumento na produção de ácido palmítico, de 22,7% para 27,6% no cultivo controle e 27,4% para 37,5% no cultivo enriquecido.

Wang et al. (2014) cultivaram *Chlorella pyrenoidosa* em fotobiorreator placa plana, diferentes condições de cultivo, sob adição de 2% de CO₂ e, em ambiente controlado, alcançaram teor de lipídeos de 28,1±1,0 e 32,8±1,1% e produtividade lipídica de 70,8±2,3 e 113,0±1,6 mg.L⁻¹.d⁻¹ em meio de cultivo original e otimizado, respectivamente. Feng et al. (2011) ao cultivarem *Chlorella zofingiensis* alcançaram teor de lipídeos de 54,5±3,0 e

33,8±1,7% e respectiva produtividade lipídica, 6,3±0,3 e 22,3±0,9 mg.L⁻¹.d⁻¹. No trabalho realizado por Tuantet et al. (2014), o teor de lipídeos alcançado pela *Chlorella sorokiana* foi entre 16 e 25% com estima de produtividade lipídica de 0,9 a 3,6 g. L⁻¹.d⁻¹ e apresentou maior fração de ácidos palmítico, cis-trans-Linolêico e α -Linolênico. Yang et al. (2016) cultivaram *Chlorella vulgaris* em fotobiorreator placa plana com água residuária e obtiveram 18,66% de ácidos saturados, 71,61% de ácidos monoinsaturados e 9,75% de ácidos poliinsaturados com maior fração para os ácidos oleico, ácido palmítico e ácido linoleico.

De modo semelhante à biossíntese realizada no fotobiorreator *bag*, a cepa DAM04 no fotobiorreator placa plana apresentou maior produção de ácidos graxos saturados, mostrando potencial para aplicação na produção de biodiesel. Além disso, teor de lipídeos e produtividade lipídica aumentaram tanto no cultivo enriquecido quanto no controle e mostrou-se equivalente a estudos orientados à produção de biodiesel.

No cultivo enriquecido a cepa DAM04 apresentou menor teor de carboidratos com relação ao cultivo controle e acúmulo semelhante entre as coletas. A produtividade de carboidratos foi de 40,46±0,33 e 4,84±0,02 mg.L⁻¹.d⁻¹ no cultivo enriquecido e controle, respectivamente. Comparado ao fotobiorreator *bag*, no fotobiorreator placa plana a cepa DAM04 apresentou aumento de 5% no teor de carboidratos e 2,3 vezes maior produtividade de carboidratos no cultivo enriquecido.

O teor de proteínas na DAM04 apresentou valores próximos entre o cultivo enriquecido com 5% de CO₂ e controle e, entre os pontos de coleta, o cultivo enriquecido implicou na diminuição do acúmulo de proteínas. A cepa DAM04 apresentou produtividade proteica de 168,44±1,25 e 16,76±0,06 mg.L⁻¹.d⁻¹ no cultivo enriquecido e controle, respectivamente. No fotobiorreator placa plana, comparado ao fotobiorreator *bag*, a cepa DAM04 apresentou valores próximos no teor de carboidratos tanto no cultivo enriquecido quanto no controle e 2,7 e 1,9 vezes maior produtividade proteica no cultivo enriquecido e controle, respectivamente.

A cepa DAM04 apresentou maior teor de cinzas no cultivo controle com relação ao cultivo enriquecido e, entre os pontos de coleta não houve diferença. Comparado ao fotobiorreator *bag*, no fotobiorreator placa plana a cepa DAM04 apresentou 10% menos de teor de cinzas no cultivo controle.

A partir da relação entre o teor e produtividade para cada componente na cepa DAM04, têm-se que, com relação ao fotobiorreator *bag*, o cultivo fotoautotrófico realizado no fotobiorreator placa plana potencializou o desempenho na biossíntese dos compostos bioenergéticos de aplicação na produção de biocombustíveis. Além disso, os resultados

alcançados no fotobiorreator *bag* e placa plana mostraram-se equivalentes ao encontrado na literatura (Tabela 27).

Tabela 27 - Compilação de produtividade de biomassa, lipídeos e carboidratos de *Chlorella* em diferentes fotobiorreatores.

Microalga	Produtividade (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)			Fotobiorreator	Referência
	Biomassa	Lipídeos	Carboidratos		
DAM04	138±13	25,20±1,80	17,78±1,27	<i>bag</i>	o autor
<i>Chlorella sp.</i>	140±80	35±20	-	<i>bag</i>	Moheimani (2013)
<i>C. sorokiniana</i>	275±8	153,7	-	<i>bag</i>	Chen e Chang (2016)
DAM04	389	79,16±1,52	40,46±0,33	placa plana	o autor
<i>C. sorokiniana</i>	12200	-	-	placa plana	Cuaresma et al. (2009)
<i>C. zofingiensis</i>	58,4±1,4	22,3±0,9	-	placa plana	Feng et al. (2011)
<i>C. pyrenoidosa</i>	-	113,0±1,6	-	placa plana	Wang et al. (2014)
<i>C. vulgaris</i>	37	14,8	20,4	tubular	Illman; Scragg; Shales (2000)
<i>C. emersonii</i>	79	49,8	8,7	tubular	Illman; Scragg; Shales (2000)
<i>C. vulgaris</i>	72,66	13,59	-	tubular	Lam e Lee (2013)
<i>Chlorella sp.</i>	482	73	103,2	tubular	Santos (2013)
<i>C. vulgaris</i>	54	21,5	-	tubular	Wong et al. (2016)

Deste modo, o estudo ao explorar e avaliar o potencial de produtividade da *Chlorella* sp. estabeleceu o perfil e desempenho das cepas para aplicação na produção de biocombustíveis, assim como na assimilação de nutrientes e biofixação de carbono, apresentando como desafio para futuros trabalhos a exploração das cepas para biofixação de maiores concentrações de CO₂ e a utilização de um fotobiorreator placa plana com menor espessura, a fim de otimizar a captação de radiação luminosa.

6. CONCLUSÕES

O cultivo das cepas de *Chlorella* sp. DAM04, C203 e VIN01 nos fotobiorreatores *bag* enriquecidos com 5% de CO₂ resultou no melhor desempenho da cepa DAM04 que apresentou maior assimilação dos nutrientes, taxa de CO₂ biofixado e biofixação de carbono. Os nutrientes não foram limitantes ao crescimento das cepas e a maior assimilação dos recursos implicou para cepa DAM04 na maior produtividade e produção de biomassa.

O enriquecimento do cultivo com 5% de CO₂ favoreceu o aumento no teor de lipídeos e proteínas para todas as cepas. A cepa DAM04 apresentou a maior produtividade lipídica, proteica e de carboidratos.

O fotobiorreator placa plana potencializou o desempenho da cepa em todos os parâmetros no cultivo enriquecido com 5% de CO₂ e controle com relação ao fotobiorreator *bag*. A assimilação dos nutrientes aumentou em 51,6% do nitrogênio e 24,8% do fósforo, a taxa de CO₂ biofixado aumento cerca de 3 vezes e produtividade e produção total de biomassa aumentaram cerca de 3 e 2,4 vezes, respectivamente.

O perfil bioquímico apresentou aumento no teor dos compostos, cerca de 3 vezes na produtividade lipídica e proteica e 2 vezes na produtividade de carboidratos no cultivo enriquecido com 5% de CO₂.

Desse modo, o estudo mostrou que a cepa DAM04 apresenta condições para aplicação na biossíntese dos compostos bioenergéticos de aplicação na produção biocombustíveis, além da capacidade de assimilação de alta carga de nitrogênio e fósforo e potencial para cultivo com maiores concentrações de CO₂.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamczyk, M.; Lasek, J.; Skawińska, A. CO₂ Biofixation and Growth Kinetics of *Chlorella vulgaris* and *Nannochloropsis gaditana*. **Applied biochemistry and biotechnology**. p. 1-14, 2016.
- Agren, G. I. The C:N:P stoichiometry of autotrophs – theory and observations. **Ecology Letters**, v. 7, p. 185–191, 2004.
- Algal Cell Culture Media. Disponível em: <<http://www.genengnews.com/gen-articles/cell-culture-media-market-maturing/3981/?page=2>>. Acesso em: 17-10-2016.
- Amaro, H. M.; Guedes, A. C.; Malcata, F. X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied Energy**. v. 88, p. 3402-3410, 2011.
- Andersen, R. A. Algal culturing techniques. **Academic press**, 2005.
- Andrade, M. R.; Costa, J. A. V. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. **Aquaculture**. v. 264, p. 130-134, 2007.
- APHA – American Public Health Association; AWWA – American Water Works Association; Wef – Water Environment Federation. **Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater**. Association And Water Environment Federation, Washington, Ed. 21, 2005.
- Bagi, Z.; Ács, N.; Bálint, B.; Horváth, L.; Dobó, K.; Perei, K. R.; Rákhely, G.; Kovács, K. L. Biotechnological intensification of biogás production. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 76, p. 473-482, 2007.
- Barbier, E. Nature and Technology of Geothermal Energy: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 1, p. 1-69, 1997.
- Becker, E. W. Microalgae: Biotechnology And Microbiology. **Cambridge University Press**, v.10, 1994.
- Belotti, G.; Caprariis, B.; Filippis, P.; Scarsella, M.; Verdone, N. Effect of *Chlorella vulgaris* growing conditions on bio-oil production via fast pyrolysis. **Biomass and Bioenergy**. v. 61, p. 187-195, 2014.
- Bertoldi, F. C.; Sant’Anna, E.; Oliveira, J. L. B. Teor de clorofila e perfil de sais minerais de *Chlorella vulgaris* cultivada em solução hidropônica residual. **Ciência Rural**. v. 38, p. 54-58, 2008.
- Bhatnagar, A.; Bhatnagar, M.; Chinnasamy, S.; Das, K. C. *Chlorella minutissima*—a promising fuel alga for cultivation in municipal wastewaters. **Applied biochemistry and biotechnology**. v. 161, p. 523-536, 2010.
- Bonini, A. M.; Bastos, G. R. Produção de biomassa de *Aphanothece microscopica* e *Chlorella vulgaris* por cultivo heterotrófico a partir de Glicose. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**. V. 33, p. 151-160, 2013.

- Borkenstein, C. G.; Knobelechner, J.; Frühwirth, H.; Schagerl, M. Cultivation of *Chlorella emersonii* with flue gas derived from a cement plant. **Journal of Applied Phycology**. v. 22, p. 131-135, 2011.
- Borowitzka, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**. v. 70, p. 313-321, 1999.
- Bosma, R.; Vree, J. H.; Slegers, P. M.; Janssen, M.; Wijffels, R. H.; Barbosa, M. J. Design and construction of the microalgal pilot facility AlgaePARC. **Algal Research**. v. 6, 160-169, 2014.
- Brányiková, I.; Maršálková, B.; Doucha, J.; Brányik, T.; Bišová, K.; Zachleder, V.; Vítová, M. Microalgae—Novel Highly Efficient Starch. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, 2011
- Brennan, L; Owende, P. Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 14, p. 557-577, 2010.
- Brown, L. M.; Zeiler, K. G. Aquatic Biomass and Carbon Dioxide Trapping. **Energy Convers. Mgmt.** v. 34, p. 1005-1013, 1993.
- Carvalho, A. P.; Meireles, L. A.; Malcata, F. X. Microalgal Reactors: A Review of Enclosed System Designs and Performances. **Biotechnol. Prog.** v. 22, p. 1490-1506, 2006.
- Chen, C.; Chang, H. Lipid production of microalga *Chlorella sorokiniana* CY1 is improved by light source arrangement, bioreactor operation mode and deep-sea water supplements. **Biotechnol.** v. 11, p. 356-362, 2016.
- Chia, M. A.; Lombardi, A. T.; Melão, M. G. G. Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**.v. 85, p. 1427-1438, 2013.
- Chinnnasamy, S.; Bhatnagar, A.; Hunt, R. W.; Das, K. C. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 3097-3105, 2010.
- Chisti, M. Y.; Halard, B.; Moo-Young, M. Liquid Circulation in Airlift Reactors. **Chemical Engineering Science**. v. 43, p. 451-457, 1988.
- Chisti, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**. v. 25, p. 294-306, 2007
- Chiu, S. Y.; Kao, C. Y.; Chen, C. H.; Kuan, T. C.; Ong, S. C.; Lin, C. S. Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella sp.* in a semicontinuous photobioreactor. **Bioresource Technology**. v. 99, p. 3389-3396, 2008.
- Chiu, S. Y.; Kao, C. Y.; Tsai, M. T.; Ong, S. C.; Chen, C. H.; Lin, C. S. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. **Bioresource Technology**. v. 100, p. 833-838, 2009.
- Chiu, S.; Chien-Ya, K.; Chen, C.; Kuan, T.; Ong, S.; Lin, C. Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella sp.* in a semicontinuous photobioreactor. **Bioresource Technology**. v. 99, p. 3389-3396, 2008.

Chojnacka, K.; Noworyta, A. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 34, p. 461-465, 2004.

Christie, W. W. Equivalent chain-lengths of methyl ester derivatives of fatty acids on gas chromatography A reappraisal. **Journal of Chromatography**. v. 447, p. 305-314, 1988.

Collet, P.; Hélias, A.; Lardon, L.; Ras, M.; Goy, R-A.; Seyer, J-P. Life-cycle assessment of microalgae culture coupled to biogas production. **Bioresource Technology**. v. 102, p. 207-214, 2011.

Costa, J. A. V.; Radmann, E. M.; Cerqueira, V. S.; Santos, G. C. D.; Calheiros, M. N. Perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* cultivadas em diferentes condições. **Alim. Nutr.** v. 17, p. 429-436, 2006.

Coutteau, P. Micro-Algae. In P. Lavens, P. Sorgeloos. Manual On The Production And Use Of Live Food For Aquaculture. Rome: **Fao Fisheries Technical Paper**. p. 7-48, 1996.

Cruz, R. V. A. Estudo da utilização de microalgas e cianobactérias para a captura de dióxido de carbono e produção de matérias-primas de interesse industrial. **Tese (Doutorado)**. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. p. 160, 2011.

Cuaresma, M.; Janssen, M.; Vilchez, C.; Wijffels, R. H. Productivity of *Chlorella sorokiniana* in a Short Light-Path (SLP) Panel Photobioreactor Under High Irradiance. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 104, p. 352-359, 2009.

Demirbaş, A. Biomass resource facilities and biomass conversion processing for fuels and chemicals. **Energy Conversion and Management**. v. 42, p. 1357-1378, 2001.

Dermibas, A.; Dermibas, M. F. Importance of algae oil as a source of biodiesel. **Egerny Conversion and Management**. v. 52, p. 163-170, 2011.

Doucha, J.; Lívanský, K.; Kotrbáček, V.; Zachleder, V. Production of *Chlorella* biomass enriched by selenium and its use in animal nutrition: a review. **Applied microbiology and biotechnology**. v. 83, p. 1001-1008, 2009.

Dragone, G.; Bruno, D. F.; Abreu, A. P.; Vicente, A. A.; Teixeira, J. A. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. **Applied Energy**. v. 88, p. 3331-3335, 2011.

Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**. v. 28, 1956.

Eibl, R.; Kaiser, S.; Lombriser, R.; Eibl, D. Disposable bioreactors: the current state-of-the-art and recommended applications in biotechnology. **Applied microbiology and biotechnology**. v. 86, p. 41-49, 2010.

El-Ansari, O.; Colman, B. Inorganic carbon acquisition in the acid-tolerant alga *Chlorella kessleri*. **Physiologia Plantarum**. v. 153, p. 175-182, 2015.

Escobar, J. C.; Lora, E. S.; Venturini, O. J.; Yáñez, E. E.; Castillo, E. F.; Almazan, O. Biofuels: Environment, technology and food security. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 13, p. 1275-1287, 2009.

Espinosa-Gonzalez, I.; Parashar, A.; Bressler, D. C. Heterotrophic growth and lipid accumulation of *Chlorella protothecoides* in whey permeate, a dairy by-product stream, for biofuel production. **Bioresource Technology**. v. 155, p. 170-176, 2014.

Estévez-Landazábal, L.-L.; Barajas-Solano, A.-F.; Barajas-Ferreira, C.; Kafarov, V. Improvement of Lipid Productivity on *Chlorella vulgaris* Using Waste Glycerol and Sodium Acetate. **Ciencia, Tecnología y Futuro**. v. 5, p. 113-126, 2013.

Feng, P.; Deng, Z.; Hu, Z.; Fan, L. Lipid accumulation and growth of *Chlorella zofingiensis* in flat plate photobioreactors outdoors. **Bioresource Technology**. v. 102, p. 10577-10584, 2011.

Folch, J.; Lees, M.; Sloane-Stanley, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Biological Chemistry**, 1957.

Garcia-Ochoa, F.; Gomez, E.; Santos, V. E.; Merchuk, J. C. Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. **Biochemical Engineering Journal**. v. 49, p. 289-307, 2010.

García-Rodríguez, L. Seawater desalination driven by renewable energies: a review. **Desalination**. v. 143, p. 103-113, 2002.

Geider, R.; Roche, J. L. Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. **European Journal of Phycology**. v. 37, p. 1-17, 2002.

Greenwell, H. C.; Laurens, L. M.; Shields, R. J.; Lovitt, R. W.; Flynn, K. J. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. **Journal of the Royal Society Interface**. 2009.

Grobbellar, J. U. Physiological and technological considerations for optimising mass algal cultures. **Journal of Applied. Phycology**. v. 12, p. 201-206, 2000.

Guillard, R. R. L.; Lorezen, C. J. Yellow-green algae with chlorophyllide C^{1,2}. **Journal of Phycology**. v. 8, p. 10-14, 1972.

Gustavsson, L.; Börjesson, P.; Johansson, B.; Svenningsson, P. Reducing CO₂ emissions by Substituting Biomass for Fossil Fuels. **Energy**. v. 20, p. 1097-1113, 1995.

Hamed, S. R. Complementary Production of Biofuels by the Green Alga *Chlorella vulgaris*. **International Journal of Renewable Energy Research (IJRER)**. v. 5, p. 936-943, 2015.

Harun, R.; Singh, M.; Forde, G. M.; Danquah, M. K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 14, p. 1037-1047, 2010.

Havlík, P.; Schneider, U. A.; Schmid, E.; Bötcher, H.; Fritz, S.; Skalscký, R.; Aoki, K.; De Cara, S.; Kindermann, G.; Kraxner, F.; Leduc, S.; McCallum, I.; Mosnier, A.; Sauer, T.; Obersteiner, M. Global land-use implications of first and second generation biofuels targets. **Energy Policy**. v. 39, p. 5690-5702, 2011.

Hirano, H.; Ueda, R.; Hirayama, S.; Ogushi, Y. CO₂ fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation. **Energy**. v. 22, p. 137-142, 1997.

Hoek, V. D.; Mann, D. G; Jahns, H. M. Algae: an introduction to phycology. **Cambridge University Press**. p. 623, 1995.

Huang, G.; Chen, F.; Wei, D.; Zhang X.; Chen, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**. v. 87, p. 38-46, 2010.

Huber, G. W.; Iborra, S.; Corma, A. Synthesis of Transportation Fuels from Biomass: Chemistry, Catalysts and Engineering. **Chem. Rev.** v. 106, p. 4044-4098, 2006.

Illman, a. M.; Scragg, A. H.; Shales, S. W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 27, p. 631-635, 2000.

Ivanova, A. P.; Robaina, R. R.; Martín, J.; Stefanov, K. L. Effect of glycerol on the lipids in the red alga *Gratelupia doryphora*. **Grasas y Aceites**. v. 50, p. 469-471, 1999.

Knothe, G.; Sharp, C. A.; Ryan, T. W. Exhaust Emissions of Biodiesel, Petrodiesel, Neat Methyl Esters, and Alkanes in a New Technology Engine. **Energy & Fuels**. v. 20, p. 403-408, 2006.

Kothari, R.; Pathak, V. V.; Kumar, V.; Singh, D. P. Experimental study for growth potential of unicellular alga *Chlorella pyrenoidosa* on dairy waste water: An integrated approach for treatment and biofuel production. **Bioresource Technology**. v. 116, p. 466-470, 2012.

Lam, M. K.; Lee, K. T. Effect of carbon source towards the growth of *Chlorella vulgaris* for CO₂ bio-mitigation and biodiesel production. **International Journal of Greenhouse Gas Control**. v. 14, p. 169-176, 2013.

Lehr, F.; Posten, C. Closed photo-bioreactors as tools for biofuel production. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 20, p. 280-285, 2009.

Li, Y., Chen, Y.F.; Chen, P.; Min, M.; Zhou, W.; Martinez, B.; Zhu, J.; Ruan, R.. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. **Bioresource technology**. v. 102, p. 5138-5144, 2011.

Liu, J.; Huang, J; Sun, Z.; Zhong, Y.; Jiang, Y.; Chen, F. Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: Assessment of algal oils for biodiesel production. **Bioresource Technology**. v. 102, p. 106-110, 2011.

Lourenço, S. O. Cultivo De Microalgas Marinhas: Princípios E Aplicações. **São Paulo: Rima**, p. 588, 2006.

Lourenço, S.O., Barbarino, E., Lavín, P.L., Lanfer Marquez, U.M. and Aidar, E. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: Calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. **European Journal of Phycology**. v. 39, p. 17-32, 2004.

Ma, X.; Zheng, H.; Huang, H.; Liu, Y.; Ruan, R. Effects of Temperature and Substrate Concentration on Lipid Production by *Chlorella vulgaris* from Enzymatic Hidrolysates of Lipid-Extracted Microalgal Biomass Residues (LMBRs). **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 174, p. 1631-1650, 2014.

- Malis-Arad, S.; Friedlander, M.; Bem-Arie, R.; Richmond, A. E. Alkalinity-induced aggregation in *Chlorella vulgaris*. Changes in cell volume and cell-wall structure. **Plant Cell Physiol.** v. 21, p. 27-35, 1980.
- Marquez, F. J.; Sasaki, K.; Kakizono, T.; Nishio, N.; Nagai, S. Growth Characteristics of *Spirulina platensis* in Mixotrophic and Heterotrophic Conditions. **Journal of Fermentation and Bioengineering.** v. 76, p. 408-410, 1993.
- 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.
- Mayo, A. W. Effects of temperature and pH on the kinetic growth of unialga *Chlorella vulgaris* cultures containing bacteria. **Water Environment Reserch.** v. 69, p. 64-72, 1997.
- Mayo, A. W.; Noike, T. Response of mixed cultures of *Chlorella vulgaris* and heterotrophic bacteria to Variation of pH. **Wat. Sci. Tech.** v. 30, p. 285-294, 1994.
- Mezzomo, N.; Saggiorato, A. G.; Siebert, R.; Tatsch, P. O.; Lago, M. C.; Hemkemeier, M.; Costa, J. A. V.; Bertolin, T. E.; Colla, L. M. Cultivation of Microalgae *Spitulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** v. 30, p. 173-178, 2010.
- Miyawaki, B. Purifica de Biogás através de Cultivo de Microalgas em Resíduos Agroindustriais. **Dissertação (Mestre).** Universidade Federal do Paraná, p. 137, 2014.
- Moheimani, N. R. Long-term outdoor growth and lipid productivity of *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella tertiolecta* and *Chlorella* sp. (Chlorophyta) in bag photobioreactors. **J. Appl. Phycol.** v 25, p. 167-176, 2013.
- Morais, K. C. C.; Lemos, J. S.; Vargas, J. V. C.; Mariano, A. B. Cultivation of microalgae *Phaeodactylum tricorutum* in mixotrophic medium with photoperiod and addition of glycerol for obtain biolipids. **21st Brazilian Congress of Mechanical Engineering.** p. 24-28, 2011.
- Morais, M. C; Costa, J. A. V. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide **Energy Conversion and Management.** v. 48, p. 2169-2173, 2007.
- Naik, S. N.; Goud, V. V.; Rout, P. K.; Dalai, A. K. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews.** v. 14, p. 578-597, 2010.
- Nederlandse Norm. Norm 6520: Water Spectrophotometric Determination Of Chlorophyll A Content. **Delft: Nen.**, 1981.
- Nush, E. A. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. **Arch. Hydrobiol.** v. 14, p. 14-36, 1980.
- Ogbonna, J. C.; Tanaka, H. Night Biomass Loss and Changes in Biochemical Composition of Cells during Light/Dark Cyclic Culture of *Chlorella pyrenoidosa*. **Journal of Fermentation and Bioengineering.** v. 82, p. 558-564, 1996.

Paulo, V. P. F. Otimização da Produção de Açúcares por Microalgas para a Produção de Bioetanol. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Técnica de Lisboa. p. 116, 2011.

Phytoplankton Culture for Aquaculture Feed. Disponível em: <<http://www.thefishsite.com/articles/1581/phytoplankton-culture-for-aquaculture-feed>>. Acesso em: 17-10-2016.

POWER: NMSU explores algal biofuel production from wastewater. Disponível em: <<http://newscenter.nmsu.edu/Articles/view/9281/power-nmsu-explores-algal-biofuel-production-from-wastewater>>. Acesso em: 17-10-2016.

Radmann, E. M., Costa, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. **Quim. Nova**. v. 31, p 1609-1612, 2008.

Ras, M.; Lardon, L.; Bruno, S.; Bernet, N.; Steyer, J-P. Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 200–206, 2011

Redfield, A. C. The biological control of chemical factors in the environment. **American Scientist**. v. 46, p. 205-221, 1958.

Ren, X.; Chen, J.; Deschênes, J-S.; Tremblay, R.; Jolicoeur, M. Glucose feeding recalibrates carbon flux distribution and favours lipid accumulation in *Chlorella protothecoides* through cell energetic management. **Algal Research**. v. 14, p. 83–91, 2016.

Richmond, A. Handbook Of Microalgal Culture: Biotechnology And Applied Phycology. **Oxford: Blackwell Science**, p. 566, 2004.

Rockström, J., Steffen, W., Noone, K., Persson, Å., Chapin, F.S., Lambin, E.F., Lenton, T.M., Scheffer, M., Folke, C., Schellnhuber, H.J.; Nykvist, B. A safe operating space for humanity. **Nature**. v. 461, p. 472-475, 2009.

Rodjaroen, S.; Juntawong, N.; Mahakhant, A.; Miyamoto, K. High Biomass Production and Starch Accumulation in Native Green Algal Strains and Cyanobacterial Strains of Thailand. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)**. v. 41, p. 570-575, 2007.

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. **Tese (Doutorado)**. Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento – Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, p. 139, 2013.

Schoeller, H.: Les Eaux Souterraines. Hydrologie Dynamique Et Chimique, Recherche, Exploitation Et Évaluation Des Ressources. **Paris: Masson Et Cie, Éditeurs**, p. 642, 1962.

Sierra, E.; Acien, F. G.; Fernández, J. M.; García, J. L.; González, C.; Molina, E. Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae. **Chemical Engineering Journal**. v. 138, p. 136-147, 2008.

Sims, R. E. H; Mabee, W.; Saddler, J. N.; Taylor, M. An overview of second generation biofuel technologies. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 1570-1580, 2010.

Singh, A.; Olsen, S. I. A critical review of biochemical conversion, sustainability and life cycle assessment of algal biofuels. **Applied Energy**. v. 88, p. 3548-3555, 2011.

Stern, N.; Peters, S.; Bakhshi, V.; Bowen, A.; Cameron, C.; Catovsky, S.; Et Al. Stern Review: The Economics Of Change. Londres: **Hm Treasury**, p. 713, 2006.

Sun, N.; Wang, Y.; Li, Y-T.; Huang, J-C.; Chen, F. Sugar-based growth, astaxanthin accumulation and catotenogenic transcription of heterotrophic *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). **Process Biochemistry**. v 43, p. 1288-1292, 2008.

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, p. 3071-3076, 2011.

Tsukahara, K.; Sawayama, S. Liquid Fuel Production Using Microalgae. **Journal of the Japan Petroleum Institute**. v. 48, p. 251-259, 2005.

Tuantet, K.; Temmink, H.; Zeeman, G.; Janssen, M.; Wiffels, R. H.; Buisman, C. J. N. Nutrient removal and microalgal biomass production on urine in a short light-path photobioreactor. **Water Reserch**. v. 55, p. 162-174, 2014.

Wang, B.; Li, Y.; Wu, N.; Lan, C. Q. CO₂ bio-mitigation using microalgae. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 79, p. 707-718, 2008.

Wang, W.; Han, F.; Li, Y.; Wu, Y.; Wang, J.; Pan, R.; Shen, G. Medium screening and optimization for photoautotrophic culture of *Chlorella pyrenoidosa* with high lipid productivity indoors and outdoors. **Bioresource technology**. v. 170, p.395-403, 2014.

Weiland, P. Biogas production: current state and perspectives. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 85, p. 849-860, 2010.

Wong, Y. K.; Ho, K. C.; Tsang, Y. F.; Wang, L.; Yung, K. K. L. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in Column Photobioreactor for Biomass Production and Lipid Accumulation. **Water Environment Research**. v. 87, p. 40-6, 2016.

Xu, H.; Miao, X.; Wu, Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**. v. 126, p. 499–507, 2006.

Yan, C.; Muñoz, R.; Zhu, L.; Wang, Y. The effects of various LED (light emitting diode) lighting strategies on simultaneous biogas upgrading and biogas slurry nutrient reduction by using of microalgae *Chlorella* sp. **Energy**. v. 106, p. 554-561, 2016.

Yan, C.; Zheng, Z. Performance of photoperiod and light intensity on biogas upgrade and biogas effluent nutrient reduction by the microalgae *Chlorella* sp. **Bioresource Technology**. v. 139, p. 292-299, 2013.

Yang, I.S.; Salama, E.S.; Kim, J.O.; Govindwar, S.P.; Kurade, M.B.; Lee, M.; Roh, H.S.; Jeon, B.H. Cultivation and harvesting of microalgae in photobioreactor for biodiesel production and simultaneous nutrient removal. **Energy Conversion and Management**. v. 117, p.54-62, 2016.

Yun, Y. S.; Lee, S. B.; Park, J. M.; Lee, C. I; Yang, J. W. Carbon dioxide fixation by algal cultivation using wastewater nutrients. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 69, p. 451-455, 1997.

Zheng, Y.; Li, T.; Yu, X.; Bates, P. D.; Dong, T.; Chen, S. High-density fed-batch culture of a thermotolerant microalga *Chlorella sorokiniana* for biofuel production. **Applied Energy**. v. 108, p. 281-287, 2013.