Fernando Takashi Kanemoto

Otimização de sistema de cultivo de baixo custo de *Nannochloropsis gaditana* Lubián 1982 para produção de biodiesel

Dissertação apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa de Oceanografia, área de Oceanografia Biológica.

Orientadora: Profa. Dra. Sônia Maria Flores Gianesella

São Paulo

2012

Universidade de São Paulo

Instituto Oceanográfico

Otimização de sistema de cultivo de baixo custo de *Nannochloropsis gaditana* Lubián 1982 para produção de biodiesel

Fernando Takashi Kanemoto

Dissertação apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa de Oceanografia, área de Oceanografia Biológica.

Versão revisada

Julgada em ____/____/____

_____	_____
Prof(a). Dr(a).	Conceito
_____	_____
Prof(a). Dr(a).	Conceito
_____	_____
Prof(a). Dr(a).	Conceito

Sumário

Agradecimentos iii
Resumo iv
Abstract v
Lista de Figuras vi
Lista de Tabelas viii
1. Introdução 1
1.1 Histórico do desenvolvimento dos cultivos de microalgas para biocombustíveis 3
1.2 Desafios a serem superados 5
2. Sistemas de cultivo de microalgas 7
2.1 Cultivos fechados 7
2.2 Cultivos abertos 9
3. Otimização de cultivos de microalgas 12
3.1 Condições de cultivo 12
3.2 Otimização da utilização da luz 13
3.3 Ciclos de claro-escuro 14
3.4 Agitação do cultivo 16
4. Microalga: *Nannochloropsis gaditana* L.M.Lubián, 1982 18
5. Pergunta, Hipótese e Objetivos de trabalho 20
6. Materiais e métodos 21
6.1 Microrganismo e meio de cultivo 21
6.2 Desenho experimental do sistema de cultivo 22
6.3 Sistema termostatizado de circulação de água 27
6.4 Método de desinfecção da água do mar e dos tanques de cultivo 30
6.5 Escalonamento para início dos cultivos 30
6.6 Monitoramento dos cultivos 31
6.7 Determinação da densidade celular e da biomassa seca 32
6.8 Determinação da profundidade de penetração da luz 33
6.9 Determinação da concentração de clorofila-*a*, feopigmentos-*a* e carotenoides 34
6.10 Coleta e secagem da biomassa final 34
6.11 Extração e análise dos ácidos graxos 37
6.12 Determinação do poder calorífico superior da biomassa 37

6.13 Determinação da análise imediata e elementar da biomassa algácea 39
7. Resultados e Discussão 41
7.1 Efeitos da variação da profundidade de cultivo e de taxa de aeração na evolução da profundidade de penetração da luz 41
7.2 Respostas fisiológicas às condições de luminosidade 49
7.3 Parâmetros de cultivo: Oxigênio dissolvido e pH 52
7.4 Otimização do ciclo claro-escuro 55
7.5 Caracterização da biomassa 61
7.6 Teor e produtividade de lipídios totais e análise da composição dos ácidos graxos 63
8. Conclusões 67
9. Bibliografia 69

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Sônia Maria Flores Gianesella, à Bióloga Dra. Flávia Marisa Prado Saldanha-Corrêa e à Profa. Dra. Ana Maria Pereira Neto (UFABC) pelas orientações, por disponibilizarem a infraestrutura dos seus laboratórios para a realização deste trabalho, pelo auxílio nas análises, revisão dos trabalhos e principalmente pela amizade. Meu muito obrigado pelos ótimos momentos. Agradeço à Prof. Dra. Iolanda Cuccovia por disponibizar o seu laboratório para as análises de lipídios, à Profa. Dra. Patrícia Matai da Poli-USP por disponibilizar as bombas calorimétricas e à Profa. Dra. Vivian Pellizari por disponibilizar o kit de filtração e à Dra. Roseli Ferrari (ITAL-Campinas) pelas análises de lipídios. Agradeço, à professora Thaïs Navajas Corbisier pela disponibilização dos liofilizadores. Também agradeço aos técnicos Marta Stephan, Tomás Edison da Silva e aos funcionários da oficina e da biblioteca do IO pela ajuda e disposição de sempre. Agradeço ao IOUSP pelo suporte logístico e de infraestrutura. Agradeço à CNPq pela bolsa de mestrado concedida (116547/09) e à FAPESP pelos recursos do projeto (Processo n° 2010/50.187-1) que bancaram parte dos equipamentos utilizados neste trabalho, tornando viável a realização deste trabalho.

Agradeço aos meninos da Ecoreef (Miguel, Cozza e Keyma) pela amizade e ajuda com ideias sobre sistemas de cultivo (ainda vou cobrar todos os litros de cultivo que forneci aos seus rotíferos!!) e aos alunos da Profa. Dra. Ana Maria Pereira Neto da UFABC pelo inestimável apoio nas análises de lipídios, poder calorífico e análise imediata.

Um especial agradecimento à Karoline Magalhães Ferreira Lubiana, pelo amor e carinho demonstrados, por suportar minhas ausências prolongadas exigidas pelo meu trabalho e pela ajuda imprescindível para finalizar este documento. Amo você!

Por fim, agradeço aos meus pais e à minha irmã pela paciência, apoio e compreensão, pelo carinho e pelo exemplo de vida. Sem vocês não chegaria a lugar algum e espero não desapontá-los, nunca. Amo vocês demais.

Resumo

O desenvolvimento de fontes de energia renováveis tem se tornado cada vez mais necessário e, nesse contexto, os biocombustíveis têm um importante papel. Este trabalho teve como objetivo otimizar a produtividade de biomassa e de lipídios da microalga *Nannochloropsis gaditana*, em cultivos de baixo-custo visando à produção de biodiesel. Um sistema de cultivo foi concebido com materiais acessíveis e os experimentos testaram o efeito de diferentes exposições das células ao claro-escuro, sob irradiância de 800µE m^{-2} s^{-1}. Foram testadas três profundidades de cultivo (2, 4 e 8 cm) e duas taxas de aeração (0,25 e 1,00 L min^{-1} por L de cultivo). A penetração de luz nos cultivos e o rendimento de biomassa seca foram monitorados diariamente. Altos rendimentos de biomassa e lipídios foram alcançados. Os valores máximos foram observados no experimento com 4 cm de profundidade e maior taxa de aeração: 13,83 g m^{-2} d^{-1} de produtividade de biomassa e 20,50% de teor lipídico, resultando em uma produtividade lipídica de 2,84 g m^{-2} d^{-1}. Estes resultados indicam o potencial da utilização de *N. gaditana* para aplicação em cultivos de larga escala, uma vez que o rendimento lipídico observado foi superior ao da soja, principal matéria-prima vegetal para produção de biodiesel. O sistema de cultivo desenvolvido pode ser inserido em um processo de *scaling up* em cultivos abertos de grande escala.

Palavras-chave: *Nannochloropsis gaditana*, cultivo de baixo custo, produtividade de biomassa algácea, biodiesel, lipídios, taxa de aeração, fotoinibição, escalonamento de cultivos.

Abstract

The development of renewable energy sources has becoming an increasing necessity and, in this context, biofuels have an important role. This study aimed to optimize the productivity of biomass and lipids of the microalgae *Nannochloropsis gaditana* in a low-cost system, focusing biofuel production. A culture system was designed with low-cost and accessible materials and the experiments tested the effect of different degrees of exposition of cells to light-dark, under 800µE m^{-2} s^{-1} irradiance. Three different culture depths (2, 4 e 8 cm) and two aeration ratios (0.25 e 1.00 L min^{-1} per L of culture) were tested. Light penetration into the cultures and the dry biomass yield were monitored daily. High yields of biomass and lipids were attained in the experiment with 4 cm depth and the high aeration ratio: 13.83 g m^{-2} d^{-1} of biomass productivity and 20.50% lipid content, resulting in a lipid productivity of 2.84 g m^{-2} d^{-1}. These results indicate the potential of *N. gaditana* for application in large-scale cultivation, since its lipid yield is higher than the soybean, the main feedstock plant for biodiesel production. The culture system developed can be inserted in a process of biomass scaling up for large-scale open microalgae cultures.

Keywords: *Nannochloropsis gaditana*, low-cost culture, algal biomass productivity, biofuel, lipids, aeration ratio, photoinhibition, culture scale up

Lista de Figuras

Figura 1: Exemplos de sistemas de cultivo de microalga fechados. (A) Painéis de placas planas de acrílico na Universidade Estadual do Arizona (EUA), (B) Sacos plásticos transparentes na Alemanha, (C) Tubos horizontais na Austrália, (D) Tubos verticais na Holanda. 8
Figura 2: Exemplos de cultivos abertos de microalgas. (A) Empresa Seambiotic em Israel, (B) Empresa Earthrise na Califórnia, EUA, (C) Empresa Cyanotech no Havaí, (D) Empresa Sapphire no Novo Méxiso, EUA. 10
Figura 3: Sistema de cultivo de baixo custo desenvolvido. 22
Figura 4: Equipo de soro com injetor lateral adaptada na lateral dos cultivos para amostragem e adição de nutrientes. 23
Figura 5: Posicionamento das mangueiras de aeração e da pedra porosa (CO_2) no fundo do tanque. 24
Figura 6: Sistema de controle de injeção de CO_2 (válvula solenoide e temporizador). 25
Figura 7: Rotâmetro utilizado para o controle de fluxo de injeção de CO_2 nos cultivos. 25
Figura 8: Sistema de iluminação com lâmpadas halogênicas de 500 W. 27
Figura 9: Tanque de cultivo imerso em bandeja conectado a sistema termostatizado de circulação de água. 28
Figura 10: Sistema de circulação de água para controle da temperatura. (A) Cultivos imersos no banho de água termostatizado, (B) caixa térmica com bomba de água, (C) refrigerador de água. 29
Figura 11: Exemplo de sistema de sucção para retirada de amostras dos cultivos. 31
Figura 12: Sistema de filtração a vácuo utilizado para a coleta final dos cultivos. 35
Figura 13: Filtro de éster de celulose de 30 cm de diâmetro com biomassa final filtrada. 35
Figura 14: Raspagem do filtro para obtenção da biomassa final. 36
Figura 15: Biomassa final de Nannochloropsis gaditana liofilizada. 36
Figura 16: Desenho esquemático de uma bomba calorimétrica: A) corpo da bomba; B) cabeça da bomba; C) anel de viton; D) anel com rosca; E) eletrodo isolado da cabeça da bomba; F) eletrodo suporte ligado à cabeça da bomba; G) válvula de entrada do oxigênio; H) fio fusível; I) cadinho em aço inox; J) anel para suporte do cadinho; K) amostra. 38
Figura 17: Evolução da profundidade de penetração da luz estimada para os comprimentos de onda entre 400 e 700 nm ao longo dos dias de cultivo nos experimentos com 2 cm de profundidade e alta (2A) e baixa (2B) taxa de aeração. 43
Figura 18: Taxa de crescimento ao longo dos dias de cultivo dos experimentos com 2 cm de profundidade com alta (2A) e baixa (2B) taxa de aeração. 44
Figura 19: Evolução da profundidade de penetração da luz estimada para os comprimentos de onda entre 400 e 700 nm ao longo dos dias de cultivo nos experimentos com 4 cm de profundidade e alta (4A) e baixa (4B) taxa de aeração. 45
Figura 20: Taxa de crescimento ao longo dos dias de cultivo dos experimentos com 4 cm de profundidade com alta (4A) e baixa (4B) taxa de aeração. 46

Figura 21: Evolução da profundidade de penetração da luz estimada para os comprimentos de onda entre 400 e 700 nm ao longo dos dias de cultivo nos experimentos com 4 cm de profundidade e alta (4A) e baixa (4B) taxa de aeração. 47
Figura 22: Taxa de crescimento ao longo dos dias de cultivo dos experimentos com 8 cm de profundidade com alta (8A) e baixa (8B) taxa de aeração. 48
Figura 23: Médias diárias de concentração de clorofila-*a* ativa nas células para cada uma das profundidades estudadas (2, 4 e 8 cm). 49
Figura 24: Médias diárias dos valores da relação entre carotenoides/clorofila-*a* ativa para cada uma das profundidades estudadas (2, 4 e 8 cm). 50
Figura 25: Média dos pH dos cultivos no final do período iluminado. 53
Figura 26: Valores médios de oxigênio dissolvido no final do período iluminado, no momento da retirada das amostras..... 53
Figura 27: Evolução do número de células por volume nos experimentos ao longo do tempo. 57
Figura 28: Gráfico da produtividade de biomassa por área iluminada e por volume de cultivo dos experimentos com 2, 4 e 8 cm de profundidade e com taxas de aeração alta (2A, 4A e 8A) e baixa (2B, 4B e 8B). 58

Lista de Tabelas

Tabela 1: Comparação da produtividade de lipídios entre diferentes cultivos. 3
Tabela 2: Informações taxonômicas da microalga marinha *Nannochloropsis gaditana* 18
Tabela 3: Composição do meio Guillard f/2 modificado e concentração final de nutrientes no meio de cultivo. 21
Tabela 4: Desenho experimental: variação de profundidade, taxa de aeração, volume do tanque, vazão de ar e vazão de CO_2 para a produção de biomassa de *N. gaditana* (em triplicatas). 26
Tabela 5: Dados da diferença entre a biomassa seca final recuperada e a amostrada no último dia, demonstrando a quantidade de biomassa depositada no fundo. 61
Tabela 6: Composição elementar percentual média da biomassa 62
Tabela 7: Teor de cinzas da biomassa seca 63
Tabela 8: Valores de teor e produtividade por área de lipídios totais obtidos. 64
Tabela 9: Perfis de ácidos graxos extraídos da biomassa obtida de cada experimento (%).66

1. Introdução

Recentemente, a preocupação da humanidade com questões como o aumento da emissão de gases do efeito estufa (GEE) e a busca por um desenvolvimento socioeconômico sustentável têm trazido à tona a necessidade do desenvolvimento de fontes de energia renováveis capazes de substituir as fontes de origem fóssil, como o petróleo, carvão e gás natural (IPCC, 2007).

Além das questões ambientais, fatores como a concentração de grandes reservas de combustíveis fósseis em algumas regiões do planeta e o estilo de vida contemporâneo dependente por esse tipo de fonte energética, geram conflitos geopolíticos de tal magnitude que a segurança energética e o acesso a essas reservas passam a ser tratados com muita atenção por qualquer nação.

Para reduzir esses problemas, os biocombustíveis tornam-se uma das principais alternativas, uma vez que reduzem as emissões de GEE, são renováveis e sua produção pode ser desenvolvida em diversas partes do globo, permitindo uma distribuição e acesso mais igualitários.

Segundo relatório publicado pelo Painel Intergovernamental sobre Mudança do Clima - IPCC (CHUM *et al*., 2011), a biomassa é, atualmente, a única fonte renovável capaz de fornecer combustíveis líquidos de elevada intensidade energética, como o bioetanol (de cana-de-açúcar ou de milho) e o biodiesel (a partir de óleo de soja, de dendê, de canola, etc.), capazes de substituir os derivados de petróleo utilizados para transporte em veículos, caminhões, trens, navios e aviões (este último, no caso do uso do bioquerosene).

Contudo, a produção dos biocombustíveis apresenta alguns pontos críticos como a necessidade de vastas áreas de terras agriculturáveis, podendo acarretar também mudanças

diretas ou indiretas no uso da terra (CHUM *et al*., 2011), além da necessidade de água doce limpa em abundância para sua irrigação.

Portanto, há uma significativa necessidade por novas alternativas de biomassa renovável que tenham como principais características: o desenvolvimento de cultivos de maneira a não competir com a produção de alimentos, não necessitar de vastas áreas de solo fértil e não demandar grandes volumes de água doce e limpa.

Diante desse panorama, as microalgas ganham destaque como uma possível fonte de matéria-prima para a produção de biocombustíveis, uma vez que diversas espécies de microalgas são capazes de acumular lipídios em seu interior, os quais podem ser extraídos e convertidos a biodiesel, por exemplo.

Somando-se à síntese e acúmulo de lipídios, de acordo com o relatório do Departamento de Energia dos Estados Unidos (FISHMAN *et al*., 2010), é possível destacar outras vantagens dos cultivos de microalgas:

- Elevada produtividade de biomassa por área cultivada;
- Minimização da competição por áreas agriculturáveis, pois podem ser cultivadas em áreas degradadas;
- Possibilidade de utilização de efluentes industriais e domésticos, água salobra ou salgada, reduzindo a demanda por água doce;
- Capacidade de utilização de emissões de gás carbônico de fontes fixas, tais como usinas de energia (termelétricas, por exemplo) ou de indústrias (como de siderúrgicas ou produtoras de cimento) para aumentar a velocidade de crescimento da biomassa; e
- A biomassa de microalgas pode ser integrada ao conceito de biorrefinaria (produção de diferentes biocombustíveis e coprodutos de alto valor agregado).

Segundo este mesmo relatório, certas espécies de microalgas possuem o potencial anual de produção de lipídios mais de 100 vezes maior que a produtividade da soja e até 10 vezes mais que o óleo de palma, conforme exemplificado na tabela 1.

Tabela 1: Comparação da produtividade de lipídios entre diferentes cultivos.

Cultivo	Produtividade anual de lipídios (L ha^{-1} ano^{-1})
Soja	456
Girassol	969
Palma	6033
Microalgas	9500 - 61750

Adaptado de Fishman *et al*. (2010).

1.1 Histórico do desenvolvimento dos cultivos de microalgas para biocombustíveis

O desenvolvimento de estudos sobre o potencial de utilização das microalgas como fonte de lipídios remonta à década de 1940. Inclusive, diversos relatos durante 1950 e 1960 já indicavam a indução de acúmulo de óleo em microalgas quando submetidas a determinadas condições de cultivo (FISHMAN *et al*., 2010).

Contudo, apenas a partir das súbitas elevações do preço do petróleo em decorrência das restrições na sua oferta por parte dos países produtores após a Segunda Guerra Mundial, o conceito de utilização dos lipídios produzidos por microalgas como fonte de matéria-prima para a obtenção de biodiesel passou a ser investigado com mais atenção, principalmente em países como os Estados Unidos.

Entre os anos de 1978 e 1996, o Departamento de Energia dos Estados Unidos organizou e financiou o *Aquatic Species Program*, com o intuito de aprofundar as pesquisas na produção de biocombustíveis a partir de microalgas, focando inicialmente na

produção de hidrogênio, mas concentrando esforços, a partir de 1980, na obtenção de lipídios de microalgas para a produção de biodiesel (SHEEHAN *et at.*, 1998).

Ao longo deste programa de pesquisa, mais de 3000 cepas de microalgas foram isoladas dos mais diversos ambientes aquáticos dos EUA e estudadas quanto à tolerância a variações de salinidade, pH, temperatura e também quanto à produção de lipídios. Tal programa resultou na identificação de cerca de 300 cepas com potencial para a produção de biocombustíveis, sendo a maioria delas clorofíceas e diatomáceas.

Sheehan *et al*. (1998) ao revisarem mais de uma centena de relatórios frutos do *Aquatic Species Program*, afirmaram que muitos avanços foram alcançados, principalmente no que tange ao isolamento e caracterização de cepas de microalgas com potencial para fins energéticos, ampliando o conhecimento sobre a fisiologia e bioquímica de microalgas e dos processos de manejo e escalonamento dos cultivos.

Durante o desenvolvimento do programa de pesquisa citado acima também foram realizadas análises técnico-econômicas mais detalhadas sobre as necessidades e disponibilidades de insumos e recursos naturais necessários para atender cultivos de microalgas em grande escala nos EUA (WEISSMAN *et al*., 1989; MAXWELL *et al*., 1985).

Apesar de o programa ter demonstrado com sucesso a viabilidade técnica do uso de cultivos de microalgas para a obtenção de biocombustíveis (SHEEHAN *et al.*, 1998), o contexto econômico deste período fez com que o custo de produção de lipídios de microalgas estimado naquela época entre US$ 59 a 186 o barril, não fosse competitivo em relação aos patamares do preço do barril de petróleo, que era comercializado a menos de US$ 20/barril, em 1995.

Atualmente, o preço do petróleo oscila em torno de US$ 100,00 o barril, fazendo com que o Departamento de Energia (DOE) dos Estados Unidos invista recursos

consideráveis em projetos de pesquisa de microalgas para produção de biocombustíveis. É possível destacar, também, recorrentes parcerias entre o DOE e o Departamento de Defesa dos EUA em projetos de pesquisa de microalgas, especificamente voltados para a produção de bioquerosene de aviação. Outro aspecto a ser ressaltado é a participação crescente da iniciativa privada no financiamento dessas atividades (SHEEHAN *et al*., 1998; FISHMAN *et al*., 2010).

1.2 Desafios a serem superados

Mesmo sendo viável tecnicamente, segundo o relatório do DOE dos EUA (FISHMAN *et al*., 2010), a produção de microalgas para fins energéticos ainda precisa superar diversos obstáculos para se tornar economicamente viável. Dessa forma, é fundamental o desenvolvimento de sistemas de cultivo de baixo custo, visto que combustíveis são produtos de baixo valor agregado.

Ao traçarmos um paralelo entre os cultivos de oleaginosas utilizadas atualmente para a produção de biodiesel e os cultivos de microalgas, é possível destacar que as plantas cultivadas na agricultura tradicional foram domesticadas e selecionadas geneticamente pelo homem durante centenas de anos de manejo. Sendo assim, o cultivo de plantas em lavouras é tecnicamente viável e produz, em grande escala, matéria prima para os biocombustíveis de primeira geração (etanol através da fermentação da cana-de-açúcar ou do milho; biodiesel proveniente de óleo de soja, por exemplo).

Por outro lado, o cultivo de microalgas em grande escala ainda é muito recente na história da civilização humana, fazendo com que ainda sejam necessários avanços de técnicas de cultivo, domesticação e melhoramento genético dos organismos para que a produção de biomassa microalgácea atinja menores custos de produção.

Uma característica que coloca as microalgas em posição privilegiada em relação às plantas, é que o seu tempo de geração é muito inferior, permitindo, dessa forma, a evolução de linhagens mais adaptadas às condições necessárias de forma muito mais rápida.

Fishman *et al*. (2010) levantaram alguns pontos a serem investigados e os principais são elencados a seguir:

- Estudos e elaboração de banco de dados sobre identificação e caracterização de cepas de microalgas;
- Compreensão das rotas metabólicas precursoras das substâncias com fins energéticos (por exemplo, lipídios para biodiesel);
- Desenvolvimento de sistemas de cultivo de baixo custo que permitam a produção estável e robusta de biomassa de microalgas em escala comercial;
- Otimização dos cultivos para maximizar a produtividade de lipídios, no caso da produção de biodiesel, por exemplo, mantendo a sustentabilidade no uso da terra, água e nutrientes;
- Desenvolvimento de métodos que minimizem os custos energéticos, custos de implementação e operação nos processos de coleta da biomassa;
- Estudos sobre aprimoramento dos processos de extração de lipídios, conversão em biocombustível e aproveitamento de co-produtos; e
- Progresso de técnicas que permitam a reciclagem ao longo de toda cadeia produtiva para maximizar os recursos disponíveis.

Este trabalho baseia-se no estudo de alguns dos pontos acima elencados, com foco no desenvolvimento e otimização de um sistema de cultivo de microalgas de baixo custo, que permita atingir produtividades elevadas de biomassa e lipídios.

2. Sistemas de cultivo de microalgas

As microalgas podem ser cultivadas em sistemas de cultivo fotoautotrófico ou heterotrófico, dependendo da espécie escolhida. No primeiro caso as microalgas necessitam de luz e CO_2 para a realização da fotossíntese, enquanto que no segundo sistema, elas podem ser cultivadas no escuro, com uma fonte de carbono orgânico, como alguns tipos de açúcares (LOURENÇO, 2006).

Os sistemas heterotróficos podem se valer dos avanços obtidos da indústria de fermentação que já produz biocombustíveis em escala comercial, como o bioetanol de cana-de-açúcar ou milho. Entretanto, esse sistema de cultivo depende de fontes de açúcares provenientes da produção primária de outros cultivos.

Essa dependência por açúcares de outras fontes pode ser um ponto fraco desse sistema, pois pode gerar problemas como competição por terras férteis, água limpa e produção de alimentos, os mesmos observados na produção dos biocombustíveis de primeira geração (LI *et al*., 2007).

Já com relação aos sistemas fotoautotróficos, estes podem ser divididos, de uma maneira geral, em dois tipos: cultivos fechados ou abertos. Cada um deles possui vantagens e desvantagens, que serão abordados mais detalhadamente a seguir.

2.1 Cultivos fechados

Os cultivos fechados são sistemas de crescimento de microalgas que permitem maior controle de alguns dos parâmetros do cultivo. Geralmente são construídos de maneira a minimizar o contato do cultivo com o ambiente externo, podendo utilizar tubos (rígidos ou flexíveis) ou placas planas de material transparente como plástico, acrílico ou vidro (figura 1), podendo ser posicionados na horizontal, vertical, inclinados ou em serpentina (XU *et al.*, 2009, TREDICI, 2004).

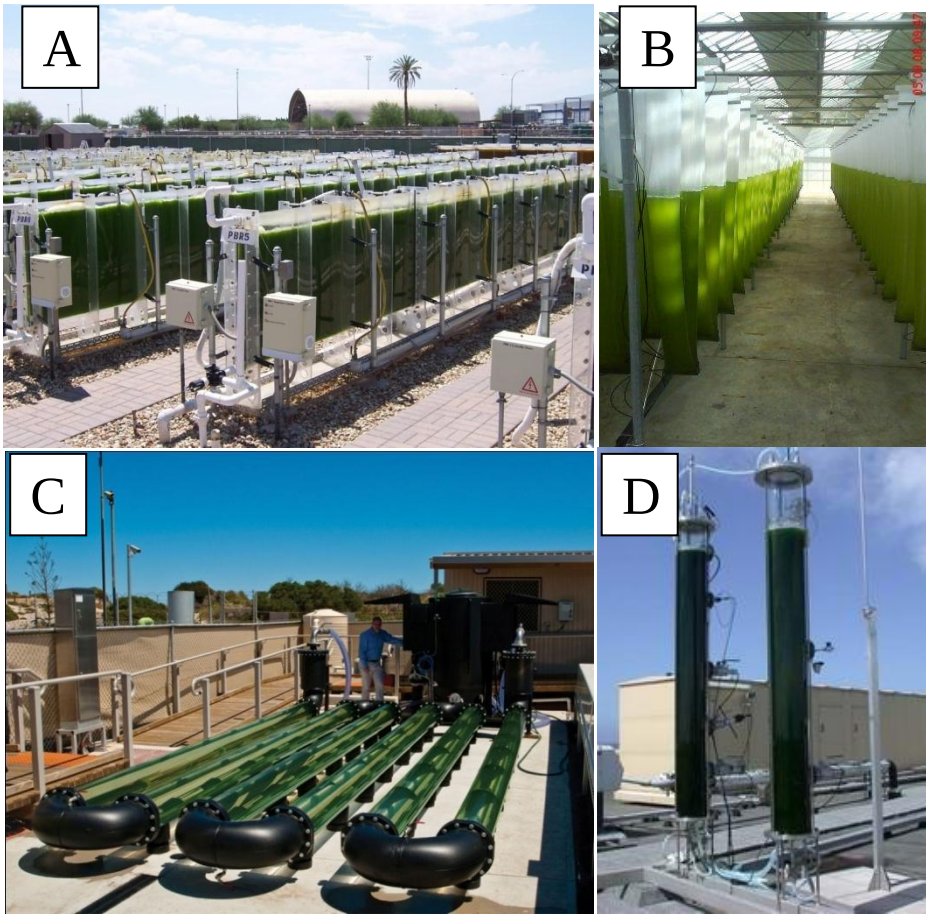

Figura 1: Exemplos de sistemas de cultivo de microalga fechados. (A) Painéis de placas planas de acrílico na Universidade Estadual do Arizona (EUA)[1], (B) Sacos plásticos transparentes na Alemanha[2], (C) Tubos horizontais na Austrália[3], (D) Tubos verticais na Holanda[4].

Esses sistemas apresentam certas vantagens (FISHMAN *et al*., 2010; LOURENÇO, 2006; TREDICI, 2007), como:

- Redução do risco de contaminação dos cultivos por outros micro-organismos;
- Maior controle sobre a taxa de evaporação da água do meio de cultivo, gerando maior controle da salinidade; e
- Capacidade de atingir uma maior densidade de biomassa, devido à sua maior relação superfície/volume, reduzindo a quantidade de água que deve ser processada, diminuindo custos de bombeamento e de separação da biomassa.

[1] Disponível em: <http://asulightworks.com/blog/azcati-update-plastic-film-vs-acrylic-photobioreactors>
[2] Disponível em: <http://www.engineeringnews.co.za/article/algae-biofuel-project-for-africa-kicks-off-in-eastern-cape-2009-03-20>
[3] Disponível em: <http://www.ncrisbiofuels.org/facilities>
[4] Disponível em: <http://www.ncrisbiofuels.org/facilities>

Contudo, segundo Schenk *et al*. (2008) os sistemas fechados tendem a apresentar as seguintes desvantagens:

- Maiores custos com a agitação do cultivo;
- Necessidade de grande quantidade de água para o controle de temperatura do cultivo através de borrifos na superfície dos tubos ou placas;
- Dificuldade para otimização das trocas gasosas, gerando, principalmente, elevadas concentrações de oxigênio dissolvido, que pode inibir a fotossíntese; e
- Custo elevado para construir e operar o sistema.

2.2 Cultivos abertos

Atualmente os sistemas de cultivo abertos são os mais utilizados nas produções em escala comercial de microalgas, que são voltadas basicamente para atender as demandas da indústria nutracêutica, a qual se interessa por compostos como proteínas, ácidos graxos poli-insaturados, antioxidantes e pigmentos naturais (CONVERTI *et al*., 2009, LOURENÇO, 2006).

Em geral os cultivos abertos são sistemas do tipo *raceway*, que consiste em pistas com, no máximo, 30 cm de profundidade. Estas podem ser escavadas ou construídas em alvenaria, geralmente revestidas por mantas plásticas ou tinta epóxi, onde o cultivo circula percorrendo uma volta fechada impulsionada por pás rotativas (figura 2).

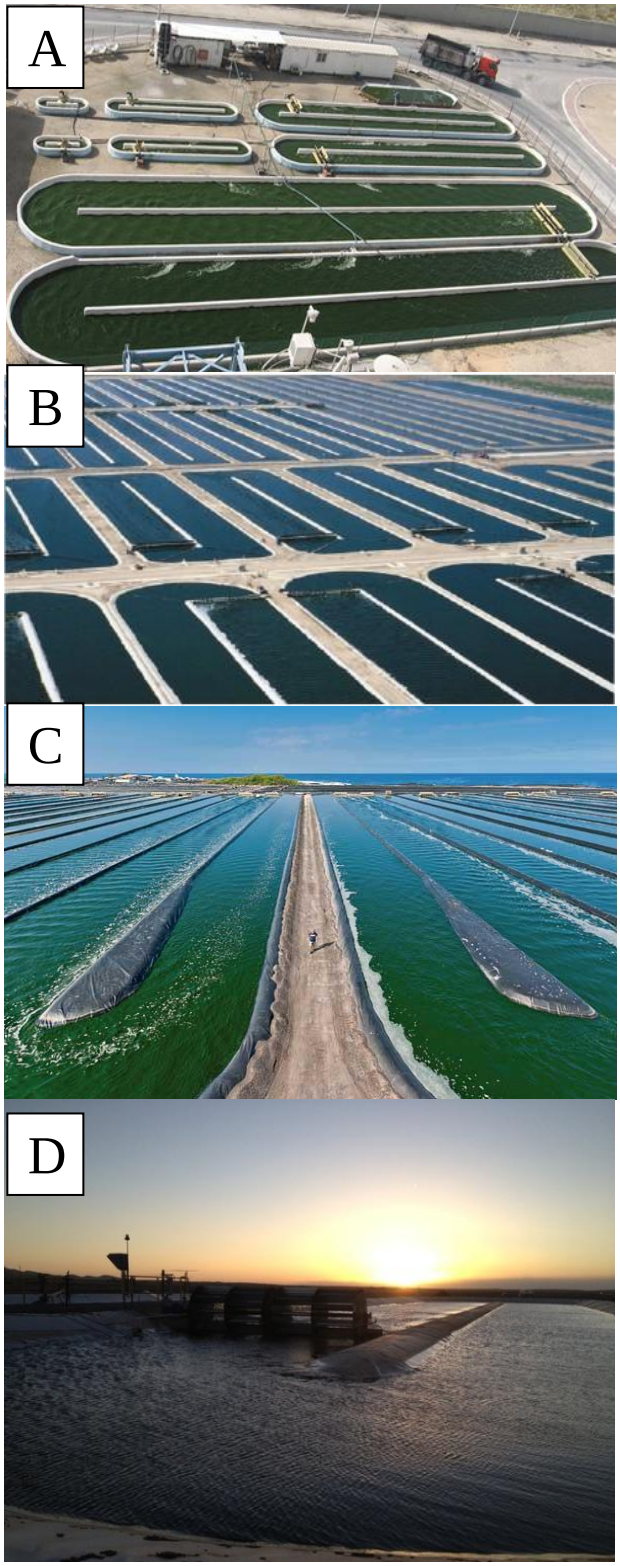

Figura 2: Exemplos de cultivos abertos de microalgas. (A) Empresa Seambiotic em Israel[5], (B) Empresa Earthrise na Califórnia, EUA[6], (C) Empresa Cyanotech no Havaí[7], (D) Empresa Sapphire no Novo Méxiso, EUA[8].

[5] Disponível em: <http://www.seambiotic.com/>
[6] Disponível em: <http://www.earthrise.com/>
[7] Disponível em: <http://www.cyanotech.com/>

Este tipo de sistema de cultivo, quando comparado aos sistemas fechados, apresenta maior facilidade no aumento de escala, pois são relativamente mais simples de serem construídos e operados, apresentando custos mais baixos de construção e manutenção. Outra vantagem se daria pela exigência de menos energia para agitar e movimentar os cultivos.

Contudo, por terem grandes áreas diretamente expostas ao ambiente, são mais suscetíveis à ocorrência de contaminação por outros microrganismos do que nos sistemas fechados, sendo mais difícil a manutenção de culturas monoalgais, além de estarem mais sujeitos a variações de temperatura, salinidade e pluviosidade. Devido a estas características alcançam densidades de biomassa menores em relação aos sistemas fechados.

[8] Disponível em: <http://www.sapphireenergy.com/news-media/multimedia/>

3. Otimização de cultivos de microalgas

3.1 Condições de cultivo

Para que os cultivos de microalgas se tornem viáveis para a obtenção de produtos de baixo valor agregado, os custos devem ser minimizados e, portanto, fatores como o emprego de materiais de baixo custo na construção dos tanques de cultivo, o uso eficiente da luz solar para a iluminação dos cultivos fotoautotróficos e utilização de tanques abertos com condições de cultivo menos controladas são alguns pontos importantes para se garantir a viabilidade da produção de microalgas.

Como os atuais cultivos comerciais de microalgas, com o intuito de garantir baixos custos de produção, empregam o sistema de cultivo aberto com a utilização direta da luz solar (SCHENK *et al.*, 2008), a localização geográfica dos cultivos é de fundamental importância, de maneira que a disponibilidade de luz ao longo do ano e as condições ambientais sejam as melhores possíveis para maximizar o crescimento da biomassa.

Segundo Azevedo *et al.* (2008), a região Nordeste do Brasil, por exemplo, tem como características uma elevada irradiância solar média anual, baixa variação da temperatura ao longo do dia e do ano e disponibilidade de terras não agricultáveis. Assim, essa região apresenta grande potencial para ser utilizada no desenvolvimento de cultivos de microalgas em grande escala.

Considerando a baixa variabilidade encontrada na região nordeste brasileiro, seja da radiação solar incidente (1.058 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$), quanto da temperatura do ar ($28^{o}C$) (RIFFEL, 2005), estes parâmetros podem ser fixados como condições pré-estabelecidas em estudos de otimização de cultivos de microalgas em escala laboratorial, já que seriam as encontradas no caso de cultivos realizados nessa região do Brasil.

Com relação à geometria do sistema de cultivo, os sistemas abertos do tipo *raceway* são considerados os que apresentam melhor custo-benefício, devido aos baixos custos de

construção, manutenção e operação. Contudo, a produtividade de biomassa obtida é considerada baixa, o que viabiliza seu uso principalmente para a obtenção de produtos com alto valor agregado, que devem ser obtidos em cultivos com baixa contaminação (SCHENK *et al.* 2008).

Portanto, é necessário o aprimoramento desse sistema de cultivo de maneira que os seus custos de implementação e operação continuem baixos e a sua produtividade seja melhorada. Uma das principais dificuldades dos sistemas abertos é a facilidade de contaminação por outros micro-organismos, o desenvolvimento de um sistema que minimize este entrave sem elevar os custos demasiadamente pode gerar avanços na produtividade de biomassa.

3.2 Otimização da utilização da luz

Visando alcançar elevada produtividade de biomassa por área iluminada, ambos os sistemas de cultivo fotoautotrófico de microalgas, seja aberto ou fechado, necessitam garantir adequada exposição de cada célula à luz, de maneira a reduzir os efeitos causados pela fotossaturação ou fotoinibição no desenvolvimento do cultivo (FISHMAN *et al.*, 2010).

Segundo Richmond (2004), uma vez mantidas as condições nutricionais e ambientais (como temperatura, pH, oxigênio dissolvido e salinidade, por exemplo) próximas às consideradas ideais para o cultivo, a luz passa a ser o fator limitante da produção de biomassa e o seu uso eficiente passa a ser necessário para garantir melhores resultados na produção de biomassa.

Todavia, a utilização eficiente da luz pelas microalgas está associada a alguns pontos importantes, como a atenuação exponencial da luz ao passar pelo cultivo. Este comportamento da luz está diretamente relacionado com a concentração de biomassa

(efeito de autossombreamento), que irá determinar a profundidade máxima na qual a luz penetra na coluna d'água.

Nos cultivos com densidade elevada duas camadas podem surgir, são elas: a camada superficial iluminada, na qual as células realizam a fotossíntese, e uma camada escura junto ao fundo do cultivo, na qual a intensidade de luz encontra-se abaixo do ponto de compensação e a fotossíntese líquida é negativa (RICHMOND, 2004). Altas intensidades de luz podem causar fotossaturação e baixas intensidades podem reduzir a eficiência fotossintetizante. Nestes dois casos, pode ocorrer uma redução na produtividade de biomassa.

Quanto maior a concentração de biomassa e quanto maior a profundidade do cultivo, maiores são as dificuldades para fornecer uma distribuição mais balanceada da luz para cada uma das células. Portanto, é impreterível o desenvolvimento de um sistema de cultivo que possibilite um ciclo de permanência de cada uma das células na camada iluminada e na camada escura, de tal forma que minimize os efeitos da exposição a períodos longos em cada uma dessas camadas do cultivo (BITOG *et al.*, 2011; RICHMOND, 2004).

3.3 Ciclos de claro-escuro

Como a intensidade de luz em um dia de céu aberto pode chegar a ser até uma ordem de grandeza maior que o nível de saturação fotossintética, esse excesso de luz pode causar fotossaturação, inibindo o crescimento celular (ZOU & RICHMOND, 1999).

Uma das maneiras de se reduzir este efeito é com o aumento da densidade de biomassa, que faz com que o autossombreamento resulte no acesso intermitente das células à elevada intensidade luminosa, reduzindo as chances de ocorrer a fotossaturação. Este processo de exposição à luz intermitente está relacionado com a frequência com que cada

célula se posiciona na região iluminada e não iluminada de um cultivo, também chamada de frequência de claro-escuro.

Uma característica dos cultivos massivos de microalgas é que, nestes casos, a luz penetra em apenas uma pequena fração do volume do reator. Portanto, em um determinado período de tempo, a maioria das células estará na região não iluminada do cultivo.

Para um determinado caminho óptico, ou profundidade de cultivo, considerando sistemas horizontais, a fração do volume de cultivo que está no escuro é uma função da intensidade luminosa incidente na superfície e da densidade de biomassa. O comprimento do caminho óptico afeta a frequência claro-escuro, que é resultado da movimentação das células entrando e saindo do volume iluminado do cultivo (RICHMOND & CHENG-WU, 2001; GITELSON *et al*., 1996).

Quanto menor o caminho óptico, maior a frequência de claro-escuro, o que, de maneira geral, acelera a taxa de fotossíntese (RICHMOND, 2004). Na densidade celular ótima (ou seja, a que resulta na maior produtividade por área iluminada) as células são expostas a flashes de curtos períodos na região iluminada seguidas por períodos relativamente mais longos no escuro. Quanto maior a frequência claro-escuro, maior a eficiência na utilização da luz para a fotossíntese (BITOG *et al.*, 2011; GITELSON *et al.*, 1996; DOUCHA & LÍVANSKÝ, 2009; RICHMOND & CHENG-WU, 2001).

Portanto, a redução do caminho óptico aumenta a frequência do ciclo claro-escuro, resultando num aumento significativo da produção por área iluminada. Como a densidade celular ótima (DCO, $g.L^{-1}$) é inversamente proporcional ao caminho óptico, cultivos com menores profundidades expostos a altas taxas de intensidade luminosa**,** permitem a manutenção de culturas com concentração celular maiores.

O que ocorre nestes casos é que, para cada célula a alta intensidade de luz é diluída e, portanto, a quantidade de luz que cada uma delas recebe não é mais função apenas da

intensidade da luz incidente, mas também da densidade celular, pois esta última modifica a maneira pela qual a luz é disponibilizada dentro do cultivo.

A produtividade é uma função tanto da taxa de crescimento quanto da densidade celular, sendo assim, a maior produtividade por área iluminada pode ser alcançada através da manutenção do cultivo em uma densidade celular ótima que é espécie específica e é necessária para que a luz seja explorada da maneira mais eficiente.

3.4 Agitação do cultivo

Outro fator que afeta a maneira com a qual cada célula, em média, recebe a energia luminosa é a mistura do cultivo, que deve ser realizada de forma a distribuir equitativamente a energia luminosa através do aumento da frequência do ciclo claro-escuro, além de também aumentar a taxa de difusão entre as células, facilitando as trocas gasosas e o acesso aos nutrientes dissolvidos no meio (RICHMOND, 2004).

Outro parâmetro para o qual a eficiência da mistura pode ser preponderante é a taxa de oxigênio dissolvido nos cultivos de microalgas. Em cultivos cuja taxa de mistura não é adequada, elevadas concentrações de oxigênio dissolvido podem ocorrer inibindo a fotossíntese. Uma maior turbulência no fluxo dos cultivos gera uma maior volatilização do oxigênio produzido pelas algas durante a fotossíntese, reduzindo sua concentração no meio de cultivo, o que permite atingir concentrações maiores de biomassa (DOUCHA & LÍVANSKÝ, 2009).

Considerando que os principais fatores que influenciam o crescimento de microalgas podem ser estabelecidos e controlados próximo aos ideais, o principal fator a ser estudado é a eficiência com a qual os sistemas de cultivo convertem energia luminosa em química (biomassa), ou seja, como cada célula recebe e utiliza a luz solar (RICHMOND *et al.*, 2003).

Portanto, é impreterível o desenvolvimento de um sistema de cultivo que possibilite um ciclo de permanência de cada uma das células na camada iluminada e na camada escura (ciclo luz/escuro) de forma a minimizar os efeitos da exposição a períodos longos em cada uma das camadas do cultivo (RICHMOND, 2004). Este desenho é obtido através da introdução de sistemas capazes de promover a agitação e mistura adequada ao cultivo e a otimização da profundidade da lâmina d´água.

Dessa forma, este trabalho baseou-se em estudar a otimização da produção de biomassa algácea de cultivos horizontais (como os do tipo *raceway*) através da determinação da profundidade ótima como um dos principais parâmetros de cultivo a ser avaliado. A geometria do sistema de cultivo desenvolvido neste estudo remete a um sistema de cultivo fechado, mas com similaridades de um sistema *open-pond*, visando obter menores custos de construção dos tanques e maior controle dos parâmetros de cultivo.

4. Microalga: *Nannochloropsis gaditana* L.M.Lubián, 1982

O gênero *Nannochloropsis* D. J. Hibberd, 1981 é composto atualmente por seis espécies reconhecidas (Guiry e Guiry, 2012) e apresenta organismos unicelulares, eurihalinos, predominantemente planctônicas e de tamanho entre 2 a 32 μm de diâmetro. Possui apenas clorofila-*a* e seu principal carotenoide é a violaxantina, pigmento acessório na captação de luz e que oferece fotoproteção à célula (OWENS et al. 1987).

As algas desse gênero são muito utilizadas na aquicultura (Lourenço, 2006), pois apresentam alta velocidade de crescimento e possuem alto teor de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), o que as torna um produto de apreciável valor nutricional.

As informações taxonômicas da espécie *Nannochloropsis gaditana* são apresentadas na tabela 2, segundo Guiry e Guiry (2012).

Tabela 2: Informações taxonômicas da microalga marinha *Nannochloropsis gaditana*

Reino	Chromista
Filo	Ochrophyta
Classe	Eustigmatophyceae
Ordem	Eustigmatales
Família	Monodopsidaceae
Publicação Original	L. M. Lubián, 1982

Rodolfi *et al.* (2009) e Converti *et al*. (2009) após estudarem mais de 30 clones de diversas espécies de microalgas seja com relação à sua produtividade, seja pelo conteúdo lipídico, concluíram que a cepas do gênero *Nannochloropsis* spp. foram as que apresentaram melhor desempenho, apresentando, também, uma capacidade de aumento na produtividade de lipídios sob condições de depleção de nitrogênio.

Além disso, as microalgas desse gênero podem apresentar entre 10 a 60% de teor de lipídios totais em relação à biomassa seca (CHISTI, 2007). Segundo Fábregas *et al.* (2004), um dos principais ácidos graxos produzidos por esse gênero é o EPA, ácido eicosapentanóico (20:5 n-3) podendo alcançar teores entre 8,02 a 28,9% do total de ácidos graxos, dependendo das condições de cultivo, tais como diferentes intensidades de luz em sistema de cultivo semicontínuo.

Além disso, este gênero pode chegar a concentrações elevadas de biomassa, alcançando valores de produtividade de biomassa seca livre de cinzas de até 22 $g.m^{-2}.dia^{-1}$, segundo Zou e Richmond (1999), em fotobiorreator de placas planas.

Pal *et al*. (2011) apontam as microalgas do gênero *Nannochloropsis* como promissoras para a produção comercial seja de biodiesel, seja de compostos de alto valor agregado como os AGPIs.

Especificamente, a microalga *Nannochloropsis gaditana* apresenta elevados teores de ácidos graxos monossaturados e saturados, podendo alcançar quantidades de até 30% de ácidos palmítico (16:0) e palmitoleico (16:1), além de cerca de 17% de EPA (20:5 n-3) em relação aos ácidos graxos totais (CARRERO *et al.*, 2011).

Em decorrência dessas características, a microalga *Nannochloropsis gaditana* foi utilizada como espécie alvo deste trabalho, pois além de sua indicação para um possível uso na produção de biodiesel, também se encontrava facilmente disponível no acervo do Banco de Microrganismos Marinhos do Instituto Oceanográfico da USP, onde já era possível observar seu bom potencial de crescimento da biomassa.

5. Pergunta, Hipótese e Objetivos de trabalho

Com base no exposto, a pergunta que vem à tona para este trabalho foi:

A produtividade de biomassa e de lipídios da espécie *Nannochloropsis gaditana* podem ser aprimoradas através da variação da profundidade e da taxa de aeração em sistema de cultivo de microalgas de baixo custo?

A hipótese é de que, variando-se as condições de frequência de claro-escuro através de variações nas profundidades de cultivo e taxas de aeração é possível maximizar a produtividade de biomassa e de lipídeos de *Nannochloropsis gaditana.*

Portanto, o principal objetivo do trabalho foi:

- Desenvolver um sistema otimizado de cultivo de baixo-custo para a espécie alvo;

Os objetivos específicos para se atingir o objetivo principal incluíram:

- Desenvolver um sistema de cultivo de baixo custo que evite a contaminação das células.
- Determinar a profundidade de cultivo e a taxa de aeração que otimizarão a produtividade de biomassa e de lipídeos;
- Determinar o teor de lipídios totais e o perfil de ácidos graxos da microalga estudada;
- Caracterizar a biomassa obtida com relação ao seu potencial de utilização como biocombustível.

6. Materiais e métodos

6.1 Microrganismo e meio de cultivo

A cepa utilizada neste estudo foi da microalga *Nannochloropsis gaditana* (Eustigmatophyceae), clone CA-1, trazida de Cádiz, Espanha em 15/12/1993 e mantida no Banco de Microrganismos Marinhos do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (BMM).

O meio de cultivo utilizado foi o Guillard f/2 (GUILLARD & HITTER, 1962), que foi modificado para o uso sem silicato e com o dobro da concentração original utilizando reagentes químicos grau P.A. (tabela 3).

A água do mar utilizada foi coletada ao largo da base de estudos do IO-USP em Ubatuba/SP, com salinidade de 28 ± 2. Com o intuito de evitar a depleção de nutrientes para que o principal limitante de crescimento fosse a frequência de claro-escuro, os experimentos foram conduzidos num sistema de batelada alimentada através da injeção de nutrientes nos cultivos a cada dois dias.

Tabela 3: Composição do meio Guillard f/2 modificado e concentração final de nutrientes no meio de cultivo.

Solução (volume final no cultivo)	Reagente	Concentração da solução estoque	Concentração final no cultivo
Nitrato (2 mL)	$NaNO_3$	75 $g.L^{-1}$	150 $mg.L^{-1}$
Fosfato (2 mL)	$NaH_2PO_4.H_2O$	5 $g.L^{-1}$	10 $mg.L^{-1}$
Metais-traço (2 mL)	$CuSO_4.5H_2O$	9,8 $mg.L^{-1}$	19,6 $\mu g.L^{-1}$
	$ZnSO_4.7H_2O$	22,2 $mg.L^{-1}$	44,4 $\mu g.L^{-1}$
	$CoCl_2.6H_2O$	10 $mg.L^{-1}$	20 $\mu g.L^{-1}$
	$MnCl_2.4H_2O$	180 $mg.L^{-1}$	360 $\mu g.L^{-1}$
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	6,3 $mg.L^{-1}$	12,6$\mu g.L^{-1}$
	$FeCl_3.6H_2O$	3,15 $g.L^{-1}$	6,3 $mg.L^{-1}$
	Na_2EDTA	4,36 $g.L^{-1}$	8,72 $mg.L^{-1}$
Vitaminas (2 mL)	Tiamina (B_1)	100 $mg.L^{-1}$	200 $\mu g.L^{-1}$
	Cianocobalamina (B_{12})	0,5 $mg.L^{-1}$	1 $\mu g.L^{-1}$
	Biotina (B_7)	0,5 $mg.L^{-1}$	1 $\mu g.L^{-1}$

6.2 Desenho experimental do sistema de cultivo

Os cultivos foram realizados em bandejas de plástico com 34 cm de comprimento e 22 cm de largura (figura 3), em triplicata. Para simular diferentes caminhos óticos, as profundidades dos cultivos foram de 2, 4 e 8 cm, correspondendo a volumes de cultivo de 1,5, 3,0 e 6,0 L, respectivamente.

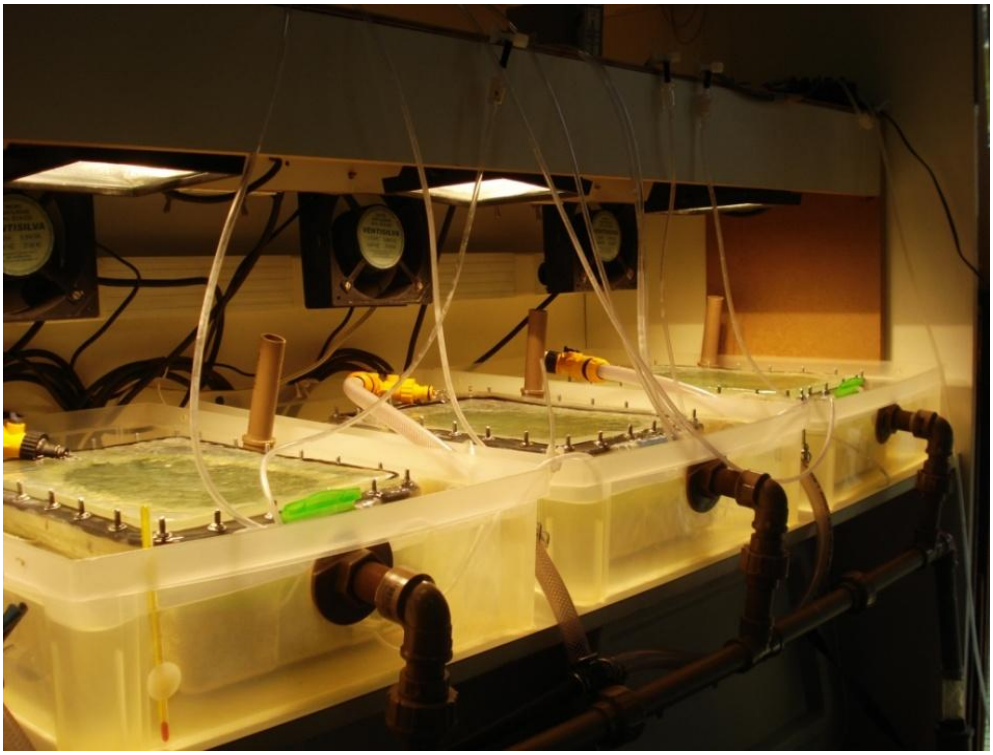

Figura 3: Sistema de cultivo de baixo custo desenvolvido.

Os tanques de cultivo foram recobertos com filme plástico PVC transparente de 1 mm de espessura preso às bordas com parafusos e posicionado de maneira a se apoiar na superfície do meio de cultivo. Com a circulação de água à temperatura de 28 (±2)°C sobre os cultivos foi possível realizar o controle de temperatura e, consequentemente, a redução do efeito de aquecimento ocasionado pelo sistema de iluminação dos cultivos.

Cada tanque possuía um respiro confeccionado com canos de PVC para a saída de ar e também como ponto de acesso ao interior dos cultivos para amostragem e adição de

nutrientes, as quais foram realizadas com auxílio de uma mangueira de silicone com adaptação de um equipo para soro com injetor lateral (figura 4).

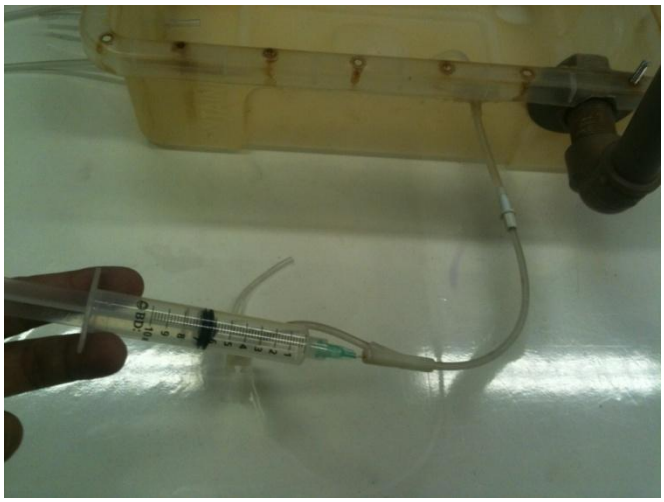

Figura 4: Equipo de soro com injetor lateral adaptada na lateral dos cultivos para amostragem e adição de nutrientes.

A agitação dos cultivos foi realizada através de introdução de ar comprimido distribuído por microfuros em duas mangueiras de borracha, posicionadas paralelamente no fundo dos tanques (figura 5).

Figura 5: Posicionamento das mangueiras de aeração e da pedra porosa (CO_2) no fundo do tanque.

As taxas de borbulhamento variaram proporcionalmente de acordo como o volume de cultivo:

- **0,25 L.minuto^{-1} por litro de cultivo:** baixa taxa de borbulhamento;
- **1,00 L.minuto^{-1} por litro de cultivo:** alta taxa de borbulhamento.

Para se evitar uma eventual limitação de carbono disponível para o desenvolvimento dos cultivos, além do borbulhamento de ar comprimido, também foi introduzido CO_2 por meio de pedra porosa posicionada no fundo dos tanques entre as mangueiras de aeração.

A injeção do CO_2 foi controlada por uma válvula solenoide com temporizador programado para acioná-la em sincronia com o período iluminado (figura 6). As taxas de injeção de CO_2 foram de 0,015, 0,030 e 0,060 L.min^{-1}, controladas por um rotâmetro (figura 7) para os respectivos volumes de cultivo 1,5, 3,0 e 6,0 L, com o intuito de manter a mesma quantidade de CO_2 disponibilizada por litro de cultivo (0,01 L de CO_2.min^{-1}).

Figura 6: Sistema de controle de injeção de CO_2 (válvula solenoide e temporizador).

Figura 7: Rotâmetro utilizado para o controle de fluxo de injeção de CO_2 nos cultivos.

A produção de biomassa de *N. gaditana* foi realizada para diferentes profundidades, taxa de aeração, volume do tanque, vazão de ar e vazão de CO_2, como especificado na tabela 4.

Tabela 4: Desenho experimental: variação de profundidade, taxa de aeração, volume do tanque, vazão de ar e vazão de CO_2 para a produção de biomassa de *N. gaditana* (em triplicatas).

Experimento	Profundidade (cm)	Taxa de aeração por litro de cultivo ($L.min^{-1}$)	Volume do tanque (L)	Vazão de CO_2 ($L.min^{-1}$)
2A	2	1,00	1,5	0,015
2B	2	0,25	1,5	0,015
4A	4	1,00	3,0	0,030
4B	4	0,25	3,0	0,030
8A	8	1,00	6,0	0,060
8B	8	0,25	6,0	0,060

A iluminação dos experimentos foi realizada através da utilização de lâmpadas halogênicas de 500 W acomodadas dentro de refletores posicionados 30 cm acima da superfície dos cultivos. A irradiância média foi de 800 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$, a qual foi medida na superfície dos cultivos com auxílio de quantameter (QSL-100, *Biospherical Instruments Inc.*), com fotoperíodo de 12h de claro e 12 h de escuro (figura 8).

Também foram instalados ventiladores perpendicularmente ao sentido da iluminação para favorecer a circulação de ar e reduzir o feito de aquecimento dos cultivos.

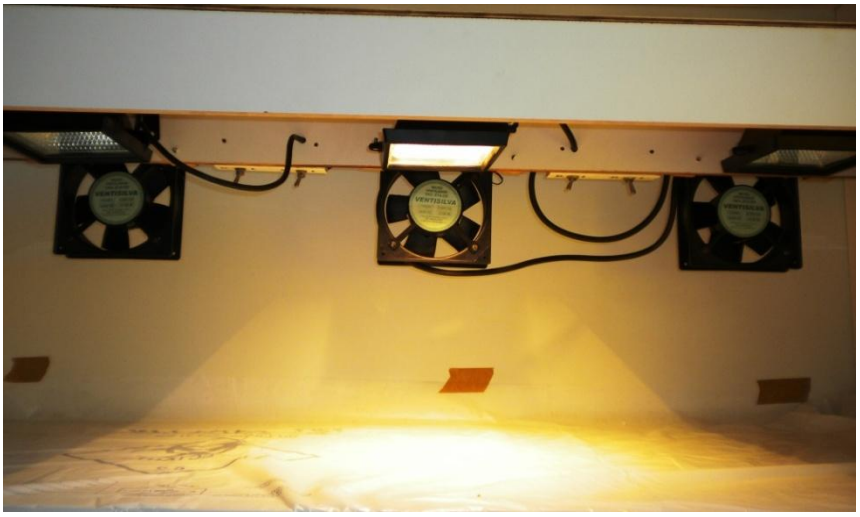

Figura 8: Sistema de iluminação com lâmpadas halogênicas de 500 W.

6.3 Sistema termostatizado de circulação de água

A temperatura dos cultivos foi mantida próxima às observadas na região nordeste brasileiro em torno de 28 ± 2°C a partir da associação do sistema de ventilação e um banho termostatizado de água.

Cada tanque de cultivo ficou imerso em uma bandeja de plástico de 60 x 40 x 12 cm (C x L x A), conectada a um sistema termostatizado de circulação contínua de água doce (figura 9).

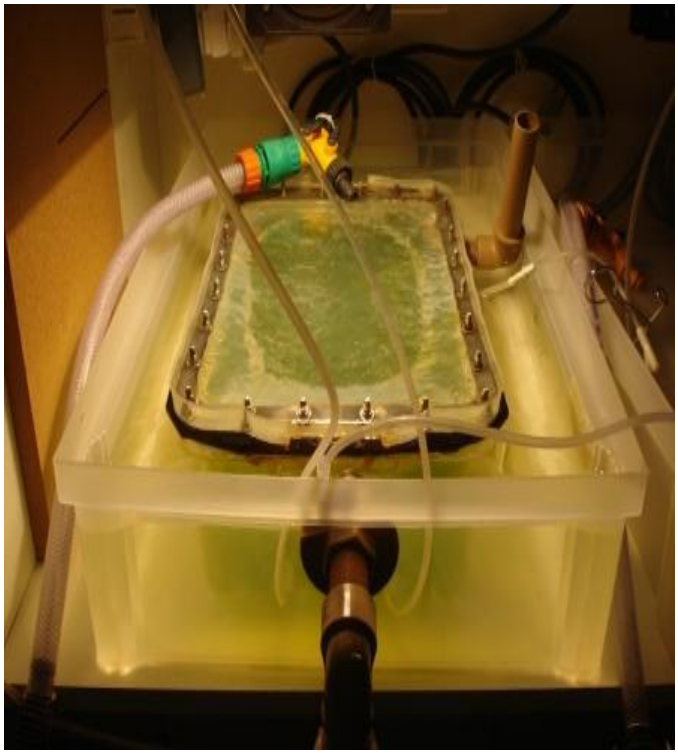

Figura 9: Tanque de cultivo imerso em bandeja conectado a sistema termostatizado de circulação de água.

Esse sistema de circulação de água consistiu de uma bomba de água localizada dentro de uma caixa térmica, onde também foi posicionado um aquecedor de aquário com controle de temperatura. A água da caixa térmica era bombeada através de um refrigerador de água utilizado em sistema de aquário.

Então, a água resfriada era enviada aos três conjuntos de cultivo com o ponto de entrada acima do plástico transparente utilizado para cobrir o tanque de cultivo para forçá-lo a permanecer em contato com o cultivo e auxiliar na manutenção da temperatura do sistema. Após passar pelos tanques de cultivo, a água voltava para a caixa térmica por gravidade (figura 10).

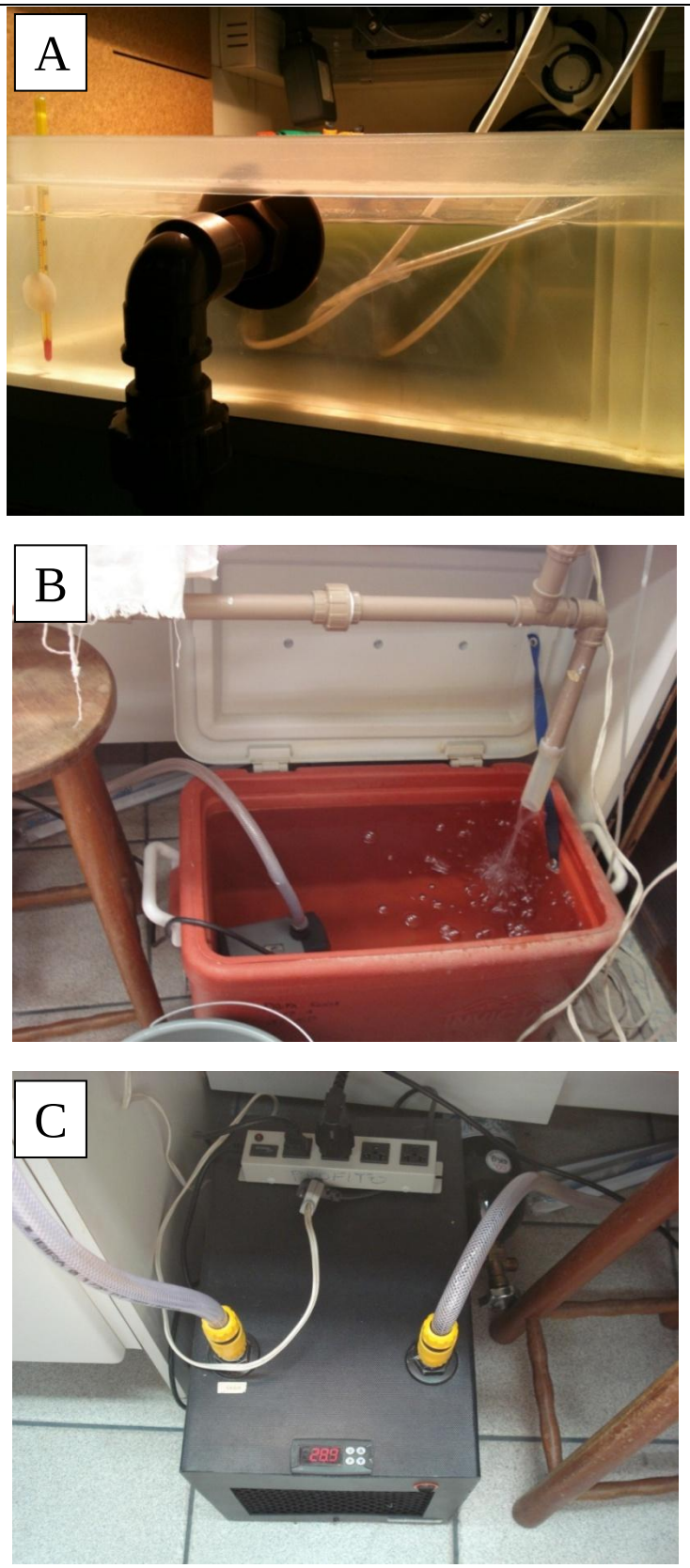

Figura 10: Sistema de circulação de água para controle da temperatura. (A) Cultivos imersos no banho de água termostatizado, (B) caixa térmica com bomba de água, (C) refrigerador de água.

6.4 Método de desinfecção da água do mar e dos tanques de cultivo

Inicialmente, a água do mar coletada foi pré-filtrada em filtro qualitativo e desinfetada através da adição de 1 mL de solução de hipoclorito de sódio (12% de cloro ativo) para cada 20 L de água do mar. Posteriormente, manteve-se em repouso no escuro por 12 h, seguido de 2 horas de aeração para a remoção do cloro residual antes da sua inoculação, conforme método descrito por Moheimani & Borowitzka (2006).

Previamente ao processo de inoculação, os tanques foram desinfetados com solução de hipoclorito de sódio comercial (2 a 3% de cloro ativo). Nesse processo, todo o material foi lavado e, após duas horas de contato, os tanques foram enxaguados com água destilada. O mesmo procedimento foi realizado com o filme transparente de recobrimento, assim como as mangueiras de borracha com microfuros para a agitação do meio de cultivo. Já as pedras porosas eram mantidas em hipoclorito de sódio comercial e, previamente à sua utilização (pelo menos 12 h), foram ligadas a um sistema de aeração e imersas em água destilada para a remoção do agente desinfetante.

6.5 Escalonamento para início dos cultivos

Os cultivos foram iniciados a partir da cepa de *N. gaditana* mantida no BMM, da qual uma pequena alíquota foi inoculada em erlenmeyer de 100 mL, cujo conteúdo, após aproximadamente 7 dias de crescimento, foi transferido para um erlenmeyer de 500 mL, a partir do qual todos os inóculos utilizados nos experimentos foram originados, funcionando como cultivo estoque.

Com o intuito de aclimatar as células às condições experimentais, os inóculos utilizados neste trabalho foram iniciados com a transferência de 300 mL do cultivo estoque a um tanque de 6 L (igual ao utilizado nos experimentos) e mantido nas mesmas condições

experimentais. Após a retirada da alíquota do cultivo estoque para o tanque, o seu volume foi completado até os 500 mL iniciais para sua manutenção até o próximo experimento.

O cultivo de aclimatação foi monitorado por meio da contagem diária do número células para que a inoculação dos experimentos fosse realizada com densidade inicial de $10x10^6$ células por mL. Todos os experimentos foram conduzidos até que a fase estacionária fosse atingida. A cultura estoque apresentava concentração de cerca de $100x10^6$ células por mL.

6.6 Monitoramento dos cultivos

O monitoramento dos cultivos foi feito a partir de amostragens diárias, no final do período iluminado. Cerca de 100 mL da cultura eram retirados através de um sistema de sucção (figura 11) adaptável ao recipiente de amostragem acoplado ao ponto de acesso posicionado no centro dos tanques. As amostras coletadas foram utilizadas para a determinação da densidade celular, das concentrações de clorofila-*a*, feopigmentos-*a*, carotenoides, pH, oxigênio dissolvido e o coeficiente de extinção da luz.

Figura 11: Exemplo de sistema de sucção para retirada de amostras dos cultivos.

Assim que a amostra era coletada, 80 mL eram separados para a imediata determinação da concentração de oxigênio dissolvido, através de sonda polarográfica com sensor de temperatura acoplado (Lutron DO-5519), 10 mL utilizados para as leituras de

pH, através de eletrodo de bancada (Metrohm 827) e 10 mL para a leitura *in vivo* no espectrofotômetro (Hitachi U 2900) para a determinação do coeficiente de extinção da luz.

A própria amostra utilizada para a obtenção dos dados de concentração de oxigênio dissolvido foi em seguida utilizada na determinação da biomassa seca e dos pigmentos fotossintetizantes. Já a amostra utilizada para a leitura de pH foi fixada em solução de Lugol (200 µL de lugol/100mL de amostra) para posterior contagem do número de células.

6.7 Determinação da densidade celular e da biomassa seca

A contagem do número de células foi feita a partir das amostras (5 a 10 mL) previamente fixadas com Lugol e analisadas em microscópio óptico (Olympus CBA), em câmaras tipo hemocitômetros (Fuchs Rosenthal, Mallassez e Thoma), cuja seleção foi feita de acordo com a densidade celular da amostra. A contagem foi realizada para um mínimo de 400 células, em réplicas, para uma melhor precisão dos dados (precisão de +/- 10%), de acordo com Lund *et. al.* (1958).

A biomassa seca diária foi estimada a partir da filtração de 5 a 10 mL da amostra em filtro GF/F Milipore® (poro 0,45 µm). Estes filtros foram previamente secos em estufa a 60°C por 24 horas, colocados em dessecador com sílica-gel até atingir a temperatura ambiente e em seguida pesados.

Após a filtração do cultivo, os filtros foram lavados com uma solução de formiato de amônio (0,65M) para a remoção dos sais aderidos à biomassa e então foram secas em estufa a 60°C por 24 horas, resfriados em dessecador com sílica gel até a temperatura ambiente e em seguida pesados, sendo a biomassa determinada por diferença gravimétrica (ZHU & LEE, 1997).

6.8 Determinação da profundidade de penetração da luz

A profundidade de penetração da luz foi estimada com base na adaptação da metodologia utilizada por Richmond et al. (1996) e Doucha & Lívanský (2009). A transmitância das amostras retiradas dos cultivos foi obtida em espectrofotômetro para os comprimentos de onda entre 400 a 750 nm em cubeta de vidro de quartzo de 1 cm de caminho óptico e utilizada para determinar o coeficiente de extinção da luz para cada comprimento de onda com base na aplicação da equação da Lei de Beer-Lambert.

$$I_z = I_0 e^{-kz} \qquad (1)$$

Onde I_z é a intensidade de luz na profundidade z, I_0 a intensidade de luz incidente e k o coeficiente de extinção da luz.

Sendo $T = I_z/I_0$ e $z = 1$ cm (caminho óptico da cubeta de quartzo utilizada nas análises), o coeficiente de extinção k (cm^{-1}) pode ser calculado rearranjando a equação da seguinte forma:

$$k = \ln(1/T) \qquad (2)$$

Com base no coeficiente de extinção (k) calculado para cada comprimento de onda e considerando como profundidade de penetração da luz (z_i, cm) o conceito da zona eufótica, onde a intensidade da luz corresponde a 1% da incidente na superfície do cultivo, da equação 1 temos que:

$$z_i = \ln(1/0{,}01)/\mathrm{k} \qquad (3)$$

6.9 Determinação da concentração de clorofila-*a*, feopigmentos-*a* e carotenoides

A amostra para quantificação dos pigmentos fotossintéticos foi obtida através da filtração a vácuo em filtro AP-40 Millipore® (SALDANHA-CORRÊA *et al*,. 2004) de 10 mL do cultivo. Os filtros contendo a biomassa fresca foram colocados em tubos de 15 mL e armazenados a -20°C e ao abrigo da luz.

A extração e medida das concentrações dos pigmentos foram determinadas de acordo com método tricromático proposto por Jeffrey & Humphrey (1975) para as concentrações de clorofila-*a*, Lorenzen (1967) para feopigmentos-*a* e Parsons *et al*. (1984) para os carotenoides.

O processo de extração dos pigmentos foi realizado através da adição de 10 mL de acetona 90% (v/v) ao tubo contendo o filtro com a biomassa seca. Posteriormente, foi realizada a maceração do filtro com auxílio de um bastão de vidro e armazenamento por um período de 24h, a -20°C e ao abrigo da luz para a completa extração dos pigmentos.

Em seguida, a amostra foi centrifugada a 2.000 rpm, durante 15 minutos e o sobrenadante foi removido para análise em espectrofotômetro (Hitachi U 2900), utilizando cubetas de vidro de quartzo com 5 cm de caminho óptico e a absorbância foi medida nos comprimentos de onda: 750, 665, 645, 630, 510 e 480 nm.

Para a determinação dos feopigmentos, três gotas de HCl 0,3 M foram adicionados para acidificação da amostra e novamente analisou-se em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 750 e 665 nm.

6.10 Coleta e secagem da biomassa final

A coleta final da biomassa foi realizada através da retirada dos tanques do banho de água termostatizado, remoção do plástico transparente e homogeneização do cultivo, de maneira a ressuspender a biomassa depositada no fundo do tanque.

Em seguida, alíquotas de 500 mL eram introduzidas em sistema de filtração a vácuo (figura 12) utilizando filtros de éster de celulose de 30 cm de diâmetro (figura 13), até que pelo menos 1,5 L de cada tanque fossem filtrados. Os filtros com a biomassa foram lavados com solução de formiato de amônio (0,65M) para a remoção do sal residual e a biomassa foi raspada (figura 14), acondicionada em tubos de centrifugação de 100 mL e imediatamente congelada a -20°C em freezer.

Figura 12: Sistema de filtração a vácuo utilizado para a coleta final dos cultivos.

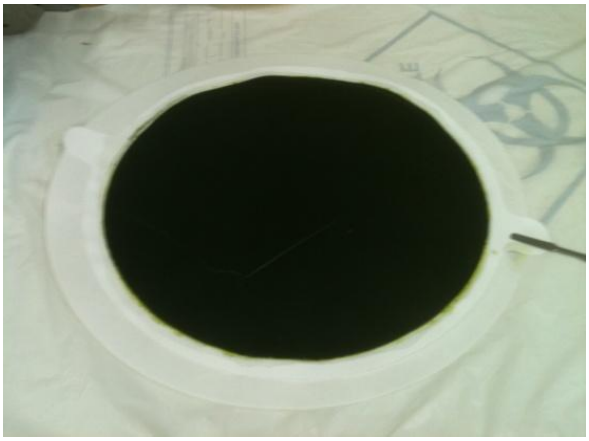

Figura 13: Filtro de éster de celulose de 30 cm de diâmetro com biomassa final filtrada.

Figura 14: Raspagem do filtro para obtenção da biomassa final.

A secagem das amostras foi realizada através do processo de liofilização por pelo menos 24h. Após a secagem, a massa final (figura 15) foi quantificada através de pesagem em balança analítica e acondicionada em tubos criogênicos, devidamente vedados e acondicionadas em freezer para as futuras análises.

Figura 15: Biomassa final de Nannochloropsis gaditana liofilizada.

6.11 Extração e análise dos ácidos graxos

Tanto o processo de extração quanto de análise dos ácidos graxos foram realizados sob supervisão da pesquisadora Dra. Roseli Ferrari no Instituto de Tecnologia e Alimentos de Campinas (ITAL). O método de extração utilizado foi o método Bligh & Dyer (1959), que utiliza uma mistura de clorofórmio, metanol e água para a formação e separação de fases, sendo que a fase clorofórmica é a que contém os lipídios.

A análise da composição de ácidos graxos dos óleos obtidos na extração foi realizada com base na metodologia de obtenção de metil ésteres de ácidos graxos proposto por Hartman & Lago (1973) utilizando a técnica de cromatografia gasosa acoplado a um espectrômetro de massa com base nas metodologias indicadas pela American Oil Chemists Society (AOCS, 2009a; AOCS, 2009b).

6.12 Determinação do poder calorífico superior da biomassa

O poder calorífico superior (PCS) foi determinado em parceria com a professora Dra. Patrícia Matai do Departamento de Engenharia Química da Poli-USP utilizando-se bombas calorimétricas seguindo a metodologia ASTM D 2015 (2000). O PCS corresponde à energia liberada na forma de calor considerando também o calor de condensação da água formada no processo de combustão da biomassa.

A bomba calorimétrica utilizada (Figura 16) consiste em um recipiente de aço inoxidável, de paredes resistentes e tampa rosqueável. Na tampa existem válvulas para entrada de O_2 e para saída dos gases após a queima, além de eletrodos para o circuito elétrico e acionamento do processo de combustão.

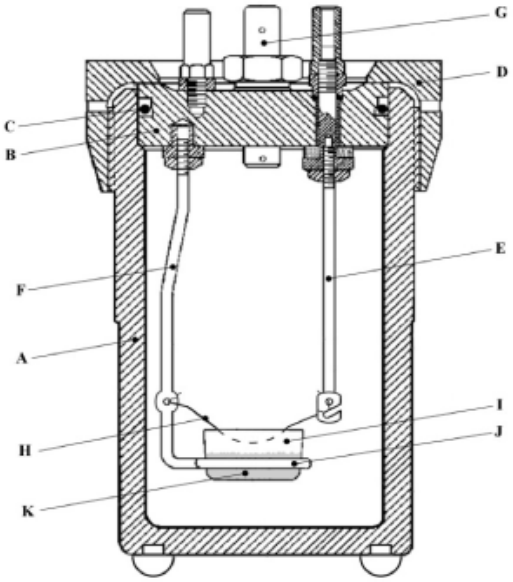

Figura 16: Desenho esquemático de uma bomba calorimétrica: A) corpo da bomba; B) cabeça da bomba; C) anel de viton; D) anel com rosca; E) eletrodo isolado da cabeça da bomba; F) eletrodo suporte ligado à cabeça da bomba; G) válvula de entrada do oxigênio; H) fio fusível; I) cadinho em aço inox; J) anel para suporte do cadinho; K) amostra.

Após pesagem da biomassa algácea em cadinho de aço inox, foram cortados 10 cm de fio de ferro, que foi colocado em contato com a amostra, a qual se encontrava suspensa no recipiente da bomba calorimétrica, como ilustrado na Figura 16. As extremidades do fio de ferro foram conectadas às hastes de suporte do cadinho. Antes de fechar o recipiente com a amostra, adicionou-se 1 mL de água para solubilização dos gases de combustão.

Em seguida, a bomba calorimétrica foi pressurizada (30 atm.), fechando a saída de gases e ligando a válvula de admissão ao cilindro de oxigênio sob pressão. O cilindro foi fechado e desligado da bomba.

Mergulhou-se a bomba no recipiente calorimétrico contendo 2 L de água destilada, conectaram-se os eletrodos e, após o fechamento da tampa, acionou-se o agitador e inseriu-se o termômetro (resolução de 0,02°C).

Após aguardar 5 minutos para a termostatização do sistema, os valores de temperatura foram lidos de minuto em minuto durante 5 minutos e, então, efetuou-se a ignição do sistema. Em seguida, efetuaram-se as leituras aos 45, 60, 75, 90, 105 e 120

segundos após a ignição, utilizando um cronômetro digital. Finalmente, as medições foram feitas de minuto em minuto, até que a temperatura permanecesse constante.

Para a determinação do poder calorífico superior ($MJ.kg^{-1}$) a volume constante utilizou-se a equação:

$$PCS = \frac{C.\Delta T - e}{m}$$

onde,

- C: capacidade calorífica do calorímetro (cal/°C);
- ΔT: diferença de temperatura (°C);
- e: calor de combustão do fio de ferro (e = mFe x PCFe; onde: mFe = 0,007 g de ferro; PCFe = 1600 cal/g);
- m: massa do combustível (g).

6.13 Determinação da análise imediata e elementar da biomassa algácea

A análise imediata, para a determinação dos teores de cinzas, carbono fixo e voláteis, foi realizada em parceria com a professora Dra. Ana Maria Pereira Neto da Universidade Federal do ABC através da incineração da biomassa seca em um forno mufla de acordo com as metodologias ASTM. D 1102 (1982) e ASTM. E 872 (1982).

Inicialmente, foram pesados os cadinhos de porcelana contendo a biomassa liofilizada a ser analisada. O forno mufla foi programado para atingir a temperatura de 950°C, quando então os cadinhos com as amostras de biomassa algácea foram colocados por 3 minutos. Os cadinhos então foram retirados, acondicionados em dessecador até atingir a temperatura ambiente.

Após isto, foram pesados, para a determinação da quantidade substâncias voláteis pela diferença entre as massas inicial e final. Em seguida, a temperatura foi reprogramada para 750°C e as amostras introduzidas novamente por um período de 6 horas, após o qual foram retiradas e armazenadas em dessecador até atingir a temperatura ambiente. Posteriormente, os cadinhos foram pesados para a determinação do teor de cinzas. A diferença de massa em relação ao valor inicial corresponde ao teor de carbono fixo.

A análise elementar da biomassa seca, isto é, a avaliação dos teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio, foi efetuada de acordo com Demirbas (2009) utilizando um analisador elementar CHN 2400 (PerkinElmer) na Central Analítica do IQ-USP.

7. Resultados e Discussão

Para se obter um volume razoável de biomassa algácea que permitisse a análise dos lipídeos e outra variáveis de interesse para a produção de biodiesel, e, ao mesmo tempo, o experimento ocupasse apenas o espaço disponível no laboratório, pensou-se inicialmente em recriar as condições de um sistema de cultivo fechado em pequena escala, isto é, realizar os experimentos em bandejas de modo a se ter uma grande superfície de exposição à luz em relação ao volume total de cultivo.

O filme plástico permitiu que se colocasse uma lâmina de água circulando sobre o cultivo, de modo a impedir o aquecimento excessivo do cultivo. A utilização deste sistema também minimizou a penetração de luz UV, as possibilidades de contaminação dos cultivos e reduziu as taxas de evaporação, fazendo com que fossem dispensados ajustes de manutenção da salinidade, ao contrário do que tradicionalmente ocorre em cultivos abertos.

7.1 Efeitos da variação da profundidade de cultivo e de taxa de aeração na evolução da profundidade de penetração da luz

7.1.1 Experimentos com 2 cm de profundidade

Nos experimentos com 2cm de profundidade no meio de cultura (cultivos 2A e 2B) é possível observar (figura 17) que, entre a inoculação (dia 0) e o primeiro dia dos experimentos há um aumento na profundidade iluminada do cultivo.

Este aumento decorreu de uma redução na densidade celular na fase *lag* de crescimento (figura 18), em função da alta exposição à luz em toda a coluna de água pela pequena profundidade. Os cultivos para os inóculos estavam sendo mantidos sob a mesma

iluminação experimental, mas a concentração de células na cultura estoque apresentava concentração cerca de 10 vezes maior que a inicial do experimento.

Em decorrência disso, as células na cultura estoque já se encontravam em condição de autossombreamento, e passaram a ser expostas diretamente à uma iluminação de 800 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ (medida na superfície dos cultivos) quando diluídas cerca de 10 vezes para a condição inicial do experimento. Essa situação pode levar a um processo de fotoinibição da fotossíntese ou mesmo fotooxidação da clorofila em função da exposição excessiva das células à luz (ZOU & RICHMOND, 1999).

Contudo, ressalta-se que nos cultivos com baixa aeração (2B), no dia 2, o comprimento de onda em torno dos 650 nm ainda penetra em praticamente toda a coluna d´água, enquanto que no experimento 2A (alta aeração), neste mesmo período do cultivo, a porção mais funda dos tanques já não se encontra mais iluminada (profundidade de penetração de luz em torno de 1,5 cm), já indicando um efeito diferenciado entre os cultivos por variação na exposição maior ou menor à luz das células individuais.

A profundidade iluminada diminui conforme a densidade de biomassa aumenta até o dia 3, a partir de então as taxas de crescimento de biomassa diminuem, fazendo com que a profundidade de penetração da luz permaneça até o término dos experimentos em torno de 0,5 cm (correspondendo a 25% do volume total do cultivo e à relação volume iluminado/escuro de 0,33).

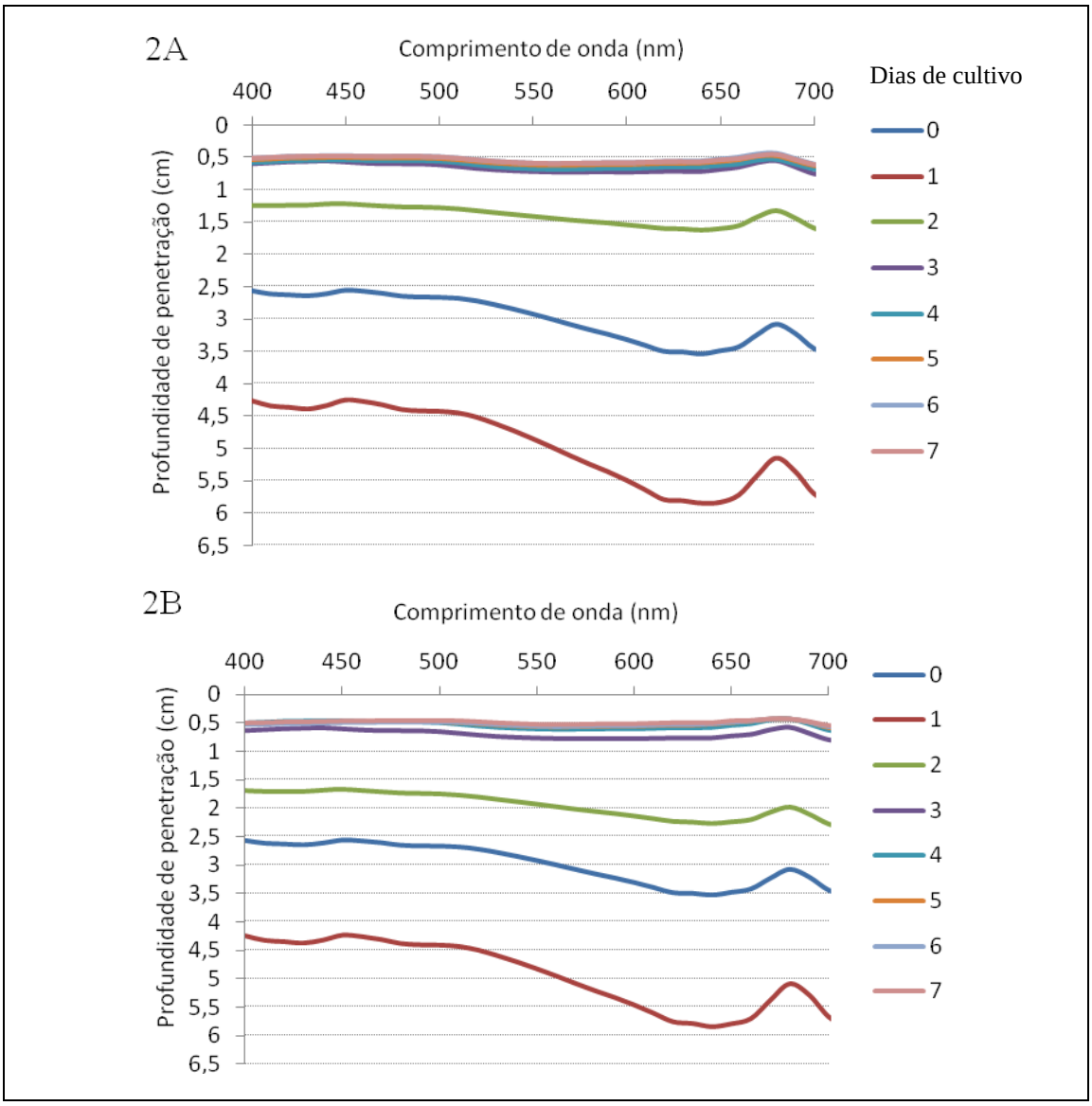

Figura 17: Evolução da profundidade de penetração da luz estimada para os comprimentos de onda entre 400 e 700 nm ao longo dos dias de cultivo nos experimentos com 2 cm de profundidade e alta (2A) e baixa (2B) taxa de aeração.

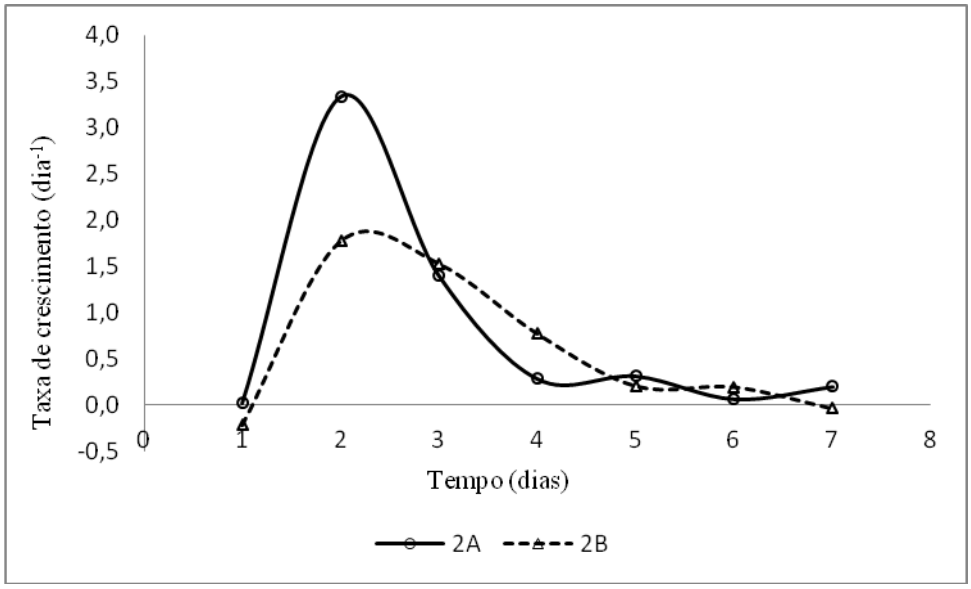

Figura 18: Taxa de crescimento ao longo dos dias de cultivo dos experimentos com 2 cm de profundidade com alta (2A) e baixa (2B) taxa de aeração.

7.1.2 Experimentos com 4 cm de profundidade

Na inoculação dos cultivos com 4 cm de profundidade (dia 0) a profundidade de penetração da luz nos comprimentos de onda de máxima absorção da clorofila-*a* já não corresponde à profundidade total do tanque de cultivo, formando uma pequena camada não iluminada junto ao fundo (figura 19).

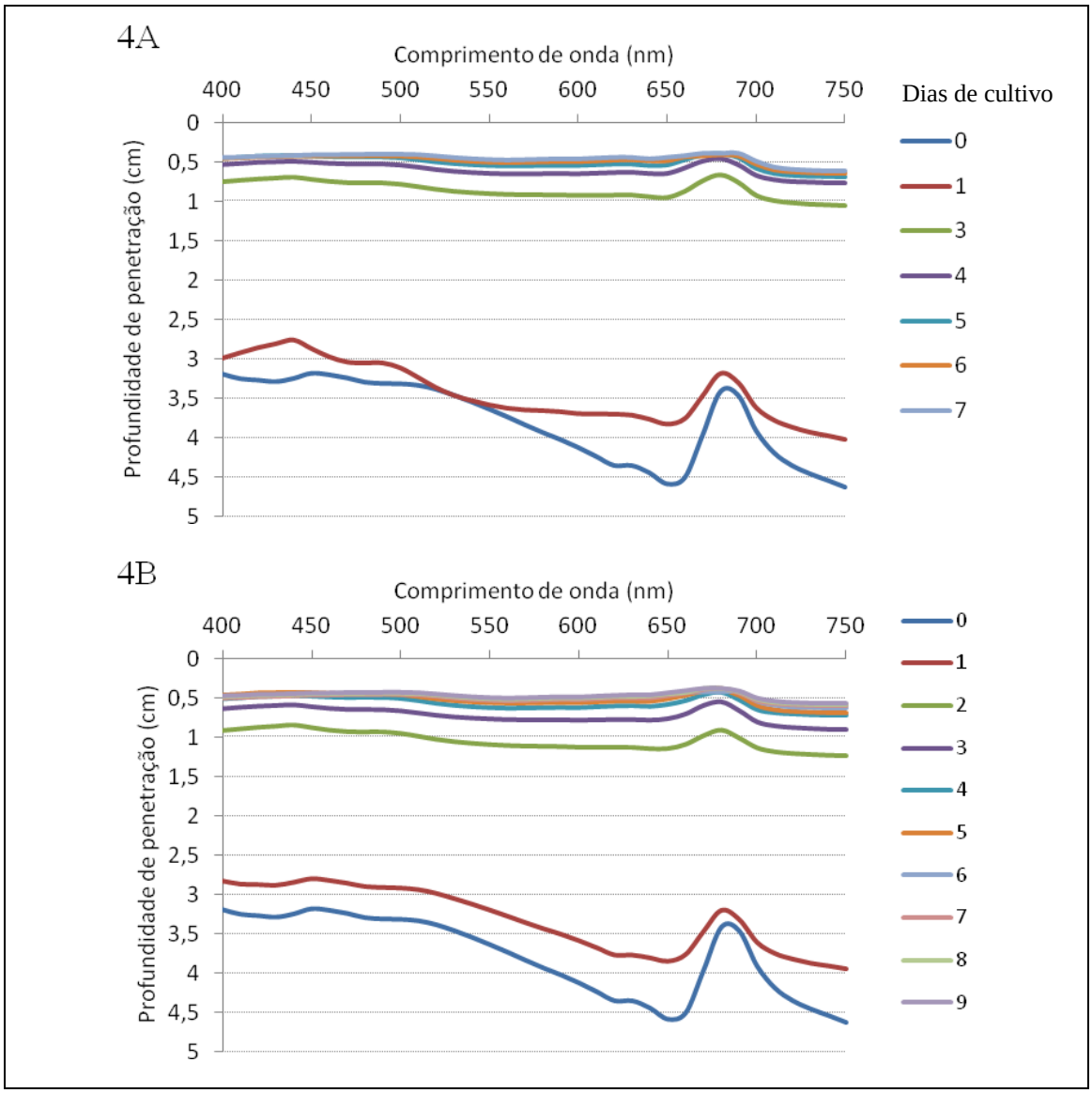

Figura 19: Evolução da profundidade de penetração da luz estimada para os comprimentos de onda entre 400 e 700 nm ao longo dos dias de cultivo nos experimentos com 4 cm de profundidade e alta (4A) e baixa (4B) taxa de aeração.

Esse fato pode contribuir para uma adaptação mais rápida das células às condições de iluminação nos cultivos, o que explicaria a ausência da fase *lag* no crescimento da biomassa (figura 20).

Contudo, entre o dia da inoculação e o dia 1 a velocidade de redução na profundidade de penetração de luz é menor do que a observada entre os dias 1 e 3, o que pode estar relacionado com um processo de fotoaclimatação das células no primeiro dia,

mas mais rápido do que no caso do cultivo com 2 cm. No caso do experimento com 4 cm de profundidade, a fotoaclimatação mais rápida favorece a ausência de inibição no crescimento.

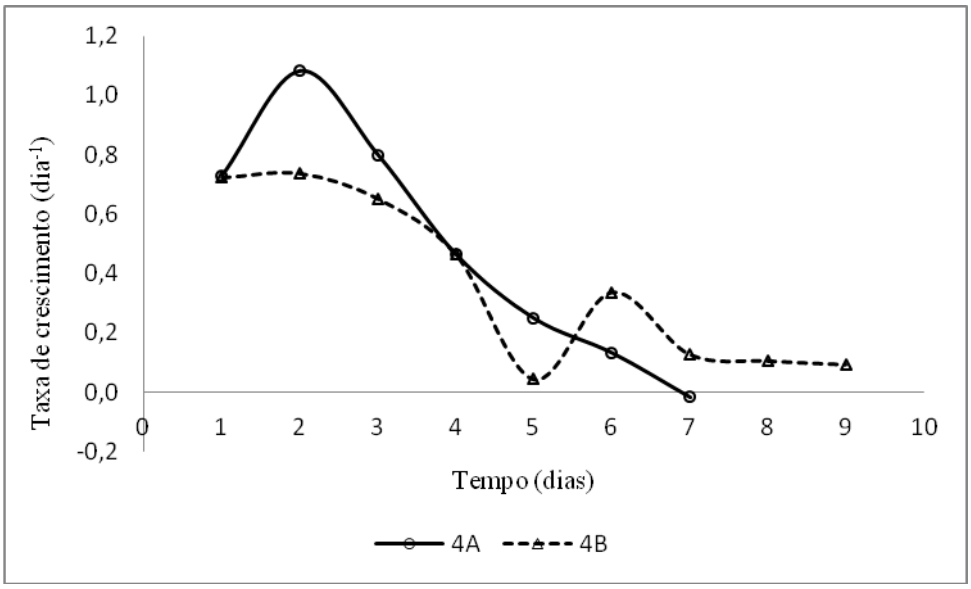

Figura 20: Taxa de crescimento ao longo dos dias de cultivo dos experimentos com 4 cm de profundidade com alta (4A) e baixa (4B) taxa de aeração.

O limiar de 0,5 cm de profundidade iluminada, correspondente a 12,5% do volume do cultivo e uma relação volume iluminado/escuro de 0,14, é atingido apenas no quarto dia de experimento (enquanto que nos cultivos 2A e 2B esse patamar foi atingido em três dias) e manteve-se nessa profundidade de penetração de luz até final dos experimentos.

7.1.3 Experimentos com 8 cm de profundidade

Nos cultivos com 8 cm de profundidade, já no dia da inoculação, grande parte do volume do cultivo encontrava-se no escuro (cerca de 62%), pois a luz penetrava até aproximadamente 3 cm (figura 21), esse fato protege as células do processo de fotoinibição e faz com que nem a fase *lag* e nem um período de aclimatação das células às condições do cultivo sejam observadas (figura 22).

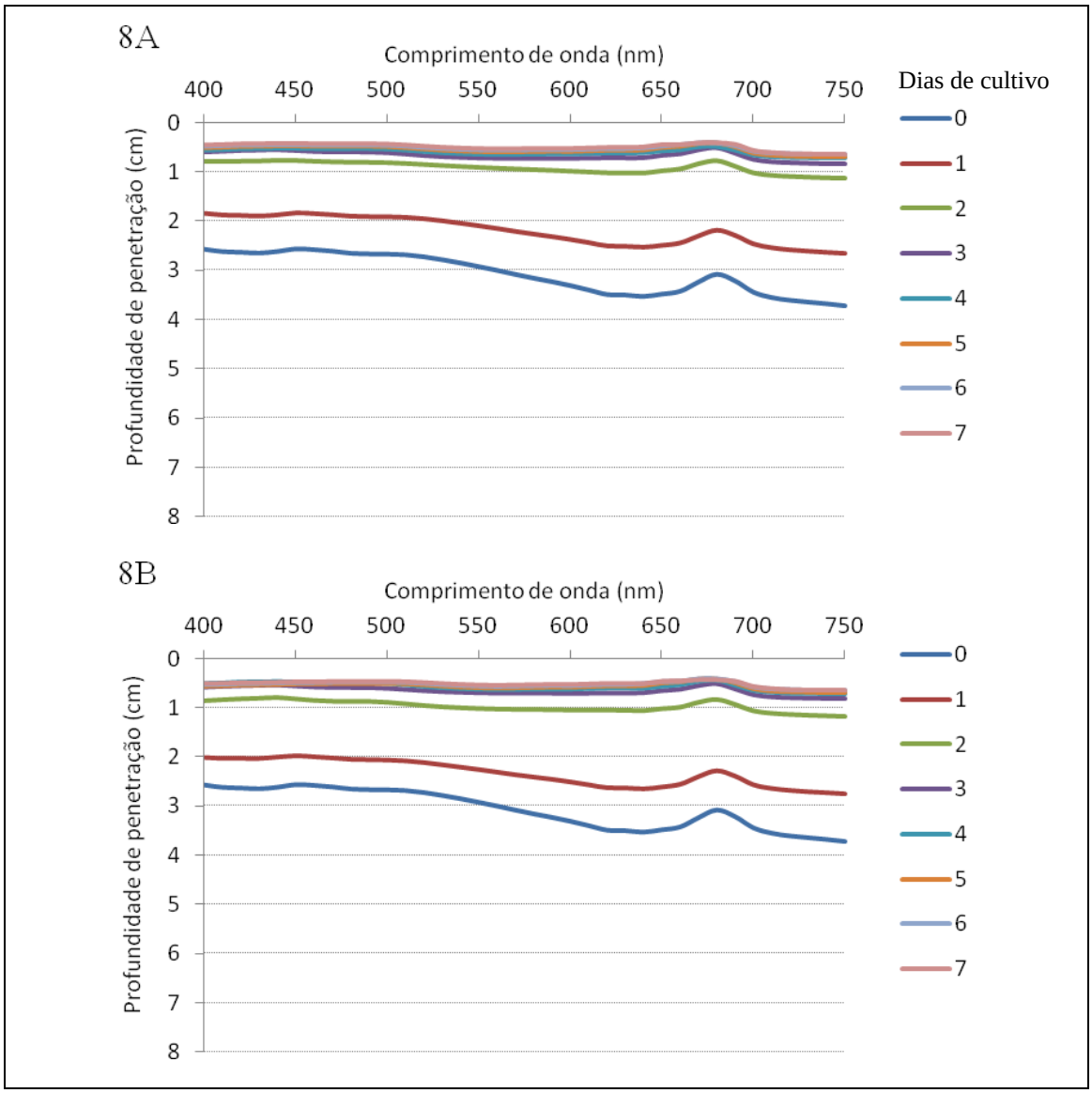

Figura 21: Evolução da profundidade de penetração da luz estimada para os comprimentos de onda entre 400 e 700 nm ao longo dos dias de cultivo nos experimentos com 4 cm de profundidade e alta (4A) e baixa (4B) taxa de aeração.

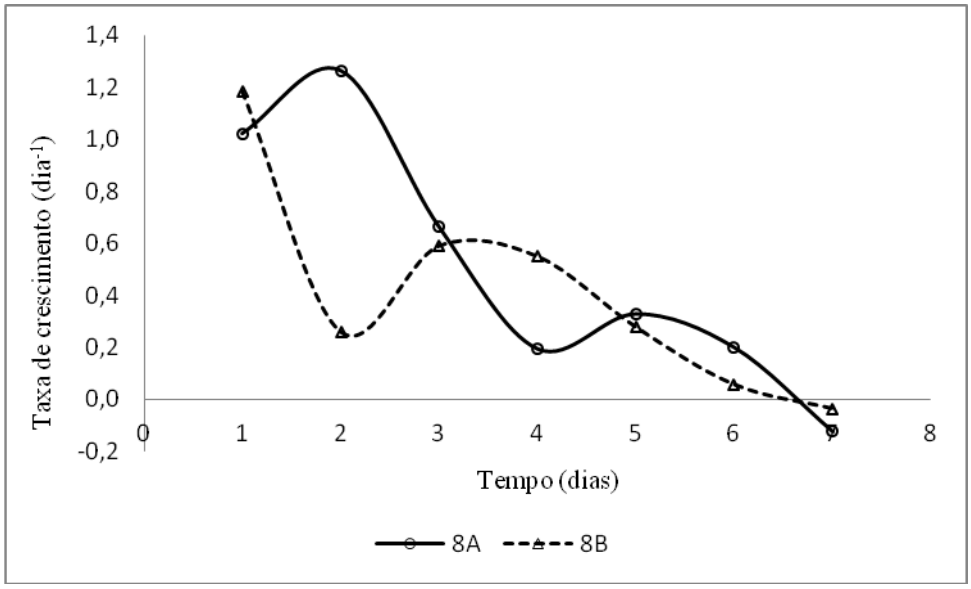

Figura 22: Taxa de crescimento ao longo dos dias de cultivo dos experimentos com 8 cm de profundidade com alta (8A) e baixa (8B) taxa de aeração.

Como consequência, elevadas taxas de crescimento foram observadas no dia 1 dos experimentos, sendo possível notar uma diferença na taxa de crescimento do experimento 8A, que aumentou do dia 1 para o 2, enquanto que a do experimento 8B reduziu-se drasticamente neste período.

No dia da inoculação, como grande parte do cultivo (aproximadamente 62%) já se encontrava na região não iluminada, os efeitos da taxa de aeração no aumento da frequência do ciclo claro-escuro que cada célula está sujeita é mais evidente.

A maior taxa de aeração gera uma agitação do meio mais eficiente e faz com que, em média, as células permaneçam na zona iluminada e não iluminada numa frequência que otimiza o uso da energia luminosa incidente na superfície do cultivo.

O aumento da taxa de crescimento no experimento 8A demonstra claramente esse efeito, pois ocorre mesmo com a redução da profundidade de penetração da luz do dia 1 para o dia 2, quando apenas cerca de 12,5% do volume do cultivo encontra-se iluminado.

No dia 3 dos experimentos 8A e 8B a profundidade de penetração da luz diminui até 0,5 cm (equivalente a 6,25% do volume do cultivo na porção iluminada, e uma relação volume iluminado/escuro de 0,07) e permanece nesta faixa ao longo dos experimentos.

7.2 Respostas fisiológicas às condições de luminosidade

7.2.1 Experimentos com 2 cm de profundidade

No início dos experimentos 2A e 2B a luz penetrava em toda a coluna d´água, fazendo com que as células recebessem uma quantidade de luz muito intensa, provocando o efeito de fotoinibição celular, prejudicando o desenvolvimento da biomassa.

Como resposta ao excesso de luz incidente no cultivo, as células de *N. gaditana* entraram em processo de aclimatação que pode ser observado na figura 23, através da redução de 50% na concentração de clorofila-*a* ativa por célula entre os dias 0 e 1.

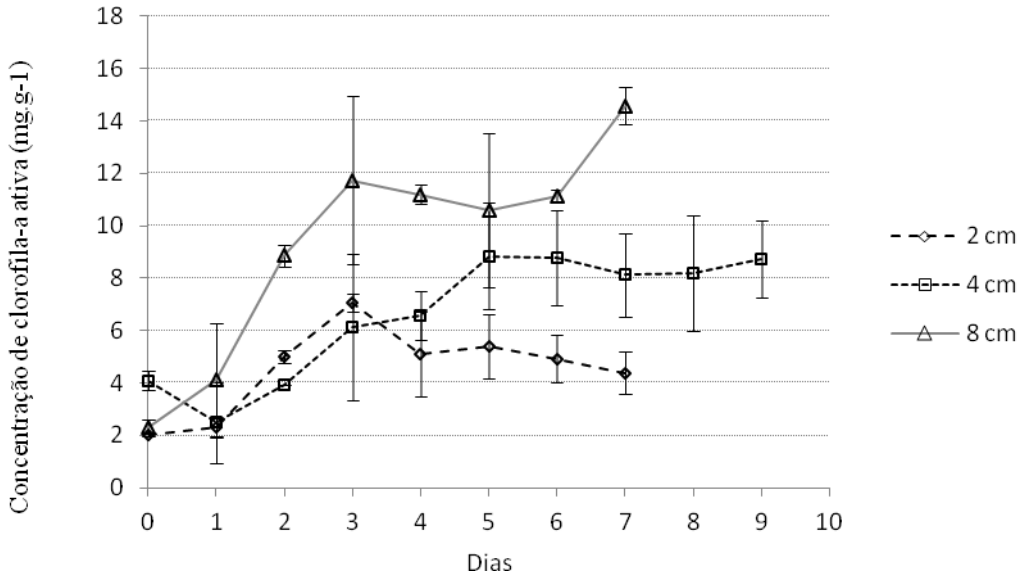

Figura 23: Médias diárias de concentração de clorofila-*a* ativa nas células para cada uma das profundidades estudadas (2, 4 e 8 cm).

Ao longo do desenvolvimento dos experimentos foi possível observar um aumento significativo na proporção carotenoide/clorofila-*a* ativa (figura 24). Ao mesmo tempo a concentração de clorofila-*a* ativa por célula se mantém praticamente constante aos valores próximos ao do dia de inoculação, o que indica o papel de fotoproteção dos carotenoides nas células (ROY, 2000), uma vez que o volume iluminado do cultivo corresponde a 25% do volume total.

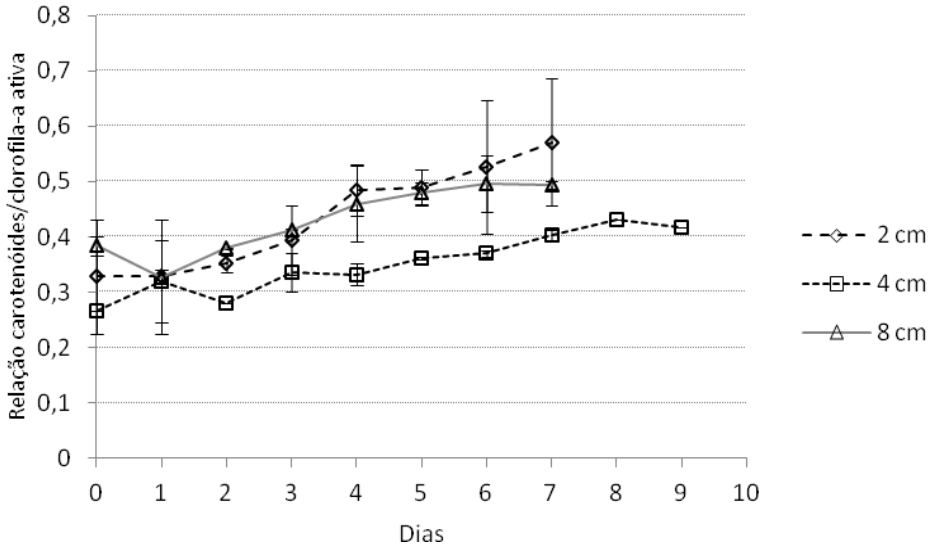

Figura 24: Médias diárias dos valores da relação entre carotenoides/clorofila-*a* ativa para cada uma das profundidades estudadas (2, 4 e 8 cm).

7.2.2 Experimentos com 4 cm de profundidade

Nos experimentos 4A e 4B, a proporção do volume de cultivo iluminado, em relação aos experimentos com 2 cm de profundidade é duas vezes menor, o que faz com que as células se aclimatem mais facilmente a um ambiente menos iluminado, similar ao da cultura estoque, mais densa.

Dessa forma, a concentração de clorofila-*a* ativa é maior nos cultivos com 4 cm de profundidade do que naqueles de 2 cm (figura 23), onde ocorreu fotoinibição e redução da concentração de clorofila-*a* em função do excesso de luz. Ao longo do experimento, tanto a

concentração de clorofila-*a* ativa quanto a relação carotenoide/clorofila-*a* ativa (figura 24) aumentam ao longo do experimento, mostrando que as células se aclimatam à condição de menor luminosidade através da ampliação da capacidade de captação da energia luminosa, seja aumentando a quantidade de moléculas de clorofila-*a*, seja aumentando a quantidade de carotenoides por célula, que neste caso, estariam ocupando a função de pigmento acessório, ampliando o espectro de absorção para a realização da fotossíntese.

Como os carotenoides possuem também a função de proteção do cloroplasto contra fotooxidação, a ineficiência do sistema de agitação adotado através das diferentes taxas de aeração, pode fazer com que as células permaneçam tempo demasiado na região iluminada do cultivo e o aumento da relação carotenoide/clorofila-*a* ativa pode estar relacionada com este fato.

A produção de carotenoides (ß-caroteno e pigmentos do ciclo xantofiliano) está relacionada à fotoproteção, conforme descrito por Roy (2000). A modificação na razão carotenoides/clorofila-*a* sob diferentes irradiâncias é conhecida como adaptação cromática complementar e foi descrita como ocorrendo em diatomáceas, dinoflagelados e crisofíceas por Richardsons et al. (1983), estas pertencendo ao filo Ochrophyta, o mesmo das *Nannochloropsis* spp. (Eustigmatophyceae).

7.2.3 Experimentos com 8 cm de profundidade

Nos experimentos 8A e 8B é possível observar um aumento na concentração de clorofila-*a* ativa por célula, mantendo-se em níveis significativamente maiores que os experimentos com 2 e 4 cm de profundidade. Isso indica que os efeitos gerados pelo fato de grande porção do cultivo estar na região escura (cerca de 93%), fez com que com que, em média, as células permanecessem menos tempo na porção iluminada, mesmo com uma mistura mais eficiente que nos outros experimentos.

É possível notar também maiores valores da relação carotenoide/clorofila-*a* ativa nos cultivos com 8 cm de profundidade, provavelmente ligados à característica dos carotenoides serem pigmentos acessórios, auxiliando na captura de luz na região do espectro da luz visível que não é absorvida pela clorofila-*a* (ROY, 2000).

De modo geral, os resultados obtidos nestes experimentos concordam com aqueles obtidos por Sukenik *et al.* (2012) para *Nannochloropsis* sp. Estes autores observaram que o conteúdo de clorofila celular decresceu conforme o nível de irradiância aumentou.

7.3 Parâmetros de cultivo: Oxigênio dissolvido e pH

Ao longo de todos os experimentos o valor de pH (figura 25) no final do período iluminado, quando as amostragens diárias eram realizadas, não apresentou variações significativas, mantendo-se em valores médios iguais a 7,14 ± 0,56, mesmo com a injeção constante de CO_2 durante o período iluminado.

Este fato pode indicar que parte do CO_2 injetado teria sido perdida por volatilização, pois o pH não apresentou valores abaixo de 6. Ao mesmo tempo, a taxa de injeção foi suficiente para suprir a demanda do processo fotossintetizante das algas, pois o pH não superou valores acima de 8. O fato da água do mar ser uma solução tampão e o consumo de CO_2 pelas microalgas têm participação em relação à pequena oscilação dos valores de pH.

Segundo Gentile & Blanch (2001), as condições ótimas de pH para cultivos contínuos de *N. gaditana* seria entre 7,1 e 7,3.

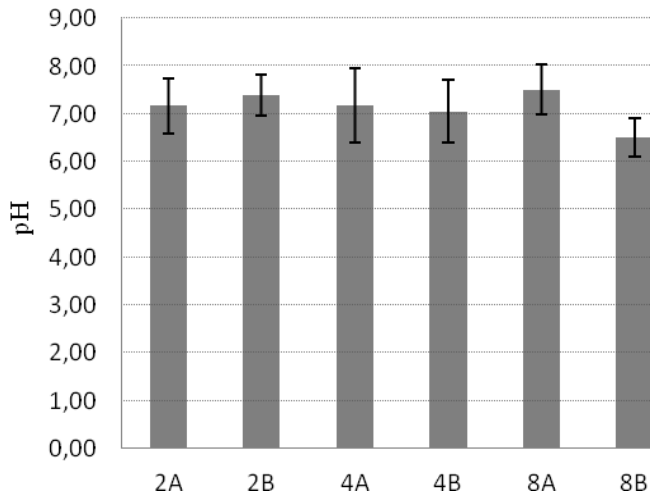

Figura 25: Média dos pH dos cultivos no final do período iluminado.

Os valores médios de oxigênio dissolvido (OD) no final do período iluminado (figura 26) mostram grandes variações em cada um dos experimentos, porém o valor médio entre eles foi em torno de 8 mg L^{-1}.

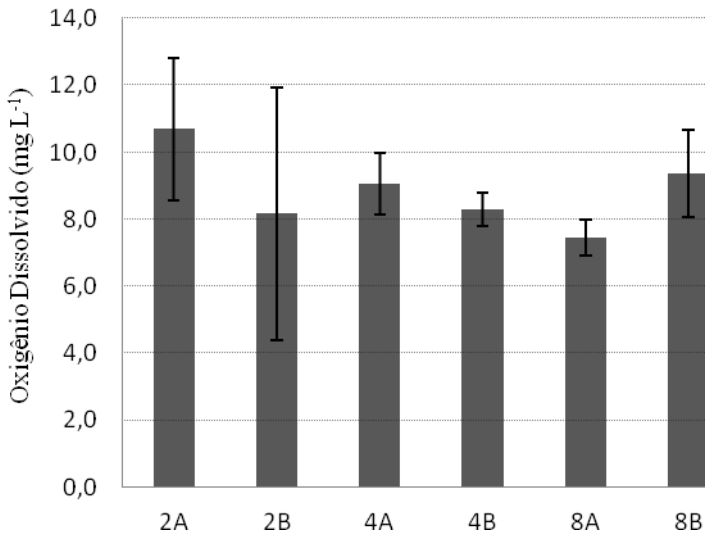

Figura 26: Valores médios de oxigênio dissolvido no final do período iluminado, no momento da retirada das amostras.

Com relação aos efeitos das diferentes taxas de aeração, apenas no experimento com 8 cm de profundidade foi possível observar diferença significativa entre os cultivos

com alta (8A) e baixa (8B) taxa de aeração. O experimento com taxa de aeração mais alta apresentou valores médios de oxigênio dissolvido menores (aproximadamente 7 mg L^{-1}) do que o experimento com baixa taxa de aeração, cuja concentração de OD médio foi em torno de 9 mg L^{-1}.

De modo geral, em todos os ensaios os valores de oxigênio dissolvido ultrapassaram o ponto de saturação, correspondente a 6,5 g/L, definido para a temperatura de 28°C e salinidade de 33 g/L (AMINOT, 1983). Neste cálculo foi considerado que a altitude de ensaios foi semelhante à do nível do mar, pois os dados da tabela bibliográfica utilizada não consideram a variável altitude.

Tendo em conta os valores de oxigênio dissolvido, o ensaio com os melhores resultados foi o 2B, com três leituras inferiores ao ponto de saturação. No entanto, obtiveram-se dois picos elevados diários (quinto e sétimo dias) de aproximadamente 200% de saturação.

Quanto aos ensaios 4B e 8A, os valores foram sempre ligeiramente superiores, mas com uma determinada constância, próximo à saturação definida (em torno de 120%). Os restantes ensaios mantiveram a mesma tendência de valores superiores, mas com ocorrência de variações distintas, que chegam a atingir cerca de 200% de saturação.

Os valores de oxigênio dissolvido elevados podem ser explicados, tanto pelos níveis elevados de radiação, de 800 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$, como também pelo horário do registro de valores ter sido sempre no final da tarde, o que potencializou a liberação acentuada de oxigênio por parte do cultivo.

Estes dados indicam que mesmo a aeração constante dos cultivos não garantiu uma troca gasosa ótima em termos de oxigênio dissolvido, o que pode ter levado à alguma inibição da fotossíntese. De acordo com Molina *et al.*, (2001) as concentrações elevadas de

oxigênio dissolvido claramente influenciam a atividade fotossintética (taxa de geração de oxigênio), consequentemente a produção de biomassa.

Estes autores verificaram que a atividade fotossintética foi reduzida quando as concentrações de oxigênio excederam 100% de saturação atmosférica. Entretanto, apesar das altas concentrações de oxigênio inibir a fotossíntese, elas não chegaram a causar morte celular, mesmo em concentrações de 470% de saturação atmosférica como observado em algumas medições.

7.4 Otimização do ciclo claro-escuro

A otimização da produtividade de biomassa por área iluminada é um dos principais desafios dos cultivos de microalgas em grande escala, pois em última instância o que se busca nestes casos é transformar da maneira mais eficiente possível a energia solar que incide em uma determinada área em biomassa de microalgas e seus componentes, como os lipídios para produção de biodiesel.

Para atingir este objetivo, torna-se impreterível a otimização da frequência do ciclo de claro-escuro, ao qual as células de microalgas estão sujeitas, uma vez que a distribuição da luz incidente na superfície dos cultivos diminui exponencialmente ao penetrá-los, criando regiões iluminadas e escuras no interior dos cultivos.

Levando-se em conta que o sistema de cultivo de menor custo de construção e manutenção e que, por consequência, são utilizados atualmente nos cultivos comerciais de microalgas, são os do tipo aberto e horizontais (tipo *raceways*), o ciclo claro-escuro, que nada mais é do que a frequência com a qual as células, em média, entram e saem das regiões iluminadas e escuras do cultivo, é influenciado, principalmente, pela profundidade do cultivo (caminho óptico), pela eficiência da agitação do meio (no caso deste trabalho, da taxa de aeração), da densidade celular (em g L^{-1}) e da intensidade e qualidade da luz

incidente na superfície dos cultivos (dado pelas condições ambientais e pela posição geográfica do local).

Dado que, nos cultivos comerciais, condições como a intensidade de luz disponível e temperatura podem ser ajustadas com a escolha adequada da localização geográfica do empreendimento, os parâmetros de maior interesse para maximizar a produtividade de biomassa e de lipídeos por área iluminada dizem respeito à otimização do ciclo de claro-escuro, tais como a profundidade, a densidade celular e a agitação dos cultivos através de aeração.

Para avaliar as condições ideais de produção de biomassa e lipídeos, portanto, optou-se por cultivos em batelada alimentada de maneira a garantir que o fator limitante de crescimento da biomassa fosse a luz disponível no interior dos cultivos. Os momentos de encerramento dos experimentos foram estabelecidos como o início das fases estacionárias em relação à quantidade de células nos cultivos (células mL^{-1}), conforme é possível observar na figura 27.

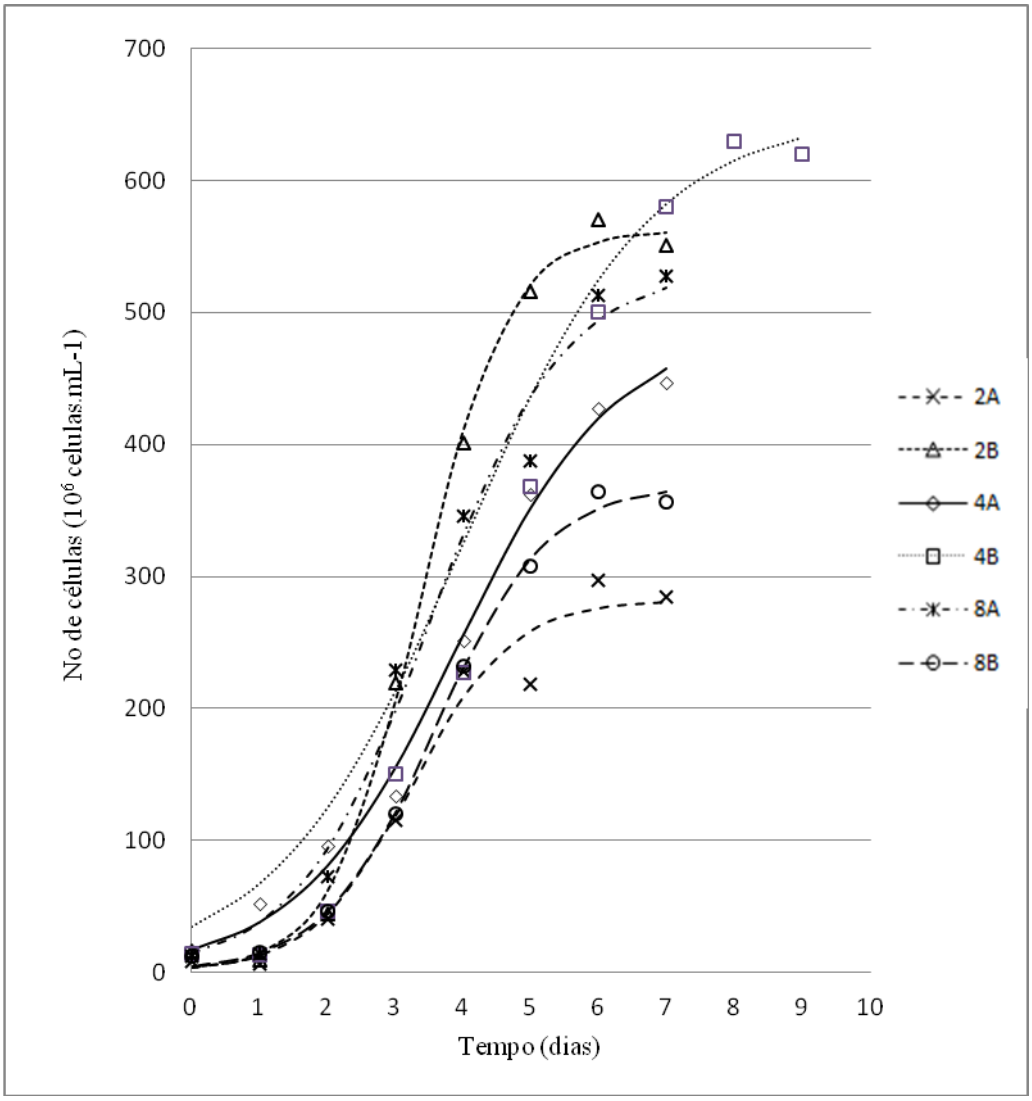

Figura 27: Evolução do número de células por volume nos experimentos ao longo do tempo.

Uma vez calculadas as produtividades por área iluminada, foi possível observar que tanto uma redução na profundidade dos cultivos de 8A para 4A quanto de 8B para 4B resultaram em aumento na produtividade de biomassa por área iluminada de 11,53 para 13,83 g m^{-2} dia^{-1} e de 10,22 para 11,57 g m^{-2} dia^{-1}, respectivamente (figura 28). Nestes casos, uma redução pela metade na profundidade (de 8 para 4 cm) resultou em um aumento mais que dobrado (1,5 vezes) na produtividade de biomassa por volume de cultivo, de 0,15 para 0,35 g L^{-1} dia^{-1} (de 8A para 4A) e de 0,13 para 0,31 g L^{-1} dia^{-1} (de 8B para 4B).

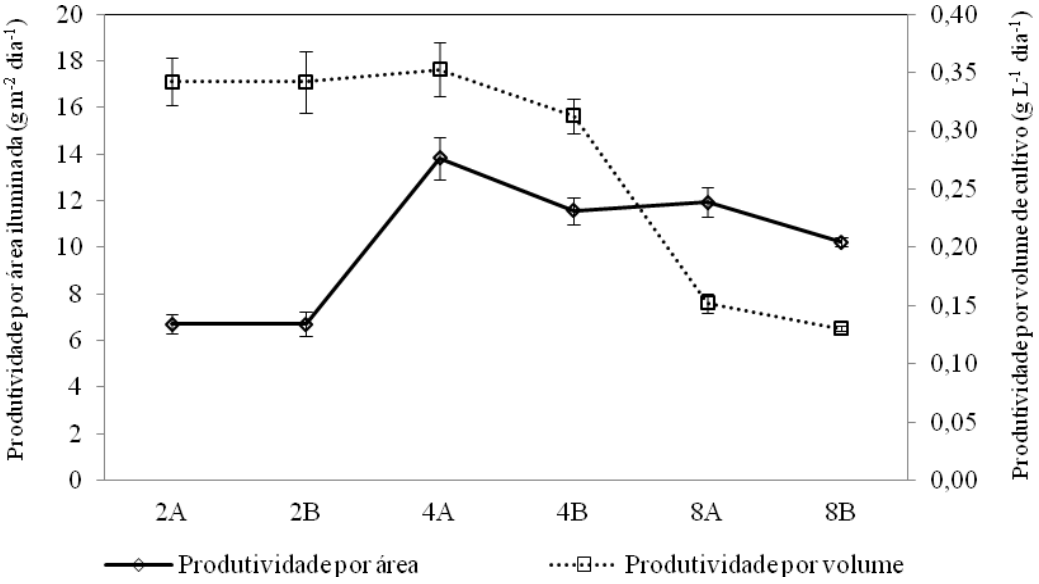

Figura 28: Gráfico da produtividade de biomassa por área iluminada e por volume de cultivo dos experimentos com 2, 4 e 8 cm de profundidade e com taxas de aeração alta (2A, 4A e 8A) e baixa (2B, 4B e 8B).

Este resultado encontra-se dentro do esperado de acordo com Richmond *et al*. (2003), uma vez que, como todos os experimentos foram realizados mantendo-se a mesma área de cultivo iluminada (0,0765 m^2), uma redução na profundidade acarreta numa diminuição do volume de cultivo na mesma proporção e, portanto, para se atingir um aumento na produtividade por área iluminada, o aumento na produtividade por volume deve ser mais que proporcional à redução da profundidade de cultivo.

Neste caso, a otimização do ciclo de claro-escuro teria sido obtido com a redução do caminho óptico (profundidade), pois a relação entre o volume iluminado/não iluminado de um cultivo com 8 cm de profundidade para 4 cm aumenta, ou seja, o volume de cultivo no escuro diminui e, mantendo-se a mesma taxa de aeração, as células que se encontravam, em média, sob condição de limitação de luz passam a ter um acesso mais frequente à região iluminada, conforme visto nos resultados de penetração da luz e estado fisiológico das células (RICHMOND, 2004).

Por outro lado, a redução da profundidade de 4 para 2 cm, entre ambas as taxas de aeração (de 4A para 2A e de 4B para 2B) não foi acompanhada pelo aumento na produtividade por volume de cultivo, que se manteve praticamente constante, o que resultou em uma queda na produtividade por área iluminada na proporção da redução de 50% do volume de cultivo, de 13,83 para 6,71 g m^{-2} dia^{-1}.

Neste caso, o ciclo claro-escuro não foi otimizado, pois mesmo com a redução na proporção entre volume iluminado/não iluminado, possivelmente a taxa de agitação nos cultivos com 2 cm de profundidade não foi eficiente para promover a frequência ideal de permanência e saída das regiões iluminadas e escuras do cultivo, capaz de elevar a produtividade por volume mais que proporcionalmente à redução do volume total de cultivo.

Os dados de estado fisiológico das células apontam para uma fotoinibição, ou seja, as células estariam permanecendo tempo muito longo na região iluminada, haja vista que o volume de cultivo iluminado nos cultivos de 2 cm de profundidade era cerca de 25% do volume total. Provavelmente uma maneira de agitar mais eficientemente (taxas de aeração mais elevadas) os cultivos 2A e 2B poderia otimizar o ciclo de claro-escuro neste caso.

Com relação ao efeito da taxa de aeração, que está ligada ao padrão de agitação dos cultivos, é possível observar que nos experimentos com 2 cm de profundidade (2A e 2B) não houve variação significativa na produtividade de biomassa, seja por área iluminada quanto por volume de cultivo, provavelmente em razão dos mesmos motivos expostos no parágrafo anterior.

Já nos experimentos com 4 e 8 cm de profundidade, o aumento na taxa de aeração de 0,25 (4B e 8B) para 1,00 L (4A e 8A) de ar L^{-1} min^{-1} apresentou significativo aumento na produtividade de biomassa por área e por volume, conforme figura 28.

Nestes casos a maior taxa de aeração resultou em uma maior frequência do ciclo de claro-escuro maior, mesmo mantendo-se a proporção entre volume iluminado/escuro constante (sem variação da profundidade).

É interessante notar que a produtividade de biomassa por área iluminada do experimento com 4 cm de profundidade e baixa taxa de aeração (4B) foi a mesma obtida no experimento 8A, com 8 cm de profundidade e alta taxa de aeração, de 11,57 e 11,53 g m^{-2} dia^{-1}, respectivamente. Isso significa que a redução da profundidade pela metade de 8 para 4 cm foi compensada pelo aumento em 4 vezes da taxa de aeração de 0,25 para 1,00 L de ar L^{-1} min^{-1}, dobrando a produtividade de biomassa por volume de cultivo (de 0,14 para 0,31 g L^{-1} dia^{-1}).

Contudo, apesar de se poder notar a influência da taxa de aeração na produtividade de biomassa final obtida nos cultivos em batelada, observou-se, ao final dos experimentos com profundidade de 2 e 4 cm a deposição de células junto ao fundo dos tanques de cultivo.

Esta deposição de biomassa foi observada ao se analisar as diferenças entre a biomassa seca recuperada ao final dos experimentos (tabela 5), quando o plástico transparente que recobria os tanques foi retirado e os cultivos homogeneizados para a filtração da biomassa final, e aquela biomassa seca amostrada diariamente através do tubo inserido no centro dos tanques, indicando que o sistema de agitação utilizado não forneceu, para estas profundidades, a mistura ideal para manter as células em suspensão na coluna d´água.

Tabela 5: Dados da diferença entre a biomassa seca final recuperada e a amostrada no último dia, demonstrando a quantidade de biomassa depositada no fundo.

Experimento	Biomassa Seca Recuperada ($g.L^{-1}$)	Biomassa Seca Amostrada ($g.L^{-1}$)	Diferença (%)	Média (%)
2A	2,4902	2,1622	13,2%	11,7%
2B	2,5646	2,3008	10,3%	
4A	2,6161	1,8320	30,0%	26,1%
4B	2,8143	2,1880	22,3%	
8A	1,1592	1,1967	-3,2%*	-1,2%*
8B	1,0401	1,0306	0,9%	

* Dados dentro do erro observado de ± 5%.

Nos experimentos com 2 e 4 cm de profundidade e maior taxa de aeração, a taxa de deposição foi mais expressiva (13,2 e 30%, respectivamente), do que nos cultivos com baixa aeração (10,3 e 22,3%, respectivamente).

Por outro lado, nos experimentos com 8 cm de profundidade, o sistema de agitação mostrou-se mais eficiente com relação à redução na deposição de microalgas no fundo dos tanques, como mostram os resultados da tabela 5. Neste caso, o fato pode ser explicado pela profundidade do cultivo uma vez que a aeração é tipicamente utilizada para agitação de sistemas do tipo *air-lift*, onde a coluna de água é maior e a relação área/volume é menor, permitindo um melhor rendimento das bolhas de ar com relação à agitação do cultivo (MORWEISER et.al., 2010).

7.5 Caracterização da biomassa

Os resultados de composição elementar são importantes para determinar o potencial do uso da biomassa de *Nannochloropsis gaditana* para outras conversões energéticas, como processos termoquímicos (ex: pirólise, gaseificação, etc.). Em processos como a

gaseificação, por exemplo, a biomassa é transformada em uma mistura de gases (denominada gás de síntese), a partir da qual pode ser transformada em combustíveis líquidos. A biomassa obtida apresentou os seguintes valores médios de composição elementar percentual (tabela 6).

Tabela 6: Composição elementar percentual média da biomassa

Elemento químico	Composição elementar (%)
Carbono	47,68 ± 1,73 %
Hidrogênio	7,58 ± 0,31 %
Nitrogênio	7,38 ± 0,99 %
Oxigênio e outros[1]	37,36 ± 2,76 %

[1] Obtidos por diferença.

Nesta análise elementar verificou-se que os teores de nitrogênio são bastante superiores aos encontrados no bagaço de cana-de-açúcar, o qual possui 0,2 % N (CASTRO *et al*., 2009). Assim, o processo de gaseificação da biomassa de *N. gaditana* pode resultar na formação de gases contendo NO_x, um gás ácido, que pode corroer os equipamentos utilizados e é também um poluente atmosférico (MORAIS *et al*., 2006). Devido a este fato, seria necessário estudar meios de reduzir o teor de nitrogênio na biomassa de *N. gaditana* para o seu uso num possível processo de gaseificação.

Por outro lado, a biomassa liofilizada apresentou, em média, valor de poder calorífico superior (PCS) de 19,67 ± 2,84 MJ kg^{-1}, valor equivalente ao do bagaço de cana-de-açúcar, 19,9 MJ kg^{-1} e do pó de serra, 20,3 MJ kg^{-1}, mas superior ao da casca de arroz, de 15,5 MJ kg^{-1} (MORAIS *et al*., 2006).

Um dos principais potenciais entraves no dimensionamento de sistemas de gaseificação é o teor de cinzas, pois o uso de biomassa com alto teor de cinzas em processos de gaseificação pode causar problemas de operação, exigindo limpezas regulares do equipamento além de aumentar a produção de alcatrão (resíduo escuro e viscoso), o que reduz o desempenho do processo.

Os resultados da análise imediata não apresentaram diferenças significativas entre as diferentes condições de cultivo estudadas (tabela 7). O valor médio do teor de cinzas encontrado foi de 5%, enquanto que o teor de cinzas da casca de arroz *in natura*, por exemplo, é de 23% e do bagaço de cana-de-açúcar em torno de 2,2% (RODRIGUES *et al*., 2010).

Tabela 7: Teor de cinzas da biomassa seca

Experimento	Teor de cinzas ± Desvio padrão (% Biomassa Seca)
2A	4,7 ± 0,5 %
2B	5,9 ± 0,5 %
4A	5,4 ± 0,5 %
4B	4,8 ± 0,5 %
8A	5,1 ± 0,5%
8B	4,0 ± 0,5%

7.6 Teor e produtividade de lipídios totais e análise da composição dos ácidos graxos

Os teores de lipídios totais e de produtividade por área (tabela 8) encontrados neste trabalho estão de acordo com os relatados na literatura para *Nannochloropsis* spp. (BOUSSIBA et al., 1987; RODOLFI et al., 2009; ZOU et al., 2000; SU et al., 2011; KHOZIN-GOLDBERG & BOUSSIBA, 2011).

Tabela 8: Valores de teor e produtividade por área de lipídios totais obtidos.

Experimento	Teor de lipídios totais (% BSLC)*	Produtividade de lipídios totais ($g\ m^{-2} dia^{-1}$)
2A	17,04	1,14
2B	17,86	1,20
4A	20,50	2,84
4B	15,04	1,74
8A	14,37	1,66
8B	12,28	1,26

*Biomassa seca livre de cinzas

O experimento 4A, além de ser o que resultou em uma maior produtividade de biomassa por área iluminada, também apresentou os maiores valores, seja de teor quanto de produtividade de lipídios. Realizando uma extrapolação da produtividade de lipídios totais obtida neste trabalho para um cultivo com 1 hectare de área durante 1 ano, seria equivalente a aproximadamente 10,3 ton ha^{-1} ano^{-1}.

Contudo alerta-se para os cuidados que devem ser tomados ao se analisar esta estimativa, pois se sabe que há ainda muitos passos a serem dados e muitos processos a serem estudados entre os resultados de um cultivo em escala de laboratório e a produtividade de um empreendimento de grande escala.

Apenas para comparação, os cultivos de soja, que atualmente representam a principal fonte de lipídios para a produção de biodiesel no Brasil, possuem produtividade de até 3,5 ton ha^{-1} ano^{-1} (ESPINDOLA *et al*., 2008), o que demonstra o potencial dos cultivos de microalgas como fornecedores de matéria-prima para a produção de biodiesel, caso os atuais resultados de laboratório se concretizem em escalas maiores de produção no futuro.

Com relação à composição de ácidos graxos (tabela 9), foi possível observar uma grande variação na quantidade do ácido eicosapentanóico (20:5n-3, EPA) entre os experimentos realizados. Como a presença de grandes quantidades relativas desse ácido

graxo nas microalgas do gênero *Nannochloropsis* é muito marcante e característico (SUKENIK, 1999), a variação observada poderia ser indício de presença de outras espécies de microalgas nos cultivos, conforme salienta Khozin-Goldemberg & Boussiba (2011). Entretanto, no presente caso, não foi detectada alteração perceptível na composição específica nas amostras de contagem.

Somente o experimento 4A, que apresentou melhores resultados para a produtividade de biomassa por área iluminada e maiores teores e produtividade de lipídios totais, teve o seu perfil de ácidos graxos condizentes com os reportados por Sukenik (1999) e Khozin-Goldberg & Boussiba (2011).

Nos demais experimentos, apesar do ácido palmítico (16:0) ainda ser encontrado em quantidades parecidas com o esperado, é possível observar uma redução na quantidade de ácido palmitoleico (16:1n-7), um aumento considerável nos ácidos graxos 18:1n-9, 18:2n-6 e 18:3n-3 e redução drástica na quantidade de EPA, este último nem sendo detectado na análise de perfil dos ácidos graxos da biomassa do experimento 8B.

Tabela 9: Perfis de ácidos graxos extraídos da biomassa obtida de cada experimento (%).

	2A	2B	4A	4B	8A	8B
Ácidos graxos saturados						
14:0	2,65	1,62	4,9	3,2	2,1	1,94
16:0	33,06	31,62	29,93	24,62	29,06	26,2
18:0	2,2	3,2	0,95	1,94	1,11	1,02
Ácidos graxos monoinsaturados						
16:1(n-7)	5,89	1,31	21,03	9,31	1,12	0,87
18:1(n-9)	15,73	19,42	3,8	13,6	12,07	13,46
Ácidos graxos polinsaturados						
18:2(n-6)	17,77	19,82	4,28	15,92	22,78	21,52
18:3(n-6)	0,12	0,07	0,24	-	-	0,08
18:3(n-3)	10,31	10,99	-	11,46	14,83	18,47
20:3(n-3)	-	-	-	-	-	-
20:4(n-6)	0,95	0,11	6,68	1,78	-	-
20:5(n-3)	1,86	0,27	19,37	4,6	0,36	-
Saturados	37,91	36,44	35,78	29,76	32,27	29,16
Monoinsaturados	21,62	20,73	24,83	22,91	13,19	14,33
Polinsaturados	31,01	31,26	30,57	33,76	37,97	40,07
Outros (Não detectados)	9,46	11,57	8,82	13,57	16,57	16,44

De acordo com Schenk et al. (2008), um biodiesel de qualidade deveria ser composto por uma mistura entre C16:1, C18:1 e C14:0 na proporção de massa de 5:4:1, pois teria um baixo potencial oxidativo ao mesmo tempo em que mantém níveis satisfatórios de fluidez e número de cetano.

Como esta proporção de ácidos graxos é difícil de ser encontrada em óleos extraídos de microalgas (NASCIMENTO *et al*., 2012), um biodiesel de qualidade poderia ser obtido apenas com a mistura adequada de óleos de diferentes organismos.

Os perfis de ácidos graxos da *Nannochloropsis gaditana* obtidos mostram um alto teor de ácidos graxos poli-insaturados, que podem resultar em um biodiesel mais suscetível aos efeitos oxidativos, reduzindo sua estabilidade (REFAAT, 2009).

8. Conclusões

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que:

- O sistema de cultivo de baixo custo utilizado permitiu obter alta produtividade de biomassa com a espécie teste, *Nannochloropsis gaditana*. As principais vantagens observadas foram: o melhor controle da temperatura, da salinidade, do pH e também mostrou-se eficiente para minimizar contaminações, muito frequentes em sistema abertos, permitindo a adaptação dos cultivos ao ambiente externo;
- Variações na profundidade de cultivo de *N. gaditana* e na taxa de aeração são capazes de otimizar a frequência de exposição ao claro-escuro, resultando em maior produtividade de biomassa;
- Para a irradiância utilizada (800 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$), o experimento com 4 cm de profundidade e alta taxa de aeração apresentou a maior produtividade de biomassa (13,83 g m^{-2} d^{-1}), assim como maior teor (20,50 %) e produtividade de lipídios (2,84 g m^{-2} d^{-1}).
- Os teores e a produtividade de lipídios totais apontam para um potencial uso da *N. gaditana* como matéria-prima para a produção de biodiesel. Embora esta espécie apresente elevada quantidade de ácidos graxos poli-insaturados, que podem afetar a qualidade do biodiesel, estratégias de mistura de óleos de diferentes espécies podem contornar esta característica desfavorável, uma vez que sua produtividade de lipídeos totais é alta.
- O modo de aeração utilizado não foi muito eficiente para ressuspender completamente a espécie teste. Melhorias no sistema de aeração devem ser testadas para cada espécie a ser utilizada, em função de características específicas relacionadas à flutuabilidade/mobilidade das células.

- A alta concentração de oxigênio observada nos cultivos (que pode reduzir a fotossíntese e, consequentemente, a produtividade) não teve efeito significativo sobre o rendimento de biomassa.
- O sistema de cultivo utilizado tem potencial para ser inserido em sistema de *scaling up* em plantas industriais de sistema aberto, na etapa anterior ao envio do cultivo para o *raceway*, onde pode ser adaptado para volumes intermediários, exposto à radiação natural e às intempéries, com mínimo risco de contaminação e máxima pré-adaptação.

9. Bibliografia

AMINOT, A. Dosage de l´Oxygène dissous. In: AMINOT, A.; CHAUSSEPIED, M. (Eds). **Manuel Des Analyses Chimiques Em Milieu Marin**. Brest Cedex, 1983. P 75-92.

AOCS. Met. Ce 1f – 96. In: FIRESTONE, D. (Ed**.) Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society**. 6th ed. Urbana: AOCS, 2009a.

_____. Met. Ce 1 - 62. In: FIRESTONE, D. (Ed.) **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society**. 6th ed. Urbana: AOCS, 2009b.

ASTM – American Society for Testing and Materials. **D 1102**: Standard Test Method for Ash in Wood, 1984.

ASTM – American Society for Testing and Materials. **E 872**: Standard Test Method for Volatile Matter in the Analysis of Particulate Wood Fuels, 1982.

ASTM – American Society for Testing and Materials. **D 2015**: Standard Test Method for Gross Calorific Value of Coal and Coke by the Adiabatic Bomb Calorimeter 2000.

AZEVEDO, M. A.; D´AVIGNON, A.; ARAÚJO, M. A. V. & CAMPOS, S. DE G. **Microalgas: Fonte de Energia para o Brasil?**. In: Anais do XII Congresso Brasileiro de Energia. 2008. Rio de Janeiro: COPPE/UFRJ, 4, p. 1619-1633, 2008.

BITOG, J. P.; LEE, I. -B.; LEE, C. -G.; KIM, K, -S.; HWANG, H. –S.; HONG, S. –W.; SEO, I. –H.; KWON, K. –S.; MOSTAFA, E. Application of computational fluid dynamics for modeling and designing photobioreators for microalgae production: A review. **Computers and Electronics in Agriculture**, 76, p. 131-147, 2011.

BLIGH, E. C.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid. Extraction and Purification. **Can. J. Biochem. Phys.**, v. 37, p. 911-917, 1959.

CARRERO, A.; VICENTE, G.; RODRÍGUEZ, R.; LINARES, M.; DEL PESO, G. L. Hierarchical zeolites as catalysts for biodiesel production from *Nannochloropsis* microalga oil. **Catal. Today**, v. 167, p. 148-153, 2011.

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

CHUM, H.; FAAIJ, A.; MOREIRA, J.; BERNDES, G.; DHAMIJA, P.; DONG, H.; GABRIELLE, B.; GOSS ENG, A.; LUCHT, W.; MAPAKO, M.; MASERA CERUTTI, O.; MCINTYRE, T.; MINOWA, T.; PINGOUD, K. Bioenergy. In: EDENHOFER, O.; PICHS-MADRUGA, R.; SOKONA, Y.; SEYBOTH, K.; MATSCHOSS, P.; KADNER, S.; ZWICKEL, T.; EICKEMEIER, P.; HANSEN, G.; SCHLOMER, S.; VON STECHOW, C. (Eds). **IPCC Special Report on Renewable Energy Sources and Climate Change Mitigation**. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, Cambridge University Press, 2011. 140 p.

CONVERTI, A.; CASAZZA, A.; ORTIZ, E. Y.; PEREGO, P.; BORGHI, M. D. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of

Nannochloropsis oculata and Chlorella vulgaris for biodiesel production. **Chem. Eng. and Proc.**, 48, p. 1146-1151, 2009.

DEMIRBAS, A. Thermochemical convertion of mosses and algae to gaseous products. **Energy Sources**, Part A, 31, 746-753, 2009

DOUCHA, J.; LÍVANSKÝ, K. Outdoor open thin-layer microalgal photobioreactor: potential productivity. **J. Appl. Phycol**, 21, p. 111-117, 2009.

FÁBREGAS, J.; MASEDA, A.; DOMÍNGUEZ, A.; OTERO, A. The cell composition of *Nannochloropsis* sp. changes under different irradiances in semicontinuous culture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 20, 2004, p. 31-35

FISHMAN, D.; MAJUNDAR, R.; MORELLO J.; PATE, R.; YANG, J. (Eds.) **National Algal Biofuels Technology Roadmap**. U.S. Department of Energy, Maryland: Office of Energy Efficiency and Renewable Energy - Biomass Program, 2010. 110 p.

GENTILE, M-P.; BLANCH, H. W. Physiology and Xanthophyll Cycle Activity of Nannochloropsis gaditana.

GITELSON, A.; QIUANG, H.; RICHMOND, A. Photic volume in photobioreactors supporting ultrahigh population densities of the photoautotroph *Spirulina platensis*. **Appl. And Env.Microbiol.**, 62(5), p. 1570-1573, 1996.

GUILLARD, R. R. L.; RYTHER, John H.. Studies of Marine Planktonic Diatoms: *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervaceae* (Cleve) Gran. **Canadian Jounal Of Microbiology**, Vancouver, v. 8, n. , p.229-239, 1962.

GUIRY, M.D.; GUIRY, G.M. **AlgaeBase**. World-wide electronic publication. Galway:National University of Ireland. 2012. Disponível em: <http://www.algaebase.org> Acesso em: 30/outubro/2012.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Lab. Pract.**, v. 22, n. 8, p. 475-481, 1973.

IPCC. **Climate Change 2007: Synthesis Report.** Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. [Core Writing Team, Pachauri, R. K.; Reisinger, A. (Eds.)]. IPCC, Genebra(Suíça), 2007. 104p.

JEFFREY, S. W.; HUMPHREY, G. F. New espectrofotometric equations for determining chlorophylls *a,b, c* and c_2 in higher plants, algal and natural phytoplankton. **Biochem. Physiol. Planzen** (BPP) Bd., v. 167S, p. 191-194, 1975.

LUND, J. W. G.; KIPLING, C.; CREN, E. D. The Inverted Microscope Method of Estimating Algal Numbers, And Statistical Basis of Estimation by Counting. **Hydrobiologia**. v.11, p. 143-170, 1958

LI, X.; XU, H.; WU, Q. Large-scale biodiesel production from microalga Chlorella protothecoides through heterotrophic cultivation in bioreactors. **Biotechnol. Bioeng.**, 98(4), 764-771. 2007.

LORENZEN, C. J. Determination of chlorophyll and phaeopigment: spectrophotometric equations. **Linhol. Oceanogr.**, v. 12, p. 343-346, 1967.

LOURENÇO, S. de O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. São Carlos/SP: Ed. Rima, 2006. 588 p.

MAXWELL, E. L.; FOLGER, A. G.; HOGG, S. E. **Resource Evaluation and Site Selection for Microalgae Production Systems.** U.S. Department of Energy, Colorado: Solar Energy Research Institute, 1985. 99 p.

MOHEIMANI, N. R.; BOROWITZKA, M. A. The long-term culture of the coccolithophore Pleurochrysis carterae (Haptophyta) in outdoor raceway ponds. **J. Appl. Phycol.**, v. 18, 703-712, 2006.

MOLINA, E.; FERNÁNDEZ, J.; ACIÉN, F.G.; CHISTI, Y. Tubular photobioreactor design for algal cultures. **Journal of Biotechnology** v. 92, n. 2, 28, p 113–131, 2001.

OWENS, T.G.; GALLAGHER, J.C. & ALBERTE, R.S. Photosynthetic light-harvesting function of violaxanthin in *Nannochloropsis* spp. (Eustigmatophyceae). ***J. Phycol***., 23, p. 79-85, 1987.

PAL, D.; KHOZIN-GOLDBERG, I.; COHEN, Z.; BOUSSIBA, S. The effect of light, salinity and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 90, p. 1429-1441, 2011.

PARSONS, T. R., MAITA, Y. LALLI, C. M. Determination of chlorophylls and total carotenoids: Spectrophotometric method. In: PARSONS, T. R., MAITA, Y. LALLI, C. M. **A manual of chemical and biological methods for seawater analysis**. Oxford: Pergamon Press, p. 101-112, 1984.

RICHARDSON, K.; BEARDAL, J. & RAVEN, J. A.. Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies. ***New Phytol***., 92:157-191, 1983.

RICHMOND, A. Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: an overview. **Hydrobiologia**, 512, p. 33-37, 2004.

RICHMOND, A.; CHENG-WU, Z. Optimization of a flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp. outdoors. ***Journal of Biotechnology***, 85, p. 259-269, 2001.

RICHMOND, A.; CHENG-WU, Z.; ZARMI, Y. Efficient use of strong light for high photosynthetic productivity: interrelationships between the optical path, the optimal population density and cell-growth inhibition. ***Biomolecular Engineering***, 20, p. 229-226, 2003.

RIFFEL, D. B. **Unidade de osmose reversa acionada por energia solar fotovoltaica sem baterias: simulação, projeto e validação experimental.** Dissertação de Mestrado em Engenharia Elétrica. Universidade Federal do Ceará. 2005.

RODOLFI, L.; CHINI ZITTELLI, G.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G.; TREDICI, M. R. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnol Bioeng**, 102(1), p. 100-112, 2009.

ROY, S. 2000 Strategies for the minimization of UV-induced damage. In: de Mora, S.J.; S. Demers & M. Vernet (eds) **The effect of UV radiation in the marine environment.** Cambridge University Press, UK, pp 177-205.

SALDANHA-CORRÊA, F. M. P., GIANESELLA, S. M. F.; BARRERA-ALBA, J. J. A comparison of the retention capability among three different glass-fiber filters used for chlorophyll determinations. **Braz. J. Oceanogr.**, v. 52, n.3/4, p. 245-249, 2004.

SCHENK, P. M.; THOMAS-HALL, S. R.; STEPHENS, E.; MARX, U. C.; MUSSGNUG, J. H.; POSTEN, C.; KRUSE, O.; HANKAMER, B. Second generation biofuels: high–efficiency microalgae for biodiesel production. **Bioenerg. Res.**, v. 1, p. 20-43,2008.

SHEEHAN, J.; DUNAHAY, T.; BENEMANN, J.; ROESSLER, P. **A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program-Biodiesel from Algae.** National Renewable Energy Laboratory, Colorado:U.S. DOE, 1998. 328 p.

SIMIONATO, D.; SFORZA, E.; CARPINELI, E. C.; BERTUCCO, A.; GIACOMETTI, G. M.; MOROSINOTTO, T. Acclimation of Nannochloropsis gaditana to different illumination regimes: Effects on lipids accumulation. **Bioresource Technology**, 102, 2011, p. 6026-6032.

SUKENIK, A., CARMELI, Y. AND BERNER, T. (1989), Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the eustigmatophyte Nannochloropsis sp.. ***Journal of Phycology***, 25: 686–692, 2012.

TREDICI, M. Mass production of microalgae: photobioreators. In: RICHMOND, A. (Ed.) **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology.** England: Blackwell Plubishing, 2004. p. 178-214.

WEISSMAN, J. C.; TILLET, D. M.; GOEBEL, R. P. **Design and Operation of an Outdoor Microalgae Test Facility – Final Subcontract Report.** U.S. Department of Energy, Colorado: Solar Energy Research Institute, 1989. 68 p.

XU, L.; WEATHERS, P. J.; XIONG, X.; LIU, C. Microbial Bioreactors: Challenges and Opportunities. **Eng. Life Sci.,** 9(3), p. 178-189. 2009.

ZHU, C. J.; LEE, Y. K. Determination of biomass dry weight of marine microalgae. ***Journal of Applied Phycology***., 9, p. 189–194, 1997.

ZOU, N.; RICHMOND, A. Effect of light-path length in outdoor flat plate reactors on output rate of cell mass and of EPA in *Nannochloropsis* sp. **J. of Biotech.**, 70, p. 351-356, 1999.