**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA**

GERONIMO VIRGINIO TAGLIAFERRO

Cultivo da microalga *Chlorella minutissima* 26a em modo batelada e contínuo em fotobiorreatores de tanque de bolhas e *airlift*: influência do meio de cultivo no crescimento e composição da biomassa

**Lorena – SP
2017**

Geronimo Virginio Tagliaferro

Cultivo da microalga *Chlorella minutissima* 26a em modo batelada e contínuo em fotobiorreatores de tanque de bolhas e *airlift*: influência do meio de cultivo no crescimento e composição da biomassa

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências do programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de Conversão de Biomassa.

Orientador: Prof. Dr. Júlio Cesar dos Santos

Edição reimpressa e corrigida

Lorena – SP
Novembro, 2017

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

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Tagliaferro, Geronimo Virginio

Cultivo da microalga *Chlorella minutissima* 26a em modo batelada e contínuo em fotobiorreatores de tanque de bolhas e airlift: influência do meio de cultivo no crescimento e composição da biomassa / Geronimo Virginio Tagliaferro; orientador Júlio César Santos - ed. reimp., corr. - Lorena, 2017. 130 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2017
Orientador: Júlio César Santos

1. Biocombustíveis. 2. *Chlorella minutissima*. 3. Fotobiorreator airlift. 4. Lixiviado de aterro sanitário. 5. Biorremediação. I. Título. II. Santos, Júlio César, orient.

*Dedico este trabalho primeiramente a Deus, Jesus Cristo e Nossa Senhora
por toda luz, força, paz, misericórdia e amor recebido por eles.*

*À minha esposa Elisângela, meus filhos Sofia Maria e Vitor José
pelo amor, compreensão, carinho, união e motivação
incansável ao longo do processo de
elaboração deste trabalho.*

*À todos da minha família, especialmente à minha mãe
Maria Antônia e meu pai Virginio (in memoriam),
guerreiros incondicionais na
minha educação.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, Jesus Cristo, Nossa Senhora e todos os Santos e Anjos Celestes pela energia, força, luz, coragem, amor, misericórdia que recebi nos dias difíceis durante a realização deste trabalho. Glória e louvor a Deus! Obrigado Senhor.

À minha esposa Elisângela e meus filhos Sofia Maria e Vitor José pela alegria, amor incondicional e paciência durante essa caminhada.

À minha família, minha mãe Maria Antônia e meu Pai Virginio Tagliaferro Netto (*in memoriam*) pela motivação, apoio e fé nos momentos difíceis da vida.

Ao prof. Dr. Júlio Cesar dos Santos pela orientação, disposição, paciência, sugestões e alegria durante o trabalho realizado. Muito trabalho e boas risadas. Muito obrigado.

Ao prof. Dr. Carlão (*in memoriam*), foi o grande incentivador e referencial na minha carreira profissional.

Ao prof. Silvio Silvério da Silva, pela cooperação e parceria na realização do trabalho.

Ao prof. Dr. Messias Borges Silva pela disponibilidade de realização do projeto de pesquisa em microalgas.

À equipe do laboratório LBBSIM, Profa. Talita, Hully, Lucas, os alunos de iniciação científica Uilians, Antônio, Gabriel e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização do trabalho.

Ao prof. Dr. Hécio José Izário Filho e seu aluno Otávio pela cooperação durante o projeto.

Ao técnico Jaime Alves Capucho, pela contribuição no desenho do fotobiorreator *airlift*. Muito obrigado capucho, curte bastante sua merecida aposentadoria. Fique com Deus.

À empresa Vale Soluções Ambientais - VSA pela disponibilidade do lixiviado proveniente de aterro sanitário.

*“Dê ao mundo o melhor de você,
mas isso pode não ser o bastante.
Dê o melhor de você mesmo assim.”*

Madre Tereza de Calcutá

RESUMO

TAGLIAFERRO, G. V. **Cultivo da microalga *Chlorella minutissima* 26a em modo batelada e contínuo em fotobiorreatores de tanque de bolhas e *airlift*: influência do meio de cultivo no crescimento e composição da biomassa.** 2017. 130 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2017.

As microalgas têm sido objeto de diversos estudos visando-se à produção de biocombustíveis ou outros produtos de interesse dentro do conceito de biorrefinaria. Na produção de biocombustíveis, as microalgas têm sido utilizadas por apresentarem elevada produtividade em lipídeos e carboidratos. Para viabilização de seu uso como matéria prima, é fundamental o desenvolvimento de processos com elevada produção de biomassa. Os fatores que influenciam no crescimento e composição da biomassa microalgal incluem a seleção do biorreator, a concentração e natureza da fonte de nitrogênio e o tipo de cultivo com relação às fontes de carbono e energia (autotrófico, heterotrófico ou mixotrófico). Neste trabalho, a microalga *Chlorella minutissima* 26a foi cultivada em fotobiorreatores do tipo tanque de bolhas em modo batelada ou *airlift* de tubos concêntricos em modo contínuo. Em cultivo autotrófico, estes fotobiorreatores foram empregados para avaliação da influência da concentração de nitrato de sódio no meio de cultivo no crescimento microalgal, na composição química da biomassa e na produtividade em lipídeos, carboidratos, proteínas e biomassa seca. Foi analisado também o uso de lixiviado proveniente de aterro sanitário na composição do meio de cultivo em fotobiorreator *airlift* em processo mixotrófico contínuo, promovendo concomitante biorremediação do lixiviado empregado. Os resultados demonstraram que a concentração de nitrato no meio de cultivo influenciou o crescimento e a composição química da biomassa e, conseqüentemente, os valores de produtividade obtidos. Nos ensaios usando fotobiorreator de tanque de bolhas em batelada, a variação da concentração de nitrato de sódio no meio de 37,5 mg L⁻¹ para 150 mg L⁻¹ promoveu aumento da produtividade em lipídeos e carboidratos, com valores máximos de 105,2 ± 1,7 mg L⁻¹ d⁻¹ e 36,7 ± 0,6 mg L⁻¹ d⁻¹, respectivamente, obtidos com a maior concentração de nitrato avaliada. No cultivo usando o fotobiorreator *airlift* em processo contínuo, o aumento da concentração de nitrato de sódio de 75 mg L⁻¹ para 225 mg L⁻¹ resultou nos maiores valores de produtividade média no estado estacionário para biomassa, lipídeos, proteínas e carboidratos, os quais foram, respectivamente, de 188,6 ± 11,2 mg L⁻¹ d⁻¹, 92,8 ± 5,5 mg L⁻¹ d⁻¹, 37,7 ± 2,2 mg L⁻¹ d⁻¹ e 29,1 ± 1,7 mg L⁻¹ d⁻¹. Neste caso, quando a concentração de nitrato de sódio aumentou de 75 mg L⁻¹ para 150 mg L⁻¹, observou-se aumento no teor de lipídeos e redução no teor de carboidratos da biomassa, sem modificação composicional apreciável quando a concentração de nitrato de sódio foi elevada para 225 mg L⁻¹. O emprego do lixiviado diluído como meio de cultivo da *Chlorella minutissima* 26a resultou em elevados valores de produtividade em lipídeos, carboidratos, proteínas e biomassa, correspondendo a valores máximos de 232,0 ± 7,6, 95,3 ± 5,2, 33,4 ± 2,1 e 69,2 ± 3,0 mg L⁻¹ d⁻¹, respectivamente, dependendo da concentração de lixiviado no meio. O cultivo microalgal em lixiviado diluído resultou ainda em remoção de até 92,8% da demanda química de oxigênio, 90,5% do carbono orgânico total e 100% do nitrato presente no meio. Além disso, metais presentes foram removidos do meio durante o cultivo, resultando na remoção de até 63%, 72%, 100% e 67% para Cr, Fe, Al e Ba, respectivamente. O fotobiorreator *airlift* de tubos concêntricos demonstrou grande potencial para o cultivo da microalga *C. minutissima* em processo contínuo, incluindo a possibilidade de uso de lixiviado diluído na composição do meio para cultivo mixotrófico com sua concomitante biorremediação.

Palavras-Chave: Biocombustíveis. *Chlorella minutissima*. Fotobiorreator *airlift*. Lixiviado de aterro sanitário. Biorremediação.

ABSTRACT

TAGLIAFERRO, G. V. **Cultivation of microalgae *Chlorella minutissima* 26a in batch and continuous mode in bubble tank and airlift photobioreactors: influence of the culture medium in growth and biomass composition.** 2017. 130 p. Thesis (Doctor of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2017.

Microalgae have been the subject of different studies aimed at the production of biofuels or other products of interest within the concept of biorefinery. In the production of biofuels, microalgae have been used because they present high productivity in lipids and carbohydrates. In order to enable its use as a raw material, the development of processes with high biomass production is fundamental. Variables influencing the growth and composition of microalgal biomass include the selection of the bioreactor, the concentration and kind of the nitrogen source and the type of cultivation with respect to carbon and energy sources (autotrophic, heterotrophic or mixotrophic). In this work, the microalgae *Chlorella minutissima* 26a was cultivated in photobioreactors of two different kinds: bubble tank in batch mode or airlift of concentric tubes in continuous mode. In autotrophic cultivation, these photobioreactors were used to evaluate the influence of sodium nitrate concentration in the culture medium on microalgal growth, chemical composition of biomass and productivity in lipids, carbohydrates, proteins and dry biomass. The use of landfill leachate was also analyzed as a component of the culture medium in continuous airlift photobioreactor in a mixotrophic process, promoting concomitant bioremediation of the used leachate. The results showed that the concentration of nitrate in the culture medium influenced the growth and chemical composition of the biomass and, consequently, the productivity values obtained. In the assays using batch bubble tank photobioreactor, the variation in the sodium nitrate concentration in the medium from 37.5 mg L⁻¹ to 150 mg L⁻¹ promoted an increase of the productivity in lipids and in carbohydrates, with maximum values of 105.2 ± 1.7 mg L⁻¹ d⁻¹ and 36.7 ± 0.6 mg L⁻¹ d⁻¹, respectively, obtained with the highest evaluated nitrate concentration. In the cultivation using continuous *airlift* photobioreactor, the increase in sodium nitrate concentration from 75 mg L⁻¹ to 225 mg L⁻¹ resulted in higher values of average productivity in steady-state for biomass, lipids, proteins and carbohydrates, which were, respectively, of 188.6 ± 11.2 mg L⁻¹ d⁻¹, 92.8 ± 5.5 mg L⁻¹ d⁻¹, 37.7 ± 2.2 mg L⁻¹ d⁻¹ and 29.1 ± 1.7 mg L⁻¹ d⁻¹. In this case, when the sodium nitrate concentration increased from 75 mg L⁻¹ to 150 mg L⁻¹, there was an increase in lipid and a reduction in the carbohydrate content of the biomass, with no appreciable compositional modification when the sodium nitrate concentration was increased to 225 mg L⁻¹. The use of diluted leachate as a culture medium of *Chlorella minutissima* 26a resulted in high productivity values in lipids, carbohydrates, proteins and biomass, corresponding to maximum values of 232.0 ± 7.6, 95.3 ± 5.2, 33.4 ± 2.1 and 69.2 ± 3.0 mg L⁻¹ d⁻¹, respectively, depending on the landfill leachate concentration in the medium. The microalgal cultivation in diluted leachate also resulted in the removal of up to 92.8% of the chemical oxygen demand, 90.5% of the total organic carbon and 100% of the nitrate present in the medium. In addition, present metals were uptake from the medium during cultivation, resulting in a removal of up to 63%, 72%, 100% and 67% for Cr, Fe, Al and Ba, respectively. The airlift photobioreactor of concentric tubes demonstrated great potential for the cultivation of *C. minutissima* microalgae in a continuous process, including the possibility of using landfill leachate diluted in the medium composition for mixotrophic cultivation with its concomitant bioremediation.

Keywords: Biofuels. *Chlorella minutissima*. *Airlift* photobioreactor. Landfill leachate. Bioremediation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Dados de publicação sobre microalgas - pesquisa feita no site da Web of Science usando a palavra-chave “ <i>microalgae</i> ”: (a) quantidade de trabalhos publicados nos últimos dez anos; (b) relação entre total publicado em dez anos com o total publicado até o ano de 2016.....	32
Figura 2.2 - Imagem da microalga <i>Chlorella Pyrenoidosa</i>	33
Figura 2.3 - Representação esquemática da reprodução da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> : (a) célula vegetativa; (b) formação; (c) liberação dos autósporos; (d) célula vegetativa em maior aumento	35
Figura 2.4 - Esquema típico de uma lagoa fotossintética (<i>raceway pond</i>).....	35
Figura 2.5 – Avançados fotobiorreatores para produção de microalgas: (A) colunas de bolhas inclinado; (B) <i>airlift</i> de tubos concêntricos; (C) plano <i>airlift</i> ; (D) <i>airlift</i> tela plana da Subitec; (E) tubular com misturador estático Kunii; (F) tubular com aletas de agitação estática; (G) <i>airlift</i> com fluxo e geração de redemoinhos; (H) Couette Taylor.....	36
Figura 2.6 - Representação esquemática de diferentes tipos de reatores <i>airlift</i> (RALs)	37
Figura 2.7 – Processo integrado de produção do biodiesel e bioetanol proveniente de microalgas.....	42
Figura 3.1 – Fotobiorreatores tanque de bolhas utilizados para cultivo da microalga <i>Chlorella minutissima</i> 26a em meio f/2 com diferentes concentrações do nitrato de sódio.....	59
Figura 3.2 – Fotografias dos reatores de cultivo da microalga <i>Chlorella minutissima</i> 26a durante o preparo do inóculo em meio f/2: a) início do cultivo; b) final do cultivo com valores de absorbância em torno de 0,750.....	64
Figura 3.3 – Imagens dos fotobiorreatores tanque de bolhas no início (a) e após 21 dias (b) de cultivo com diferentes meios contendo nitrato de sódio. Os ensaios 1, 2, 3 e 4 foram preparados em meios contendo, respectivamente, 37,5, 75,0, 112,5 e 150, mg L ⁻¹ de NaNO ₃	65
Figura 3.4 - Imagem da microalga <i>Chlorella minutissima</i> 26a obtida por microscópio ótico com aumento de 600 vezes (a) e 1000 vezes (b), cultivada com 75,0 mg L ⁻¹ de nitrato de sódio	66
Figura 3.5 - Perfil de crescimento da microalga <i>Chlorella minutissima</i> 26a em função do tempo, avaliado pela medição da biomassa seca (mg L ⁻¹) (a), contagem celular (células mL ⁻¹) e absorbância (c), para os experimentos realizados com diferentes concentrações de nitrato de sódio no meio de cultivo.....	67
Figura 3.6 - Influência da concentração do nitrato de sódio no meio de cultivo na composição química da microalga <i>Chlorella minutissima</i> 26a avaliada pela quantidade de lipídeos e açúcares na composição da biomassa.....	69
Figura 3.7 – Conteúdo em carboidratos da biomassa microalgal bruta e após a extração dos lipídeos, em função da concentração do nitrato de sódio no meio de cultivo.....	70
Figura 4.1 - Diagrama esquemático do sistema de cultivo utilizado para o crescimento da microalga <i>C. minutissima</i> 26a. Fotobiorreator <i>airlift</i> com Tubos concêntricos (a), detalhes do sistema <i>airlift</i> interno (b)	81

Figura 4.2 - Perfil da biomassa (a) e concentração de nitrato remanescente (b) no fotobiorreator airlift de tubos concêntricos durante o processo batelada e contínuo com diferentes concentrações de nitrato no meio. THR – tempo de residência hidráulica.....	84
Figura 4.3 - Perfil de absorbância (a) e contagem celular (b) no fotobiorreator <i>airlift</i> de tubos concêntricos durante a fase batelada e processo contínuo com diferentes concentrações de nitrato no meio. THR – tempo de residência hidráulica.....	86
Figura 4.4 - Composição bioquímica da <i>Chlorella minutissima</i> 26a cultivada em meios com diferentes concentrações de nitratos em fotobiorreator <i>airlift</i> de tubos concêntricos em processo contínuo. Os dados correspondem à composição média em diferentes tempos de residência hidráulica (TRH).....	88
Figura 5.1 - Sistema de cultivo usado na produção da microalga <i>Chlorella minutissima</i> 26a em meio contendo lixiviado diluído: imagem do fotobiorreator vazio (a) e carregado com meio de cultivo (b)	102
Figura 5.2 – Imagem da microalga <i>Chlorella minutissima</i> 26a no fotobiorreator <i>airlift</i> durante o primeiro (a), segundo (b), terceiro (c) e quarto (d) dia de cultivo em meio contendo 5% (v/v) de lixiviado diluído.....	106
Figura 5.3 - Perfil da biomassa (a) e nitrato remanescente no meio (b) correspondentes ao cultivo realizado com diferentes concentrações de lixiviado (5, 7,5 e 10% (v/v)) usando fotobiorreator <i>airlift</i> de tubos concêntricos.....	107
Figura 5.4 - Perfil da absorbância a 680 nm (a) e número de células (b) correspondentes ao cultivo realizado com diferentes concentrações de lixiviado (5, 7,5 e 10% (v/v)) usando fotobiorreator <i>airlift</i> de tubos concêntricos.....	110
Figura 5.5 - Micrografias da microalga <i>Chlorella minutissima</i> 26a correspondentes ao cultivo realizado com diferentes concentrações de lixiviado usando fotobiorreator airlift de tubos concêntricos. Concentração de lixiviado na alimentação do reator: (a) 5% (v/v), (b, c) 10% (v/v).....	112
Figura 5.6 - Composição da biomassa de <i>Chlorella minutissima</i> 26a cultivada em meios com diferentes diluições de lixiviado no meio alimentado em fotobiorreator <i>airlift</i> de tubos concêntricos no processo contínuo durante o estado estacionário:(a) 5% v/v de lixiviado no meio; (b) 7,5% v/v de lixiviado no meio; (c) 10% v/v de lixiviado no meio	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Composição química de diferentes microalgas	31
Tabela 2.2 - Exemplos de condições empregadas e resultados obtidos em trabalhos da literatura nos quais diferentes tipos de fotobiorreatores foram empregados na produção de biomassa microalgal	39
Tabela 2.3 - Produtividade em biomassa e lipídeos para cultivos de microalgas em diferentes tipos de efluentes contendo concentrações iniciais variadas de nitrogênio total (NT) e fósforo total (PT).....	45
Tabela 2.4 – Exemplos de características de efluentes municipais e lixiviados.....	46
Tabela 3.1 – Composição do meio f/2 Guillard para crescimento microalgal	58
Tabela 3.2 – Variação da concentração de nitrato de sódio no meio de cultivo.....	59
Tabela 3.3 – Medidas de absorvância e contagem de células no inóculo preparado com 15 dias de cultivos em frascos Erlenmeyer.....	63
Tabela 3.4 - Composição dos carboidratos da biomassa bruta e após a extração dos lipídeos, extraída por hidrólise ácida e cultivada com diferentes concentrações de nitrogênio (média ± desvio padrão)	71
Tabela 3.5 – Influência da concentração de nitrato de sódio na taxa específica de crescimento e na produtividade em biomassa, lipídeos e carboidratos em cultivo batelada durante 21 dias de cultivo autotrófico em batelada (média ± desvio padrão)	73
Tabela 4.1 - Composição dos carboidratos após hidrólise ácida da biomassa cultivada em estado estacionário (TRH ₃) sob diferentes concentrações de nitrato de sódio no meio (média ± desvio padrão)	90
Tabela 4.2 - Influência da concentração de nitrato na produtividade em lipídeos, carboidratos, proteína e biomassa durante o cultivo contínuo em fotobiorreator <i>airlift</i> de tubos concêntrico no estado estacionário (média ± desvio padrão) com $D = 0,006 \text{ h}^{-1}$	91
Tabela 5.1 - População média no estado estacionário e o tamanho médio das células de microalgas em função da concentração de lixiviado no meio na corrente de alimentação do fotobiorreator <i>airlift</i> durante o cultivo contínuo (média ± desvio padrão)	111
Tabela 5.2 - Composição em açúcares no estado estacionário determinada após hidrólise ácida da biomassa microalgal cultivada em processo contínuo sob diferentes concentrações de lixiviado no meio no estado estacionário. Análise realizada por cromatografia líquida de alto desempenho no hidrolisado obtido (média ± desvio padrão)	116
Tabela 5.3 - Influência da concentração do lixiviado de aterro sanitário no meio de cultivo na produtividade em lipídeos, carboidratos, proteínas e biomassa de <i>Chlorella minutissima</i> 26a durante o cultivo contínuo em fotobiorreator <i>airlift</i> de tubos concêntrico no estado estacionário (média ± desvio padrão) com $D = 0,009 \text{ h}^{-1}$	117
Tabela 5.4 – Resultados de análise de DQO, COT e NO ₃ -N do meio contendo diferentes concentrações de lixiviado antes e após o cultivo contínuo de <i>Chlorella minutissima</i> 26a (dados obtidos da corrente de saída do reator em estado estacionário).....	119

Tabela 5.5 - Resultados de concentração de metais e remoção destes do meio contendo diferentes concentrações de lixiviado antes e após o cultivo contínuo de *Chlorella minutissima* 26a (dados obtidos da corrente de saída do reator em estado estacionário)..120

LISTA DE SIGLAS

APHA	American Public Health Association
ATP	Adenosina Trifosfato
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COT	Carbono Orgânico Total
DQO	Demanda Química de Oxigênio
NT	Nitrogênio Total
PET	Polietileno Tereftalato
PT	Fósforo Total
RAL	Reator <i>Airlift</i>
RID	Detector de Índice de Refração
TRH	Tempo de Residência Hidráulica
UV	Ultra Violeta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
Referências.....	27
2 USO DAS MICROALGAS NA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS: ASPECTOS GERAIS E FOTOBIORREATORES	29
2.1 Microalgas: composição química, metabolismo e a sua importância para a pesquisa ..	30
2.2 Estrutura e reprodução das microalgas do gênero <i>Chlorella</i>	33
2.3 Produção de microalgas em fotobiorreatores.....	35
2.4 Produção de biocombustíveis a partir de microalgas: produção integrada de etanol e biodiesel	39
2.5 Uso de águas residuais ou lixiviado como meio de cultivo para a produção de microalgas.....	43
2.6 Conclusão.....	47
Referências.....	48
3 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL EM CULTIVO BATELADA EM FOTOBIORREATOR TANQUE DE BOLHAS.....	55
3.1 Introdução	56
3.2 Materiais e Métodos.....	57
3.2.1 Microrganismo e preparo do inóculo	57
3.2.2 Cultivo batelada em fotobiorreator tanque de bolhas	58
3.2.3 Avaliação do efeito da concentração da fonte de nitrogênio na composição da biomassa microalgal obtida em cultivo autotrófico em fotobiorreator tanque de bolhas	59
3.2.4 Acompanhamento do crescimento da biomassa microalgal	60
3.2.5 Colheita da biomassa microalgal	60
3.2.6 Caracterização da biomassa microalgal	60
3.2.7 Determinação da taxa específica de crescimento (μ) e produtividade (P).....	62
3.3 Resultados e Discussão	63
3.3.1 Avaliação da reprodutibilidade do crescimento das microalgas durante o preparo do inóculo	63
3.3.2. Avaliação do efeito da concentração da fonte de nitrogênio no crescimento e composição da biomassa na <i>Chlorella minutissima</i> 26a cultivada em fotobiorreator tanque de bolhas	64
3.4 Conclusão.....	74
Referências.....	74
4 CULTIVO CONTÍNUO DE <i>Chlorella minutissima</i> 26a EM FOTOBIORREATOR AIRLIFT DE TUBOS CONCÊNTRICOS COMO ALTERNATIVA PARA BIORREFINARIAS “3G”	77
4.1 Introdução	78

4.2 Materiais e Métodos.....	80
4.2.1 Microrganismo e preparo do inóculo.....	80
4.2.2 Fotobiorreator airlift de Tubos concêntricos.....	80
4.2.3 Cultivo batelada no fotobiorreator airlift de tubos concêntricos.....	81
4.2.4 Cultivo contínuo em fotobiorreator airlift de tubos concêntricos.....	82
4.2.5 Métodos Analíticos.....	82
4.3 Resultados e Discussão.....	83
4.3.1 Perfil de crescimento em batelada da <i>Chlorella minutissima</i> 26a em fotobiorreator airlift de tubos concêntricos.....	83
4.3.2 Efeito da concentração de nitrato de sódio no crescimento microalgal em fotobiorreator <i>airlift</i> de tubos concêntricos em processo contínuo.....	83
4.3.3 Efeito da variação da concentração de nitrato de sódio na composição da biomassa produzida em fotobiorreator <i>airlift</i> de tubos concêntricos em processo contínuo.....	87
4.4 Conclusão.....	92
Referências.....	92
5 CULTIVO CONTÍNUO DE <i>CHLORELLA MINUTISSIMA</i> 26A EM MEIO CONTENDO LIXIVIADO DILUÍDO DE ATERRO SANITÁRIO USANDO FOTOBIORREATOR <i>AIRLIFT</i> DE TUBOS CONCÊNTRICOS.....	97
5.1 Introdução.....	98
5.2 Materiais e Métodos.....	100
5.2.1 Espécie, armazenamento e cultivo do inóculo.....	100
5.2.2 Procedência e armazenamento do lixiviado de aterro sanitário.....	101
5.2.3 Cultivo batelada e continuo da microalga em fotobiorreator <i>airlift</i> de tubos concêntricos.....	101
5.2.4 Métodos analíticos.....	103
5.3 Resultados e discussão.....	105
5.3.1 Cultivo da microalga <i>Chlorella minutissima</i> 26a em batelada em fotobiorreator <i>airlift</i> de tubos concêntricos em meio contendo lixiviado: determinação da taxa específica máxima de crescimento microbiano.....	105
5.3.2 Efeito da concentração do lixiviado no meio de cultivo da microalga <i>Chlorella minutissima</i> 26a usando o fotobiorreator <i>airlift</i> de tubos concêntricos em processo contínuo.....	106
5.3.3 Efeito da concentração do lixiviado diluído na composição e produtividade da biomassa produzida no fotobiorreator <i>airlift</i> de tubos concêntricos em processo continuo.....	112
5.3.4 Efeito do cultivo da microalga <i>Chlorella minutissima</i> no tratamento de lixiviado diluído em fotobiorreator <i>airlift</i> em processo contínuo.....	118
5.4 Conclusão.....	121
Referências.....	122
6 CONCLUSÕES GERAIS E RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	127

6.1 Conclusões gerais	127
6.2 Recomendações para trabalhos futuros.....	128
APÊNDICES	129

1 INTRODUÇÃO

O aumento do consumo energético e as crescentes preocupações com as alterações climáticas provocadas pela emissão de gases do efeito estufa têm impulsionado o estudo e a produção de biocombustíveis. Além disso, a instabilidade política de alguns países produtores de petróleo e o recurso finito dos combustíveis fósseis têm estimulado o desenvolvimento de sistemas e tecnologias mais eficientes e a diversificação de fontes de suprimentos, especialmente de energias limpas e renováveis (DOSHI et al., 2016).

Na perspectiva das questões relacionadas aos biocombustíveis, as microalgas estão ganhando grande atenção como alternativa de fonte renovável de biomassa para a produção de biodiesel e bioetanol, sendo que, quando obtidos a partir desta fonte, estes são chamados “biocombustíveis de terceira geração (3G)”. De fato, a utilização de microalgas como matéria-prima para a produção de biocombustíveis apresenta vantagens devido algumas de suas características como elevada eficiência de conversão de fótons (pela fotossíntese), rápido crescimento em curto intervalo de tempo, facilidade de acúmulo e síntese de carboidratos e lipídeos, possibilidade de crescimento em efluentes contendo compostos orgânicos, promovendo seu tratamento, e ainda pequena área de cultivo e menor impacto ambiental se comparado com culturas vegetais comumente empregadas para este fim (RAZZAK et al., 2017).

O uso de microalgas para a produção de biodiesel baseia-se na capacidade de diversas espécies de acumular lipídeos sob a forma de ácidos graxos similares aos produzidos pelas plantas superiores. Esses lipídeos, depois de extraídos, podem ser transesterificados para a produção de produção de biodiesel (ELRAYIES, 2018).

Além do biodiesel, estes microrganismos podem ser úteis na produção de bioetanol. Microalgas como as dos gêneros *Chlorella*, *Dunaliella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus* e *Spirulina* são conhecidos por conterem uma grande quantidade de amido e glicogênio, úteis como matérias-primas para produção de bioetanol (JOHN et al., 2011), e ainda contém outros açúcares provenientes da parede celular. Dessa forma, pode-se idealizar um processo integrado no qual os lipídeos sejam extraídos para produção de biodiesel e o material sólido resultante do processo de extração (rico em carboidratos) seja aproveitado para síntese de bioetanol.

O bioetanol tem despertado grande interesse mundial como combustível alternativo sendo, no entanto, importante a realização de estudos visando-se garantir que a expansão

de seu uso não seja obstruída por restrições de disponibilidade de matéria-prima. Neste sentido, as microalgas são uma fonte alternativa interessante que apresenta benefícios ambientais e econômicos. Estudos indicam que as microalgas têm potencial para serem utilizadas como substrato na produção de bioetanol em escala comercial, mantendo a sustentabilidade do processo (DOSHI et al., 2016; KIM et al., 2014; DOAN et al., 2012; MIRANDA; PASSARINHO; GOUVEIA, 2012). Além de biocombustíveis, as microalgas podem ser empregadas como matéria prima para obtenção de uma série de outros compostos em uma biorrefinaria de terceira geração, incluindo bio-óleo, glicerina, eletricidade, entre outros (SILVA et al., 2016).

O crescimento microalgal é resultado da interação entre fatores biológicos, físicos e químicos. Os fatores biológicos estão relacionados às próprias taxas metabólicas da espécie cultivada e sua interação com outros organismos e com o meio. Quanto aos fatores físicos e químicos, estes se referem ao tipo de meio de cultivo e condições como iluminação, temperatura, transferência gás-líquido, salinidade e disponibilidade de nutrientes. A produtividade e composição química da biomassa microalgal também dependem desses fatores mencionados, sendo um dos principais a fonte de nitrogênio. Estudos indicam que a variação da concentração ou o tipo da fonte de nitrogênio podem aumentar ou diminuir o conteúdo lipídico ou de carboidrato nas células, como também o crescimento da biomassa (KIM; BAE; LEE, 2016; HO et al., 2013a).

Também é fundamental a seleção correta do biorreator, pois estes promovem o controle e a melhoria: da taxa de transferência de massa gás-líquido, do risco de contaminação, da produtividade por área, da densidade biomássica e redução do custo da colheita (OLIVIERI; SALATINO; MARZOCHELLA, 2014). Entre as alternativas disponíveis, o fotobiorreator *airlift* pode ser utilizado para cultivo microalgal por apresentar melhor interação entre a fase gasosa e líquida, maior controle dos parâmetros estudados e maior produtividade em biomassa comparado com outros sistemas fechados de cultivo (MERCHUK; GLUZ, 2002).

O cultivo das microalgas pode ser feito de três formas, em função da flexibilidade de seu metabolismo: a fonte de carbono usada pelo microrganismo pode ser exclusivamente inorgânica (CO_2), sendo o metabolismo chamado de autotrófico; a fonte de carbono usada pode ser exclusivamente orgânica, como glicose, acetato, uréia ou outros, sendo o metabolismo chamado de heterotrófico; ambas as fontes de carbono, orgânica e inorgânica, podem estar disponíveis e serem metabolizadas, sendo o metabolismo chamado de mixotrófico (BRENNAN; OWENDE, 2010). A escolha do metabolismo ou sua

vantagem no cultivo microalgal depende do objetivo que se quer do processo. Se a finalidade é capturar o CO₂ do meio ambiente utiliza-se o metabolismo autotrófico. Mas se o alvo for a biorremediação de compostos orgânicos no meio de cultivo, então se utiliza o metabolismo heterotrófico. Já se o objetivo é utilizar os dois processos, em sinergia, então se utiliza o metabolismo mixotrófico.

Com relação aos cultivos heterotrófico e mixotrófico, trabalhos têm sido realizados empregando meio contendo efluentes. Realmente, o cultivo de microalgas em águas residuais tem sido estudado por pesquisadores em todo o mundo, pois é a maneira mais econômica e ambientalmente eficiente de produção de biocombustíveis. As microalgas são capazes de se desenvolver, assimilando os nutrientes e compostos orgânicos contidos nas águas residuais e promovendo simultaneamente seu tratamento (RAMSUNDAR et al., 2017; RAZZAK et al., 2017). Quando realizado em fotobiorreatores, o cultivo da microalga em águas residuais é mixotrófico e, neste caso, a vantagem é a integração da captura de CO₂ do ambiente e dos compostos orgânicos no meio, e ainda maior produtividade da biomassa e dos constituintes como lipídeos e carboidratos. Da mesma forma que se utilizam águas residuais para o cultivo de microalgas, pode-se também utilizar o lixiviado proveniente de aterros sanitários como meio de cultivo microalgal, pois este resíduo contém os nutrientes e compostos orgânicos necessários para a formação da biomassa microalgal (ZHAO et al., 2014).

Neste contexto, no presente projeto, avaliaram-se as condições de cultivo da microalga *Chlorella minutissima* 26a visando à maximização da produção de biomassa para a produção de biocombustíveis ou outros compostos de interesse. Esta espécie foi selecionada com base em trabalhos prévios realizados no Laboratório de meio Ambiente na Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo (EEL-USP) e trabalhos da literatura, os quais têm demonstrado seu potencial para produção de biodiesel e bioetanol (BREDDA et al., 2016; AREMU et al., 2015; ARORA et al., 2015; CAO et al., 2014; REIS, 2014). Particularmente, no presente projeto foram feitos estudos de cultivo com diferentes meios e condições, visando-se à obtenção de maior produtividade em biomassa e avaliando-se a influência destas condições na composição do microrganismo algal em lipídeos, carboidratos e proteínas. Os experimentos foram realizados em fotobiorreatores tipo tanque de bolhas ou tubular *airlift*, sendo empregado meio sintético para cultivo autotrófico, ou lixiviado proveniente de aterro sanitário para cultivo mixotrófico. Trata-se do primeiro trabalho realizado com cultivo da microalga *Chlorella minutissima* 26a

utilizando o fotobiorreator *airlift* de tubos concêntricos em meio sintético ou com lixiviado proveniente de aterro sanitário usando processo contínuo.

O objetivo geral desse trabalho foi contribuir para o desenvolvimento de tecnologias integradas de produção de biocombustíveis e outros produtos de interesse utilizando microalgas como fonte de matéria-prima, avaliando-se o cultivo de *Chlorella minutissima* 26a em diferentes meios de cultivo, reatores e modos de condução, verificando a influência das diferentes condições testadas na produtividade em biomassa e na composição da microalga. Neste sentido, teve-se como objetivos específicos:

- ✓ Avaliar diferentes meios de cultivo autotrófico para a microalga *Chlorella minutissima* 26a, verificando-se a influência da concentração da fonte de nitrogênio no meio na produção de biomassa e características da sua composição química como quantidade de lipídeos, carboidratos, proteínas e cinzas;
- ✓ Caracterizar da biomassa obtida com relação à quantidade de óleos e composição em carboidratos antes e após a etapa de extração dos lipídeos;
- ✓ Cultivo em fotobiorreatores de tanque e *airlift* visando-se a produção de biomassa microalgal em modo batelada e contínuo;
- ✓ Avaliar da produção e composição química da biomassa microalgal em meio contendo lixiviado (efluente proveniente de aterro sanitário) em fotobiorreator *airlift* em processo contínuo.

Referências

- AREMU, A. O. et al. Manipulation of nitrogen levels and mode of cultivation are viable methods to improve the lipid, fatty acids, phytochemical content, and bioactivities in *Chlorella minutissima*. **Journal of Phycology**, v. 51, n. 4, p. 659–669, 2015.
- ARORA, N. et al. Synergistic dynamics of nitrogen and phosphorous influences lipid productivity in *Chlorella minutissima* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 79–87, 2015.
- BREDDA, E. H. et al. Evaluation of oil productivity of *Chlorella minutissima* cultivated in two homemade photobioreactors (bubble column and tank). **Journal of Multidisciplinary Engineering Science and Technology**, v. 3, n. 11, p. 6060–6066, 2016.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae - a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557–577, 2010.
- CAO, J. et al. Significance evaluation of the effects of environmental factors on the lipid accumulation of *Chlorella minutissima* UTEX 2341 under low-nutrition heterotrophic condition. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 177–184, 2014.
- DOAN, Q. C. et al. Microalgal biomass for bioethanol fermentation: Implications for hypersaline systems with an industrial focus. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 79–88, 2012.
- DOSHI, A. et al. Economic and policy issues in the production of algae-based biofuels: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 64, p. 329–337, 2016.
- ELRAYIES, G. M. Microalgae: Prospects for Greener Future Buildings. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 81, p. 1175–1191, 2018.
- HO, S. H. et al. Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 157–165, 2013.
- JOHN, R. P. et al. Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 186–193, 2011.
- KIM, G.; BAE, J.; LEE, K. Nitrate repletion strategy for enhancing lipid production from marine microalga *Tetraselmis* sp. **Bioresource Technology**, v. 205, p. 274–279, 2016.
- KIM, K. H. et al. Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 47–54, 2014.
- MERCHUK, J. C.; GLUZ, M. Bioreactors, air-lift reactors. In: Encyclopedia of Bioprocess Technology. Israel: John Wiley and Sons, 2002. p. 320–324.
- MIRANDA, J. R.; PASSARINHO, P. C.; GOUVEIA, L. Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 342–348, 2012.
- OLIVIERI, G.; SALATINO, P.; MARZOCHELLA, A. Advances in photobioreactors for intensive microalgal production: Configurations, operating strategies and applications. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 89, n. 2, p. 178–195, 2014.

RAMSUNDAR, P. et al. Assessment of municipal wastewaters at various stages of treatment process as potential growth media for *Chlorella sorokiniana* under different modes of cultivation. **Bioresource Technology**, v. 227, p. 82–92, 2017.

RAZZAK, S. A. et al. Biological CO₂ fixation with production of microalgae in wastewater - A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, p. 379–390, 2017.

REIS, C. E. R. **Construção de um biorreator tubular para crescimento da microalga *Chlorella sp.* em meio de lixiviado**. 2014. 49 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Química) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

SILVA, C. M. et al. A comparison between microalgae virtual biorefinery arrangements for bio-oil production based on lab-scale results. **Journal of Cleaner Production**, v. 130, p. 58–57, 2016.

ZHAO, X. et al. Characterization of microalgae-bacteria consortium cultured in landfill leachate for carbon fixation and lipid production. **Bioresource Technology**, v. 156, p. 322–328, 2014.

2 USO DAS MICROALGAS NA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS: ASPECTOS GERAIS E FOTOBIORREATORES

RESUMO

Nos últimos anos, atenção especial vem sendo dada às microalgas devido a algumas características importantes destes microrganismos como fácil e rápido crescimento em pequenos espaços físicos e capacidade de realizar fotossíntese e consequentemente de captar CO₂ do meio ambiente. A principal motivação no cultivo das microalgas é a utilização dos componentes da biomassa, incluindo lipídeos e carboidratos, para produção de biocombustíveis, particularmente biodiesel e etanol, além de outros compostos de interesse. Porém, a otimização da produtividade em biomassa e da quantidade dos componentes que a compõe depende de estudos que considerem fatores como a espécie de microalga utilizada, a fonte e concentração dos nutrientes no meio, o tipo de biorreator utilizado e a frequência e intensidade da luz empregada. Em especial com relação à composição do meio, cultivos mixotróficos de microalgas em meios contendo efluentes e lixiviados de aterro sanitário têm despertado interesse pela possibilidade de uso destes para crescimento da biomassa microalgal concomitantemente à sua biorremediação. Neste capítulo, é apresentada uma breve revisão sobre aspectos importantes das microalgas e seu potencial na produção de biocombustíveis e biorremediação de águas residuais e lixiviados, incluindo uma discussão sobre os diferentes tipos de fotobiorreatores empregados em seu cultivo. Inicialmente, as características das microalgas são apresentadas, com ênfase nas do gênero *Chlorella*, as quais apresentam elevado potencial devido a características como rápido crescimento. Em seguida, são apresentados alguns fotobiorreatores que têm sido desenvolvidos para crescimento microalgal, finalizando-se com uma revisão sobre o cultivo destes microrganismos em meios baseados em efluentes e lixiviados de aterro sanitário. É dada uma visão geral sobre aspectos importantes ligados ao interesse industrial pelo cultivo das microalgas, demonstrando seu potencial para o desenvolvimento de biorrefinarias.

Palavras-chave: Microalgas. Biocombustíveis. Fonte de nitrogênio. Fotobiorreator *airlift*. Lixiviado.

2.1 Microalgas: composição química, metabolismo e a sua importância para a pesquisa

O termo microalgas não tem valor taxonômico e engloba microrganismos algais com capacidade fotossintética. Sua caracterização implica a consideração de uma série de critérios (DERNER et al., 2006), dentre eles, a natureza química dos produtos de reserva celular, dos pigmentos e dos constituintes da parede celular, e outros aspectos citológicos e morfológicos quanto à ausência ou presença de flagelos, formação do núcleo e divisão celular, presença e caracterização dos cloroplastos e a possível conexão entre o retículo endoplasmático e a membrana nuclear (TOMASELLI, 2004).

As microalgas, em geral, podem variar enormemente em tamanho, morfologia e outras características. Apresentam grande interesse para pesquisadores devido à facilidade e velocidade de cultivo, fixação de CO₂, amplo crescimento em ambientes extremos e alta tolerância a contaminantes, entre outros fatores (GRIFFITHS; HARRISON, 2009). São extremamente adaptáveis a diversos habitats como água doce, salobra, ou água do mar e possuem resistência que possibilita o crescimento em diferentes temperaturas e condições extremas de pH (FALKOWSKI et al., 2004).

A composição química das microalgas não é um fator intrínseco a cada espécie, mas varia com as condições ambientais. Grandes variações na composição química das microalgas foram relatadas em resposta a parâmetros como a temperatura, a iluminação, o valor do pH do meio, nutrientes minerais, fornecimento de CO₂, etc. Para se obter biomassa algal com composição desejada, a proporção de diferentes constituintes de diversas algas pode ser modificada de maneira específica através da variação das condições de cultura, como por exemplo: depleção de nitrogênio (HO et al., 2013a) ou fósforo no meio ou ainda alteração de fatores físicos como a pressão osmótica, a intensidade da radiação, a densidade populacional e crescimento na presença ou ausência de luz (BECKER, 1994).

A composição da biomassa microalgal apresenta cerca de 60 – 80% de água, sendo em peso seco usualmente composta de 98% de moléculas orgânicas e 2% de inorgânicas. As moléculas orgânicas presentes são predominantemente proteínas, carboidratos e lipídeos que constituem cerca de 90% do total (BUMBAK et al., 2011). Algumas microalgas como *Chlorella*, *Dunaliella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus* e *Spirulina* se destacam por apresentarem altas concentrações de amido e glicogênio em sua composição, além de possuírem capacidade de produzir celulose (JOHN et al., 2011).

A quantidade total de carboidratos nas microalgas tem sido caracterizada em fração mássica seca, o que inclui tantos os amidos como os carboidratos estruturais derivados de monossacarídeos, como por exemplo, glicose, manose, galactose e arabinose. No entanto, o rendimento de carboidratos na biomassa depende da microalga selecionada e das condições de cultura (DOAN et al., 2012). Conforme mostrado na Tabela 2.1, a composição da biomassa microalgal inclui ampla faixa de variações, com porcentagem de massa seca variando de 6 a 71% em proteína, de 4 a 64 % em carboidrato e 2 a 40 % em lipídeos.

Tabela 2.1 - Composição química de diferentes microalgas em %

Fonte de alimentos/microalgas	Proteína	Carboidrato	Lipídeos
<i>Scenedemus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Scenedemus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2
<i>Spirogyra sp.</i>	6-20	33-64	11-21
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7

Fonte: Adaptado (BECKER, 1994).

Estes microrganismos podem crescer de diferentes formas com base nos nutrientes fornecidos. Quando utilizam CO₂ como única fonte de carbono, seu metabolismo é chamado de autotrófico; quando são utilizados nutrientes orgânicos como fonte de carbono, tais como a glicose, o metabolismo é chamado de heterotrófico e, por fim, quando o meio tem tanto CO₂ quanto nutrientes orgânicos como fontes de carbono, o metabolismo é chamado de mixotrófico (BRENNAN; OWENDE, 2010).

Em função de sua flexibilidade metabólica e composicional, diversos estudos estão sendo realizados com as microalgas nos mais diversos campos, tais como: no tratamento de águas residuais de inúmeros processos industriais, para a detoxificação biológica e remoção de metais pesados e como bioindicadores para detecção de substâncias tóxicas (efluentes industriais, detergentes, herbicidas, etc.) (RAMSUNDAR et al., 2017; RAZZAK et al., 2017; REYIMU; OZÇIMEN, 2017; SINGH; TIWARI; DAS, 2016). Na agricultura, a biomassa pode ser empregada como biofertilizante do solo. Além de sintetizar toxinas, as

microalgas podem produzir uma gama de moléculas bioativas com propriedades antibióticas, anticâncer, anti-inflamatórias, antivirais, redutoras do colesterol e com outras atividades farmacológicas (BRASIL et al., 2017; BARBA, 2016).

Nos últimos dez anos vem aumentando a quantidade de trabalhos publicados referente às microalgas. A Figura 2.1 mostra a quantidade de publicação dos trabalhos nos últimos dez anos e compara com o total publicado até o ano de 2016. No ano de 2007 foram publicados anualmente 386 artigos referentes às microalgas, enquanto que em 2016 a quantidade foi de 2372 artigos, sendo o aumento de publicação anual, de 2007 para 2016, de 514,5% (Figura 2.1a).

Figura 2.1 - Dados de publicação sobre microalgas - pesquisa feita no site da Web of Science usando a palavra-chave “*microalgae*”: (a) quantidade de trabalhos publicados nos últimos dez anos; (b) relação entre total publicado em dez anos com o total publicado até o ano de 2016

Fonte: Adaptado (THOMSON REUTERS, 2017).

A quantidade de artigos publicados nos últimos dez anos foi de 12214 de um total de 16712 até 2016. Isso demonstra que no período de 2007 até 2016, a quantidade de artigos publicados representam 73,1% do total (Figura 2.1b). Portanto o interesse de pesquisar microalgas nos últimos anos demonstra a importância de estudar esses microrganismos e o grande potencial existente para a pesquisa científica.

Em particular, a grande quantidade de lipídeos e carboidratos nas microalgas tem resultado em diversos trabalhos de pesquisa visando à produção de biocombustíveis, como biodiesel e etanol (DOSHI et al., 2016; SHERIDAN et al., 2016; DRAGONE et al., 2010).

Quando obtidos a partir desta fonte, os biocombustíveis são chamados “de terceira geração (3G)”. Nos últimos anos, pesquisas vêm sendo desenvolvidas nos laboratórios da Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo (EEL-USP) visando à obtenção de biocombustíveis empregando espécies de microalgas do gênero *Chlorella* (BREDDA et al., 2016; REIS, 2014). O foco dos trabalhos tem sido a produção de biodiesel. Entretanto, buscando-se o aproveitamento integral da matéria-prima, é fundamental o desenvolvimento de estudos focando seu potencial para a produção de bioetanol, visando-se a uma futura biorrefinaria integrada para obtenção de ambos os combustíveis. De fato, há na literatura alguns trabalhos empregando espécies de *Chlorella* para produção de bioetanol (KYUNG; OH; YEOL, 2015; KIM et al., 2014; HO et al., 2013a).

2.2 Estrutura e reprodução das microalgas do gênero *Chlorella*

A primeira microalga do gênero *Chlorella* foi descrita por Beijerinck em 1890, sendo a espécie chamada *Chlorella vulgaris* (RICHMOND, 2004). Desde então, um grande número de espécies de *Chlorella* vêm sendo isoladas e caracterizadas. As células de *Chlorella* têm formato esférico e elipsoidal (Figura 2.2), com tamanhos variando entre 2 e 10 µm de diâmetro e paredes distintas e delgadas, contendo um núcleo. São encontradas em diversos habitats tais como água doce e do mar, sendo que no solo vivem livremente ou simbioticamente com líquens ou protozoários (FRANCESCHINI et al., 2009; RICHMOND, 2004).

Figura 2.2 - Imagem da microalga *Chlorella Pyrenoidosa*

Fonte: Adaptado (HEALTHY EATING, 2017).

Estas microalgas crescem rapidamente, preferem condições de alta concentração de nutrientes e luminosidade e têm rápida absorção de nutrientes facilitada pela razão superfície/volume, sendo mais competitivas em ambientes eutróficos e estáveis, ou seja, com baixo estresse e baixa intensidade de distúrbio (FRANCESCHINI et al., 2009).

As espécies *Chlorella* se reproduzem assexuadamente pela formação de dois, quatro ou oito autósporos, que são liberados por rompimento da parede celular materna (FRANCESCHINI et al., 2009). O processo ocorre em três etapas: crescimento (aumento da célula); maturação (aumento da quantidade de materiais nucleares por mitose); e divisão (divisão das células mães em células filhas) (Figura 2.3) (RICHMOND, 2004). Sua rápida reprodução resulta em uma alta taxa de crescimento que possibilita grande formação de biomassa em curto intervalo de tempo.

As microalgas eucarióticas do gênero *Chlorella* possuem uma membrana verdadeira que delimita o núcleo, o qual contém a maior parte do genoma distribuído em um conjunto de cromossomos. Eles têm citoplasma dividido em compartimentos e organelas dedicados a funções específicas delimitadas por membranas como complexo de Golgi, mitocôndrias, retículo endoplasmático, vacúolos, centríolos e plastídios. Uma estrutura importante do ponto de vista biotecnológico é a parede celular, a qual, no gênero *Chlorella*, é usualmente composta por camadas microfibrilares de celulose rodeadas por uma camada amorfa polissacarídica laminada (RICHMOND, 2004). Têm-se ainda, dentro da célula microalgal, os leucoplastos, nos quais amido é armazenado em formato de grãos. Dessa forma, os carboidratos provenientes das microalgas para a produção de bioetanol podem ser provenientes da parede celular e do interior da célula microalgal (HERNÁNDEZ et al., 2015; TAKEDA, 1988), sendo necessários estudos visando ao estabelecimento de condições que favoreçam elevada produção de biomassa e compreensão da influência das condições de cultivo na composição da microalga. Neste sentido, o uso de fotobiorreatores é uma ferramenta importante (FERNANDES et al., 2014; GARCÍA CAMACHO et al., 1999).

Figura 2.3 - Representação esquemática da reprodução da microalga *Chlorella vulgaris*: (a) célula vegetativa; (b) formação; (c) liberação dos autósporos; (d) célula vegetativa em maior aumento

Fonte: Adaptado (FRANCESCHINI et al., 2009).

2.3 Produção de microalgas em fotobiorreatores

Os sistemas comumente empregados para a produção de microalgas em cultivos autotróficos ou mixotróficos são de dois tipos principais: as lagoas fotossintéticas (*raceway ponds*) (Figura 2.4), formadas por grandes tanques rasos mecanicamente agitados construídos de concreto, fibra de vidro ou policarbonato; ou os fotobiorreatores avançados, equipamentos fechados construídos em painéis de diferentes formas (achatada ou em serpentinas, espirais ou cilindros) constituídos de vidro, plástico ou policarbonato (transparente para entrada de luz), com agitação mecânica, pneumática ou estática (Figura 2.5) (OLIVIERI; SALATINO; MARZOCHELLA, 2014; TREDICI, 2004).

Figura 2.4 - Esquema típico de uma lagoa fotossintética (*raceway pond*)

Fonte: Adaptado (MENDOZA et al., 2013).

Comparadas aos fotobiorreatores fechados, as lagoas abertas constituem-se no método mais barato de produção de biomassa algal em grande escala. A produção de

microalgas em lagoas abertas não necessariamente precisa competir por espaço com culturas agrícolas existentes, uma vez que são aplicadas em áreas subaproveitadas. Além disso, exigem menor energia na produção, têm fácil manutenção e limpeza e o seu potencial de produção de energia líquida é elevado, favorecendo a utilização na produção de biocombustíveis. Como desvantagem, esse sistema requer ambientes altamente seletivos devidos às ameaças inerentes de contaminação por outras algas ou espécies de protozoários que podem inviabilizar a produção desejada (BRENNAN; OWENDE, 2010).

Figura 2.5 – Avançados fotobiorreatores para produção de microalgas: (A) colunas de bolhas inclinado; (B) *airlift* de tubos concêntricos; (C) plano *airlift*; (D) airlift tela plana da Subitec; (E) tubular com misturador estático Kunii; (F) tubular com aletas de agitação estática; (G) *airlift* com fluxo e geração de redemoinhos; (H) Couette Taylor

Fonte: Adaptado (OLIVIERI; SALATINO; MARZOCHELLA, 2014).

Por outro lado, os fotobiorreatores têm vantagens por apresentarem baixa contaminação, melhor controle na taxa de transferência de massa gás-líquido, maior densidade da biomassa, maior exposição à luz, alta produtividade por área e baixo custo de colheita, favorecendo ainda estudos que permitam medir, avaliar ou controlar os fatores ambientais e nutricionais que afetam o crescimento da biomassa e sua composição. A principal desvantagem dos fotobiorreatores é a baixa penetração da luz com o desenvolvimento do cultivo devido ao aumento da densidade celular no meio (CHISTI, 2007). Para minimizar esse efeito são necessárias inovações tecnológicas de cultivo como novas geometrias internas, além de variação no fluxo de ar e nas condições operacionais,

incluindo o estudo de vários parâmetros importantes para crescimento da microalga como a transferência de oxigênio; condições de mistura e tempo de recirculação e frequência de exposição à luz (KUNJAPUR; ELDRIDGE, 2010).

Um tipo de reator que facilita a mistura gás-líquido ou gás-líquido-sólido, e que se caracteriza pela circulação de fluidos num padrão cíclico definido através de canais construídos especificamente para este fim é o chamado reator *airlift* (RAL) (Figura 2.6). Nesses reatores, o conteúdo é agitado pneumáticamente por fluxo de ar ou por outros gases, que além de agitar, tem a importante função de facilitar o intercâmbio de material entre a fase gasosa e o meio. E ainda, devido à geometria forma padrões determinados de circulação de fluídos com um canal ascendente (“*upflow*”) e outro descendente (“*downflow*”) (MERCHUK; GLUZ, 2002), característica ideal para ser utilizada em fotobiorreatores onde a penetração da luz é prejudicada pelo aumento da densidade celular no meio, pois diminui a distância de incidência que a luz terá que percorrer.

Os biorreatores *airlift* podem ser divididos em dois tipos principais com base na sua estrutura geométrica: (1) de circulação externa, nos quais a circulação ocorre através de condutos separados e distintos (Figura 2.6c); e (2) de circulação interna, em que defletores ou tubos colocados estrategicamente num único recipiente criam os canais necessários para a circulação (Figura 2.6a,b). Os projetos de ambos os tipos ainda podem ser modificados, variando a dinâmica dos fluídos, por meio da modificação do tamanho das bolhas e vazão de ar (MERCHUK; GLUZ, 2002).

Figura 2.6 - Representação esquemática de diferentes tipos de reatores *airlift* (RALs)

Fonte: Adaptado (MERCHUK; GLUZ, 2002).

Em fotobiorreatores, o projeto do reator, a concentração celular, o comprimento do percurso da luz, a extensão da turbulência da cultura e a intensidade da luz determinarão a frequência da luz e fluxo de fótons e o fotoperíodo (ciclo de claro/escuro). Particularmente, em fotobiorreatores *airlift* com tubos concêntricos (Figura 2.6b), existem duas regiões, a interna do tubo central com o fluxo ascendente (“*riser*”) que compreende a zona escura e a região externa do fluxo descendente (“*downcomer*”), que fica paralela ao tubo central, compreendendo a região clara. Consequentemente, o tempo gasto pelas microalgas na zona escura e clara é determinado pelo tempo de circulação do líquido (10-100 s), o qual depende da velocidade superficial do gás e do projeto do biorreator (CHISTI, 1989).

Embora permitam produzir maiores quantidades de biomassa por volume, a quantidade de energia que os fotobiorreatores requerem para agitação e difusão do dióxido de carbono são desvantagens a serem consideradas para o cultivo de microalgas. Porém, nos últimos anos esses reatores têm recebido grande atenção em trabalhos de pesquisa devido ao controle rigoroso no processo que eles proporcionam, baixo custo de colheita e elevadas taxa de produção de biomassa, indicando-os para utilização na produção de biocombustível e de coprodutos da biomassa microalgal (CHEN et al., 2009).

Vários trabalhos com fotobiorreatores têm sido realizados com diversos tipos de configurações, tais como: tubular, “*flat plane*”, colunas de bolhas e *airlift* (OLIVIERI; SALATINO; MARZOCHELLA, 2014) (Tabela 2.2). Sato et al. (2006) estudaram o cultivo de microalgas em biorreatores com formatos de balão volumétrico, tubular e placa plana. No projeto, o fotobiorreator que resultou no maior rendimento em biomassa foi o tubular no qual se obteve, em massa seca, 10,25 g d⁻¹ ou 0,146 g L⁻¹ d⁻¹, utilizando a microalga *Chlorella sp.* e um período de iluminação de 12 h d⁻¹.

Existem várias formas de medir o desempenho de fotobiorreatores usados no cultivo de microalgas, sendo fundamental a determinação da taxa específica de crescimento microbiano (μ) e da produtividade volumétrica em biomassa (P_x) ou em algum dos componentes celulares. A Tabela 2.2 mostra diferentes tipos de fotobiorreatores reportados na literatura, incluindo a espécie microbiana empregada, as fontes de carbono e nitrogênio, a densidade de fluxo de fótons e os valores de μ e produtividade volumétrica em biomassa. Pode-se verificar que a configuração e o tipo de agitação do biorreator, a espécie de microalga, a fonte de nitrogênio e carbono e a iluminância influenciam no desempenho do fotobiorreator.

Tabela 2.2 - Exemplos de condições empregadas e resultados obtidos em trabalhos da literatura nos quais diferentes tipos de fotobiorreatores foram empregados na produção de biomassa microalgal

Configuração, agitação	Espécie cultivada	Fonte de nitrogênio e concentração	Concentração de CO ₂ /fluxo volumétrico	Densidade de fluxo de fótons (μmol m ⁻² s ⁻¹)	μ (d ⁻¹)	(P _x) (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	Referência
Tubular com agitação mecânica (b)	<i>Chlorella minutissima</i>	NaNO ₃ (75 mg L ⁻¹)	(5% v/v), 1,0 L min ⁻¹	25,0	0,43	32,0	Illman; scragg; shales (2000)
Coluna com aeração (b)	<i>Chlorella zofingiensis</i>	NaNO ₃ (1,0 g L ⁻¹)	(ar), 0,6 L min ⁻¹	100,0	2,15	210,0	Feng et al. (2012)
Tubular com aeração (b)	<i>Chlorella sp.</i>	NaNO ₃ (250 mg L ⁻¹)	(7,5% v/v), 0,2 L min ⁻¹	105,0	2,35	-	Zhang; Fung; Ng (2015)
Fotobiorreator tubular airlift (b)	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	KNO ₃ (1,62 g L ⁻¹)	(ar), 8 h 0,04 L min ⁻¹	900 - 1200	1,9	650*	Barbosa et al. (2003)
Fotobiorreator tubular airlift (b)	<i>Scenedesmus obtusiusculus</i>	NaNO ₃ (1,5 g L ⁻¹)	(3,8% v/v), 3,4 L min ⁻¹	117,0	0.12	0,13	Cabello; Morales; Revah (2014)
Fotobiorreator cônico airlift (c)	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Efluente** (0,3 g L ⁻¹)	(5-9% v/v), 15-20 L min ⁻¹	Natural ^a	1,02	0,63	Tan et al. (2014)

(b) cultivo batelada, (c) cultivo contínuo, * Produtividade em proteína, ** Águas residuais de processamento de amido, ^a Verão em Shangai – China.

2.4 Produção de biocombustíveis a partir de microalgas: produção integrada de etanol e biodiesel

A liberação de gases poluentes na atmosfera proveniente da queima de combustíveis fósseis tem resultado em efeitos ambientais danosos, incluindo problemas ligados a mudanças climáticas devido ao efeito estufa ocasionado pela emissão de CO₂ por motores de combustão (FAIRLEY, 2011). A necessidade imediata de ações estratégicas para a redução desses efeitos promove o estudo e produção de biocombustíveis renováveis, em que as emissões de CO₂ oriundas da queima sejam sequestradas através da fotossíntese durante o crescimento da biomassa (SETH; WANGIKAR, 2015). Neste contexto as microalgas são consideradas atualmente como uma das mais promissoras fontes alternativas para a produção de biocombustíveis. De fato, as microalgas estão ganhando grande atenção como alternativa de fonte renovável de biomassa para a produção de biodiesel e bioetanol, sendo que, quando obtidos a partir desta fonte, estes são chamados “biocombustíveis de terceira geração (3G)” (NIGAM; SINGH, 2011; DRAGONE et al., 2010).

A produção de bioetanol a partir das microalgas ocorre principalmente por meio da fermentação alcoólica dos carboidratos existentes na biomassa, sendo necessário um pré-tratamento físico, químico ou biológico antes da fermentação (HARUN; DANQUAH, 2011; JOHN et al., 2011).

O pré-tratamento da biomassa é uma importante etapa na produção de bioetanol a partir das microalgas por disponibilizar os açúcares fermentáveis para o processo. Atualmente, os pré-tratamentos empregando ácidos, especialmente ácido sulfúrico diluído, são os mais comumente utilizados (NGUYEN et al., 2009).

Segundo Harun e Darquah (2011), o pré-tratamento ácido oferece vantagens de eficiência e baixo consumo de energia se comparado com outros métodos. Neste trabalho, o melhor resultado, de 7,20 g L⁻¹ de bioetanol, foi obtido utilizando 15 g L⁻¹ de microalgas a 140 °C e 1% (v/v) de ácido sulfúrico durante 30 minutos. Os autores determinaram ainda, em ordem decrescente, que a temperatura, seguido pela concentração do ácido e a quantidade de microalgas no meio foram os parâmetros que mais influenciaram na produção de bioetanol a partir de microalgas.

Em outro trabalho, Miranda (2011) estudou a produção de bioetanol a partir da microalga *Scenedesmus obliquus*, melhorando o método de pré-tratamento para obtenção de açúcares fermentáveis. Dos métodos testados, o que resultou em melhor desempenho na obtenção de açúcares foi a hidrólise de biomassa seca com ácido sulfúrico 2 N, a 120 °C durante 30 min. O hidrolisado obtido no processamento da biomassa foi destoxificado e fermentado pela levedura *Kluyveromyces marxianus*, obtendo-se concentração de etanol de até 11,7 g/L a partir de 24,1 g/L de glicose.

Além do método de pré-tratamento, alternativas para favorecer a produção de etanol 3G incluem modificação nas condições de cultivo visando ao aumento no teor de carboidratos na biomassa microalgal. Neste sentido, trabalhando com a microalga *Chorella vulgaris* para sua utilização como matéria-prima na produção de bioetanol, Kim et al. (2014) limitaram a quantidade de nitrogênio no meio de cultivo, possibilitando um aumento no teor de carboidratos na biomassa de 16% para 22,7%. No processo de fermentação com alimentação contínua utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7906 imobilizada, estes autores obtiveram rendimento de 89% na fermentação em 24 h.

Segundo Ho et al. (2013b), a privação de nitrogênio no meio de cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E promoveu o acúmulo de carboidratos na célula microalgal, atingindo valores de 51% em massa de carboidrato, com 93% de glicose,

indicando que essa microalga é excelente matéria-prima para a fermentação alcoólica e possui composição química adequada para produção de bioetanol.

A utilização da biomassa de algas para a produção de etanol é, sem dúvida, uma abordagem sustentável e ecologicamente correta. Entretanto, o estudo de novas cepas, meios de cultivo, novos biorreatores e engenharia genética para selecionar linhagens mais resistentes a condições adversas de produção são necessárias para o futuro do bioetanol como fonte de combustível, considerando-se que seu consumo vem se expandindo a cada ano (JOHN et al., 2011). Além disso, quando integrada à produção de biodiesel, a produção de etanol pode ser inserida em um contexto de aproveitamento integral da matéria-prima.

Para a produção de biodiesel a partir da biomassa microalgal, os lipídeos existentes na biomassa são convertidos em ésteres (metílico ou etílico) pelo processo de transesterificação dos triglicerídeos com álcool simples (metanol ou etanol). Esta reação tem sido realizada por catálise homogênea usando álcalis ou ácidos como catalisadores ou por catálise heterogênea química ou enzimática (SHUMBULO; KI, 2018).

Embora muitas cepas de microalgas tenham naturalmente um alto teor de lipídios, é possível aumentar essa concentração otimizando condições de processo, incluindo o controle do nível de nitrogênio, intensidade da luz, temperatura, salinidade, concentração de CO₂ e processo de colheita (DRAGONE et al., 2010). O método mais utilizado para aumentar o acúmulo de lipídios das microalgas é a limitação do nitrogênio, que não só resulta na acumulação de lipídios, mas também em uma mudança gradual da composição lipídica dos ácidos graxos livres para triacilglicerol (TAG), tornando esses TAGs mais úteis para conversão em biodiesel (NIGAM; SINGH, 2011). O maior acúmulo de lipídeos devido à redução na disponibilidade de nitrogênio no meio, no entanto, não ocorre em todos os casos. Dependendo da faixa de concentração de fonte de nitrogênio avaliada e da espécie microalgal, maior quantidade deste nutriente pode resultar em aumento no teor de lipídeos das células (KIM et al, 2016). Além disso, outros componentes da biomassa como os carboidratos e proteínas também são influenciados pela variação da disponibilidade de nitrogênio (HO et al., 2013a).

No entanto, o acréscimo no acúmulo de lipídios não resultará necessariamente em aumento da produtividade de lipídios em um dado cultivo, pois a produtividade em biomassa e a acumulação de lipídios não estão necessariamente correlacionadas. A acumulação de lipídios refere-se ao aumento da concentração de lipídios dentro das células de microalgas sem consideração da produção geral de biomassa. A produtividade lipídica

leva em consideração tanto a concentração lipídica dentro das células como a biomassa produzida por essas células e, portanto, é um indicador mais útil dos custos potenciais da produção de biocombustíveis líquidos.

Uma produção integrada de biocombustíveis a partir de microalgas (Figura 2.7) inclui uma única etapa de cultivo microalgal, seguido da separação das células do meio de crescimento (colheita) e subsequente extração de lipídios para a produção de biodiesel através da transesterificação. Após a extração de óleo, a biomassa restante é usada na hidrólise do amido ou celulose (ou ainda outros carboidratos) para a obtenção de açúcares fermentáveis. Estes açúcares são fermentados e o mosto destilado, resultando na produção do bioetanol por meio de técnicas de destilação e desidratação.

Figura 2.7 – Processo integrado de produção do biodiesel e bioetanol proveniente de microalgas

Fonte: Adaptado (DRAGONE et al., 2010).

Desta forma, a importância de estudar a produção de biocombustíveis provenientes de microalgas é notória. Realmente, o estabelecimento de condições de cultivo que favoreçam a obtenção de diferentes composições na biomassa microalgal, associada à extração de lipídeos, os quais podem ser usados na obtenção do biodiesel, e a hidrólise dos carboidratos para a produção de bioetanol, é fundamental para o desenvolvimento de uma biorrefinaria flexível e com elevado potencial para obtenção integrada de biocombustíveis.

Além dos biocombustíveis tradicionais, bioetanol e biodiesel, o conceito de biorrefinaria inclui outros exemplos como biometano e biohidrogênio, entre outros (gás de síntese e bio-óleo) (KALINCI; HEPBASLI; DINCER, 2009), além de produtos farmacêuticos e produtos químicos comercialmente importantes (PINEDO et al., 2016). Assim, as biorrefinarias poderiam simultaneamente produzir biocombustíveis, produtos químicos biológicos, calor e energia (ANSARI et al., 2017a). A abordagem de

biorrefinarias da biomassa microalgal tem também o potencial para reduzir o consumo de água nos processos industriais, devido à reutilização desta no meio (ANSARI et al., 2017b). Pode ainda diminuir o efeito dos gases de combustão (CO_2) no meio ambiente pelo uso desses como fonte de carbono para o cultivo microalgal (KASSIM; MENG, 2017) e gerar produtos de valor agregado como pigmentos, nutracêuticos e compostos bioativos (CHEW et al., 2017).

2.5 Uso de águas residuais ou lixiviado como meio de cultivo para a produção de microalgas

A pesquisa sobre o cultivo de algas como um processo de tratamento de águas residuais vem sendo feita desde década de 1970 (LAPOINTE et al., 1976). Embora o propósito inicial da introdução do processo de lagoas de algas fosse continuar a tratar o efluente secundário para prevenir a eutrofização, observou-se que o tratamento eliminou os nutrientes do esgoto doméstico de forma mais eficiente em comparação ao processo de lodo ativado, sugerindo que seria mais econômico e desejável empregar o sistema de algas como processo de tratamento secundário (TAM; WONG, 1989). Espécies de algas como *Chlorella* foram amplamente aplicadas para o tratamento de águas residuais e mostraram capacidade de remoção de nitrogênio, fósforo e demanda química de oxigênio (DQO) com diferentes tempos de retenção, variando de 10 h a 42 dias, misturado com bactérias ou não, e mostrou o potencial de substituição do processo de lodo ativado em um passo secundário ou terciário em vista da redução de nutrientes e produção de biomassa algal (WANG et al., 2010a).

Qualquer que seja o tipo de águas residuais como o municipal, industrial ou de agricultura, se usadas como meio de cultivo microalgal, devem apresentar nutrientes que favoreçam o crescimento da biomassa. Dentre os principais nutrientes estão o nitrogênio, fósforo e metais. O nitrogênio sob a forma de amônio e nitratos é o nutriente mais comum encontrado em águas residuais (WANG et al., 2010a). Como amônio, o nitrogênio está entre as formas químicas mais comuns e que podem ser facilmente absorvidas pela maioria das espécies e cepas de microalgas. Outro importante nutriente para o crescimento e metabolismo das microalgas é o fósforo, o qual contribui como ATP em células microalgais no processo da fotossíntese e a sua disponibilidade no meio de cultivo influencia o crescimento das células (ARORA et al., 2015). O fósforo está geralmente

disponível em águas residuais sob a forma de ânions inorgânicos de H_2PO_4^- ou HPO_4^{2-} , sendo as concentrações desses nutrientes variáveis de acordo com o tipo de efluente utilizado (GULDHE et al., 2017a). Geralmente, para efluente doméstico secundário, a quantidade de nitrogênio total (NT) e fósforo total (PT) é relativamente baixa, atingindo valores de $15 - 90 \text{ mg L}^{-1}$ e $5 - 20 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. Já para efluentes pecuário e da agricultura, são atingidos valores de $185 - 3.213 \text{ mg L}^{-1}$ de NT e $30 - 987 \text{ mg L}^{-1}$ de PT, sendo muitas vezes necessário fazer a diluição desses nutrientes antes de serem utilizados no cultivo da microalga (CHIU et al., 2015).

Existem alguns estudos que utilizaram águas residuais industriais para o cultivo de microalgas, havendo também um grande interesse no uso de microalgas como biorremediação para esses efluentes, principalmente para a remoção de metais pesados, biodegradação de toxinas químicas orgânicas (hidrocarbonetos e biocidas) e redução de teores de nitrogênio e fósforo (LI et al., 2011). Além de promover o tratamento do efluente, todos os estudos demonstraram potencial para produzir biomassa microalgal, com boa produtividade em biomassa e lipídeos (Tabela 2.3).

O lixiviado proveniente de aterros sanitários também pode ser utilizado como meio de cultivo assim como se utilizam as águas residuais, pois este contém vários componentes que podem ser aproveitados pelo microrganismo como nutrientes, tais como a matéria orgânica, os metais e os sais dissolvidos. Neste caso, o oxigênio produzido pela fotossíntese durante o crescimento microalgal facilita a degradação das substâncias orgânicas. No entanto, a diluição do lixiviado é necessária devido à alta concentração de seus componentes, alguns dos quais tóxicos para crescimento da microalga (CHEAH et al., 2016).

O Lixiviado é um líquido produzido pela lixiviação de substâncias presentes em resíduos sólidos urbanos em aterros sanitários ou oriundas de sua decomposição, que é obtido após a percolação dos interstícios da massa deste resíduo por água de origem pluviométrica ou do próprio lixo. Esse processo resulta em um líquido com característica de cor escura, com mau cheiro, elevada recalcitrância na degradação bioquímica, com presença de compostos nitrogenados, sólidos em suspensão, metais pesados e compostos tóxicos, entre outros (SOUTO, 2009; BIDONE, 2007).

Tabela 2.3 - Produtividade em biomassa e lipídeos para cultivos de microalgas em diferentes tipos de efluentes contendo concentrações iniciais variadas de nitrogênio total (NT) e fósforo total (PT)

Tipos de efluentes	Fonte do efluente	Microalga	NT (mg L ⁻¹)	PT (mg L ⁻¹)	P _{xB} ⁽¹⁾ (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	P _{XL} ⁽²⁾ (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	Referência
Efluente municipal	MWTP ⁽³⁾	<i>Chlorella sp.</i>	132	215	313	35,6	Li et al. (2011)
	BWTP ⁽⁴⁾	<i>Chlorella sp.</i> 227	250	17	400	65	Cho et al. (2013)
	AWTP ⁽⁵⁾	<i>Chlorella vulgaris</i>	223	330	95	-	Ruiz et al. (2011)
Efluente de agricultura	50 % (v/v) efluente de suinocultura	<i>Chlorella zofingiensis</i>	148	156	296	111	Zhu et al. (2013)
	Efluente de laticínios AD ⁽⁶⁾	<i>Chlorella vulgaris</i>	71	61	450	48	Qin et al. (2014)
	Esterco diluído	<i>Chlorella sp.</i>	130	18	69	7	Wang et al. (2010b)
Efluente industrial	Efluente de soja processado	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	190	46	640	240	Hongyang et al. (2011)
	Efluente fabricação da Riboflavina	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	885	120	254	99	Sun et al. (2013)
	Efluente de cervejaria	<i>Chlorella vulgaris</i>	90	18	227	61	Farooq et al. (2013)

⁽¹⁾ – Produtividade em biomassa, ⁽²⁾ – Produtividade em lipídeos.

⁽³⁾ MWTP – Planta de tratamento de efluente do Metropolitan - Saint Paul, Minnesota, EUA. ⁽⁴⁾ BWTP – Planta de tratamento de efluente de Busan – Busan, Coreia. ⁽⁵⁾ AWTP – Planta de tratamento de efluente de Arcos de la Frontera – Arcos de la Frontera, Espanha. ⁽⁶⁾ AD – Efluente da Aochun Dairy Co., Ltd. de Foshan, Guangdong, China. Esterco diluído - Haubenschild Farm, Princeton, Minnesota, EUA.

A composição química e biológica do lixiviado proveniente de aterros sanitários é muito complexa e depende de diversos fatores, dentre os quais: condições ambientais, composição dos resíduos que chegam ao aterro, forma de operação do aterro e, principalmente da dinâmica dos processos de decomposição que ocorrem no interior dos aterros (GHOSH; THAKUR; KAUSHIK, 2017). No entanto, de uma forma geral, a maioria dos lixiviados tem a mesma composição básica caracterizada por quatro grupos de poluentes: matéria orgânica dissolvida, a qual é expressa como Demanda Química de Oxigênio (DQO) ou Carbono Orgânico Total (COT), incluindo CH₄ e ácidos graxos; macro componentes inorgânicos como Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, K⁺, NH₄⁺, Cl⁻, SO₄²⁻, HCO₃⁻; metais pesados e compostos orgânicos xenobióticos como hidrocarbonetos aromáticos,

fenóis e alifáticos clorados. Na Tabela 2.4 estão as características de alguns efluente municipal e lixiviado que podem ser usados como meio de cultivo para microalgas.

Na literatura existem poucos trabalhos realizados utilizando o lixiviado como meio de cultivo de microalgas e biorremediação desses efluentes. Zhao et al. (2014), por exemplo, estudaram a viabilidade do cultivo da *Chlorella pyrenoidosa* na remoção de nutrientes e compostos orgânicos em meio contendo de 0 até 20% de lixiviado proveniente de aterro sanitário de Shanghai, China. Os resultados demonstraram que o processo foi eficaz, com redução de até 95% do nitrogênio amoniacal, tendo resultado em produtividade máxima de lipídeos e fixação de carbono de 24,1 e 65,8 mg L⁻¹ d⁻¹, respectivamente.

Em outro trabalho, Richards e Mullins (2013) estudaram a combinação da produção de lipídeos e remoção de metais pesados usando quatros espécies diferentes de microalgas em meio constituído por lixiviado de aterro sanitário. Após um período de dez dias de processo, a população de microalgas tinha removido 95% dos metais em solução com crescimento dominado pelas espécies de maior conteúdo lipídico. Em geral, o estudo indicou que o uso da biorremediação baseado em microalgas é um método viável para o tratamento de lixiviados e produção de lipídios.

Tabela 2.4 – Exemplos de características de efluentes municipais e lixiviados

Parâmetros	Efluente Municipal ^a	Lixiviado A ^b	Lixiviado B ^c
pH	7,0-7,6	8,3-8,5	8,6-8,8
Demanda química de Oxigênio (DQO) (mg L ⁻¹ O ₂)	174,6	14.390	3.565
Carbono Orgânico Total (COT) (mg L ⁻¹)	32	293,7	1.233,3
Nitrogênio Amoniacal (mg L ⁻¹)	33,7	1.381	1452
Nitrogênio Total (mg L ⁻¹)	61,4	1.786	2.072,7
Fósforo Total (mg L ⁻¹)	3,1	4,0	15,2
Fe (mg L ⁻¹)	2,8	3,7	15,5
Mg (mg L ⁻¹)	11,5	56,3	0,223
Cr (mg L ⁻¹)	0,59	0,47	0,49
Ni (mg L ⁻¹)	0,23	0,54	0,18
Zn (mg L ⁻¹)	0,43	0,87	0,13
Referência	Zhao et al. (2014)	Zhao et al. (2014)	Brito (2014)

^a - Efluente Municipal de Shanghai, China. ^b - Lixiviado do Aterro Sanitário de Shanghai, China. ^c - Lixiviado do Aterro Municipal de Cachoeira Paulista, SP, Brasil.

Fonte: Do autor.

A produção de microalgas com aproveitamento de águas residuais ou lixiviados demonstra ser uma alternativa ecológica e econômica para produção de energia renovável. A biomassa microalgal gerada pelo meio de cultivo formado pelos nutrientes reaproveitados do efluente ou lixiviado, o qual seria descartado ou tratado, pode reduzir consideravelmente os custos operacionais e ainda gerar biocombustíveis como bioetanol e biodiesel. No entanto, para isso deve-se explorar o cultivo de espécies de microalgas capazes de crescer no efluentes ou lixiviados, objetivando uma maior produtividade e resistência à contaminação por outros microrganismos (RICHARDS; MULLINS, 2013).

2.6 Conclusão

Os biocombustíveis de microalgas têm sido demonstrados como promissores para substituir os combustíveis fósseis em função da eficiência intrínseca deste microrganismos na conversão de energia solar em energia química. Além disso, as microalgas possuem grande capacidade de armazenamento de lipídeos e produção de carboidratos e proteínas, além de produzirem outros metabólitos de interesse, apresentando assim potencial para uso como matéria prima em biorrefinarias. Pesquisas referentes ao meio de cultivo, natureza e concentração dos nutrientes no meio, opções de biorreatores e de cepas resistentes e adequadas ao ambiente produtivo são necessários para resultar em elevada produtividade e diminuição de custos. Entre os biorreatores, sistemas fechados têm sido avaliados e diferentes configurações têm sido propostas. Entre as alternativas, o uso de fotobiorreatores do tipo *airlift* apresenta vantagens como simplicidade e favorecimento da mistura gás-líquido e da iluminação do cultivo microalgal. Microalgas podem ainda crescer em meios contendo efluentes ou lixiviados, utilizando os nutrientes presentes e promovendo sua biorremediação.

Referências

- ANSARI, F. A. et al. Exploration of microalgae biorefinery by optimizing sequential extraction of major metabolites from *Scenedesmus obliquus*. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 56, n. 12, p. 3407–3412, 2017a.
- ANSARI, F. A. et al. Microalgal cultivation using aquaculture wastewater: Integrated biomass generation and nutrient remediation. **Algal Research**, v. 21, p. 169–177, 2017b.
- ARORA, N. et al. Synergistic dynamics of nitrogen and phosphorous influences lipid productivity in *Chlorella minutissima* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 79–87, 2015.
- BARBA, F. J. Microalgae and seaweeds for food applications: challenges and perspectives. **Food Research International**, v. 99, p. 969–970, 2016.
- BARBOSA, M. J. et al. Microalgae cultivation in air-lift reactors: modeling biomass yield and growth rate as a function of mixing frequency. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, n. 2, p. 170–179, 2003.
- BECKER, E. W. **Microalgae: biotechnology and microbiology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1994.
- BIDONE, R. F. **Tratamento de lixiviado de aterro sanitário por um sistema composto por filtros anaeróbios seguidos de banhados construídos: estudo de caso**: Central de Resíduos do Recreio, em Minas do Leão/RS. 2007. 168 f. Tese (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- BRASIL, B. et al. Microalgae and cyanobacteria as enzyme biofactories. **Algal Research**, v. 25, n. May, p. 76–89, 2017.
- BREDDA, E. H. et al. Evaluation of oil productivity of *Chlorella minutissima* cultivated in two homemade photobioreactors (bubble column and tank). **Journal of Multidisciplinary Engineering Science and Technology**, v. 3, n. 11, p. 6060–6066, 2016.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae - a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557–577, 2010.
- BRITO, R. A. D. E. **Ozonização catalítica do chorume proveniente do aterro sanitário de Cachoeira Paulista - SP na presença de ferro em sistema contínuo**. 2014. 219f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia Química de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.
- BUMBAK, F. et al. Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 1, p. 31–46, 2011.
- CABELLO, J.; MORALES, M.; REVAH, S. Dynamic photosynthetic response of the microalga *Scenedesmus obtusiusculus* to light intensity perturbations. **Chemical Engineering Journal**, v. 252, p. 104–111, 2014.
- CHEAH, W. Y. et al. Cultivation in wastewaters for energy: a microalgae platform. **Applied Energy**, v. 179, p. 609–625, 2016.

- CHEN, P. et al. Review of the biological and engineering aspects of algae to fuels approach. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 2, n. 4, p. 1–30, 2009.
- CHEW, K. W. et al. Microalgae biorefinery: high value products perspectives. **Bioresource Technology**, v. 229, p. 53–62, 2017.
- CHISTI, M. Y. **Airlift bioreactor**. Lodon: Elsevier, 1989.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 294–306, 2007.
- CHIU, S. Y. et al. Cultivation of microalgal *Chlorella* for biomass and lipid production using wastewater as nutrient resource. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 179–189, 2015.
- CHO, S. et al. Microalgae cultivation for bioenergy production using wastewaters from a municipal WWTP as nutritional sources. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 515–520, 2013.
- DERNER, R. B. et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959–1967, 2006.
- DOAN, Q. C. et al. Microalgal biomass for bioethanol fermentation: Implications for hypersaline systems with an industrial focus. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 79–88, 2012.
- DOSHI, A. et al. Economic and policy issues in the production of algae-based biofuels: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 64, p. 329–337, 2016.
- DRAGONE, G. et al. Third generation biofuels from microalgae. In Mendéz-Vilas, A. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**. Badajoz: Formatex, p. 1355–1366, 2010.
- FAIRLEY, P. Introduction: next generation biofuels. **Nature**, v. 474, n. 7352, p. S2–S5, 2011.
- FALKOWSKI, P. et al. The evolution of modern eukaryotic. **Science**, v. 305, n. July, p. 354–360, 2004.
- FAROOQ, W. et al. Two-stage cultivation of two *Chlorella sp.* strains by simultaneous treatment of brewery wastewater and maximizing lipid productivity. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 230–238, 2013.
- FENG, P. et al. Lipid accumulation and growth characteristics of *Chlorella zofingiensis* under different nitrate and phosphate concentrations. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, n. 4, p. 405–410, 2012.
- FERNANDES, B. D. et al. Characterization of split cylinder airlift photobioreactors for efficient microalgae cultivation. **Chemical Engineering Science**, v. 117, p. 445–454, 2014.
- FRANCESCHINI, I. M. et al. **Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. Porto Alegre: Artmed, 2009. 332p.
- GARCÍA CAMACHO, F. et al. Use of concentric-tube *airlift* photobioreactors for microalgal outdoor mass cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, n. 3–4, p. 164–172, 1999.

- GHOSH, P.; THAKUR, I. S.; KAUSHIK, A. Bioassays for toxicological risk assessment of landfill leachate: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 141, n. January, p. 259–270, 2017.
- GRIFFITHS, M. J.; HARRISON, S. T. L. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, n. 5, p. 493–507, 2009.
- GULDHE, A. et al. Prospects, recent advancements and challenges of different wastewater streams for microalgal cultivation. **Journal of Environmental Management**, v. 203, p. 299–315, 2017.
- HARUN, R.; DANQUAH, M. K. Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 304–309, 2011.
- HEALTHY EATING. **Health benefits of eating raw and natural foods**. Disponível em: <<http://healthbenefitsofeating.com/sea-food/11-health-benefits-chlorella/>>. Acesso em: 17 set. 2017.
- HERNÁNDEZ, D. et al. Saccharification of carbohydrates in microalgal biomass by physical, chemical and enzymatic pre-treatments as a previous step for bioethanol production. **Chemical Engineering Journal**, v. 262, p. 939–945, 2015.
- HO, S. H. et al. Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 157–165, 2013a.
- HO, S. H. et al. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 191–198, 2013b.
- HONGYANG, S. et al. Cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* in soybean processing wastewater. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 21, p. 9884–9890, 2011.
- ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme Microbial Technology**, v. 27, p. 631–635, 2000.
- JOHN, R. P. et al. Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 186–193, 2011.
- KALINCI, Y.; HEPBASLI, A.; DINCER, I. Biomass-based hydrogen production: a review and analysis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 21, p. 8799–8817, 2009.
- KASSIM, M. A.; MENG, T. K. Carbon dioxide (CO₂) biofixation by microalgae and its potential for biorefinery and biofuel production. **Science of the Total Environment**, v. 584–585, p. 1121–1129, 2017.
- KIM, K. H. et al. Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 47–54, 2014.
- KUNJAPUR, A. M.; ELDRIDGE, R. B. Photobioreactor design for commercial biofuel production from microalgae. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 49, n. 8, p. 3516–3526, 2010.
- KYUNG, O.; OH, Y.; YEOL, E. Bioresource Technology Bioethanol production from carbohydrate-enriched residual biomass obtained after lipid extraction of *Chlorella* sp. KR-1. **BIORESOURCE TECHNOLOGY**, v. 196, p. 22–27, 2015.

- LAPOINTE, B. E. et al. The mass outdoor culture of macroscopic marine algae. **Aquaculture**, v. 8, n. 1, p. 9–21, 1976.
- LI, Y. et al. Characterization of a microalga *Chlorella sp.* well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 8, p. 5138–5144, 2011.
- MENDOZA, J. L. et al. Fluid-dynamic characterization of real-scale raceway reactors for microalgae production. **Biomass and Bioenergy**, v. 54, p. 267–275, 2013.
- MERCHUK, J. C.; GLUZ, M. Bioreactors, air-lift reactors. In: Encyclopedia of Bioprocess Technology. Israel: John Wiley and Sons, 2002. p. 320–324.
- MIRANDA, J. R. P. C. **Produção de bioetanol a partir da microalga *Scenedesmus obliquus***. [s.l.] Universidade de Lisboa, 2011.
- NGUYEN, M. T. et al. Hydrothermal acid pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 161–166, 2009.
- NIGAM, P. S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, n. 1, p. 52–68, 2011.
- OLIVIERI, G.; SALATINO, P.; MARZOCHELLA, A. Advances in photobioreactors for intensive microalgal production: Configurations, operating strategies and applications. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 89, n. 2, p. 178–195, 2014.
- PINEDO, J. et al. Microalgae biorefinery alternatives and hazard evaluation. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 107, p. 117–125, 2016.
- QIN, L. et al. Cultivation of *chlorella vulgaris* in dairy wastewater pretreated by UV irradiation and sodium hypochlorite. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 2, p. 1121–1130, 2014.
- RAMSUNDAR, P. et al. Assessment of municipal wastewaters at various stages of treatment process as potential growth media for *Chlorella sorokiniana* under different modes of cultivation. **Bioresource Technology**, v. 227, p. 82–92, 2017.
- RAZZAK, S. A. et al. Biological CO₂ fixation with production of microalgae in wastewater - A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, n. March, p. 379–390, 2017.
- REIS, C. E. R. **Construção de um biorreator tubular para crescimento da microalga *Chlorella sp.* em meio de lixiviado**. 2014. 49 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Química) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.
- REYIMU, Z.; OZÇIMEN, D. Batch cultivation of marine microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis suecica* in treated municipal wastewater toward bioethanol production. **Journal of Cleaner Production**, v. 150, p. 40–46, 2017.
- RICHARDS, R. G.; MULLINS, B. J. Using microalgae for combined lipid production and heavy metal removal from leachate. **Ecological Modelling**, v. 249, p. 59–67, 2013.
- RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford, UK: Blackwell Science, 2004.

- RUIZ, J. et al. Effect of nitrogen and phosphorus concentration on their removal kinetic in treated urban wastewater by *Chlorella Vulgaris*. **International Journal of Phytoremediation**, v. 13, n. 9, p. 884–896, 2011.
- SATO, T. et al. Invention of outdoor closed type photobioreactor for microalgae. **Energy Conversion and Management**, v. 47, n. 6, p. 791–799, 2006.
- SETH, J. R.; WANGIKAR, P. P. Challenges and opportunities for microalgae-mediated CO₂ capture and biorefinery. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, n. 7, p. 1281–1296, 2015.
- SHERIDAN, C. et al. Microbial engineering for the production of advanced biofuels. **Bioresource Technology**, v. 488, n. 1, p. 15020, 2016.
- SHUMBULO, E.; KI, D. Microalgae to biofuels : “ Promising ” alternative and renewable energy, review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 81, p. 743–755, 2018.
- SINGH, V.; TIWARI, A.; DAS, M. Phyco-remediation of industrial waste-water and flue gases with algal-diesel engenderment from micro-algae: a review. **Fuel**, v. 173, p. 90–97, 2016.
- SOUTO, G. D. D. B. **Lixiviado de aterros sanitários brasileiros - estudo de remoção do nitrogênio amoniacal por processo de arraste com ar (“stripping”)**. 2009. 371 f. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- SUN, X. et al. Microalgal cultivation in wastewater from the fermentation effluent in riboflavin (B₂) manufacturing for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 499–504, 2013.
- TAKEDA, H. Classification of *Chlorella* strains by means of the sugar components of the cell wall. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 16, n. 4, p. 367–371, 1988.
- TAM, N. F. Y.; WONG, Y. S. Wastewater nutrient removal by *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus sp.* **Environmental Pollution**, v. 58, n. 1, p. 19–34, 1989.
- TAN, X. et al. *Chlorella pyrenoidosa* cultivation using anaerobic digested starch processing wastewater in an *airlift* circulation photobioreactor. **Bioresource Technology**, v. 170, p. 538–548, 2014.
- THOMSON REUTERS. **Web of Science**. Disponível em: <<https://apps.webofknowledge.com>>. Acesso em: 5 maio. 2017.
- TOMASELLI, L. The Microalgal Cell. In: **Handbook of microalgal**. Oxford, UK: Blackwell Science, 2004. p. 17.
- WANG, L. et al. Cultivation of green algae *Chlorella sp.* in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 4, p. 1174–1186, 2010a.
- WANG, L. et al. Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella sp.* **Bioresource Technology**, v. 101, n. 8, p. 2623–2628, 2010b.
- ZHANG, D.; FUNG, K. Y.; NG, K. M. Design of outdoor-gas-treatment photobioreactors: A laboratory-simulated approach. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 54, n. 35, p. 8640–8649, 2015.

ZHAO, X. et al. Characterization of microalgae-bacteria consortium cultured in landfill leachate for carbon fixation and lipid production. **Bioresource Technology**, v. 156, p. 322–328, 2014.

ZHU, L. et al. Scale-up potential of cultivating *chlorella zofingiensis* in piggery wastewater for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 137, p. 318–325, 2013.

3 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL EM CULTIVO BATELADA EM FOTOBIORREATOR TANQUE DE BOLHAS

RESUMO

A microalga *Chlorella minutissima* 26a tem grande potencial como matéria-prima para produção de bioenergia devido ao rápido crescimento, eficiência na fixação de carbono e elevada capacidade de acumular lipídeos e carboidratos. O nitrogênio é um dos principais macronutrientes que controlam o metabolismo celular das microalgas e, portanto a variação da sua concentração no meio de cultivo influencia o crescimento e a composição da biomassa microalgal. O perfil de crescimento da microalga foi avaliado modificando-se a concentração de nitrato de sódio no meio de cultivo em processo em batelada usando fotobiorreator do tipo tanque de bolhas. O cultivo foi realizado em metabolismo autotrófico variando-se a concentração de nitrato no meio de 37,5 mg L⁻¹ até 150,0 mg L⁻¹ sendo que a biomassa produzida foi caracterizada com relação ao teor de lipídeos e de carboidratos. O uso de maior concentração de nitrato no meio de cultivo influenciou positivamente o crescimento microalgal, o qual foi avaliado mensurando-se biomassa seca, absorbância a 680 nm e número de células. O aumento da concentração de nitrato de 37,5 mg L⁻¹ para 150,0 mg L⁻¹ resultou em maiores teores de carboidratos e lipídeos na biomassa. Os maiores valores de produtividade em biomassa, lipídeos e carboidratos foram $262,0 \pm 4,3$, $105,2 \pm 1,7$ e $36,7 \pm 0,6$ mg L⁻¹ d⁻¹, respectivamente, obtidos com 150 mg L⁻¹ de nitrato no meio de cultivo. Os resultados obtidos demonstraram a importância da concentração da fonte de nitrogênio no cultivo autotrófico de *C. minutissima* e servem de base a estudos visando à maximização da produtividade nos componentes da biomassa desejados para um dado processo.

Palavras-chaves: *Chlorella minutissima*. Nitrato de sódio. Lipídeo. Carboidrato. Glicose.

3.1 Introdução

As microalgas têm sido consideradas como matéria-prima alternativa para a produção de biocombustíveis e outros compostos de interesse, apresentando vantagens como rápida taxa de crescimento e elevada produtividade lipídica ou de carboidratos (MILLÁN-OROPEZA; TORRES-BUSTILLOS; FERNÁNDEZ-LINARES, 2015). Além disso, o cultivo microalgal exige menos terra arável que as culturas oleaginosas, não compete com a produção de alimentos e pode contribuir para redução das emissões de gases de efeito estufa (JOHN et al., 2011).

O uso de microalgas em processos de interesse industrial tem sido pensado em um contexto de biorrefinarias as quais, neste caso, são chamadas “de terceira geração” (CHEW et al., 2017). Nestas, diversos compostos atualmente obtidos a partir de fontes fósseis não renováveis podem ser produzidos de forma integrada e ambientalmente amigável a partir das frações que compõe a biomassa microalgal. De particular interesse é a produção de biocombustíveis, entre os quais podem ser destacados o biodiesel e o etanol obtidos a partir das frações lipídicas e de carboidratos destes micro-organismos. Entre as espécies de microalgas que têm sido estudadas para produção de biodiesel e bioetanol podem ser citadas *Scenedesmus obliquus* (MIRANDA; PASSARINHO; GOUVEIA, 2012), *Chlorella vulgaris* (KIM et al., 2014), *Chlamydomonas reinhardtii* (AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015) e *Chlorella minutissima* (ARORA et al., 2015). Os lipídeos presentes na microalga têm sido extraídos e empregados na produção de biodiesel (Xu, Miao e Wu, 2006). Uma alternativa interessante, no entanto, seria o uso da biomassa microalgal residual após a extração dos lipídeos para a produção de etanol (HARUN; DANQUAH, 2011).

Há, no entanto, vários obstáculos que devem ser superados para favorecer a viabilidade da produção de combustíveis de microalgas em escala industrial, como a redução de custos e necessidades energéticas, buscando-se concomitantemente maior produtividade em lipídios e carboidratos (MILLÁN-OROPEZA; TORRES-BUSTILLOS; FERNÁNDEZ-LINARES, 2015). Particularmente, para melhorar a produtividade em biomassa em cultivos de microalgas, diversas estratégias têm sido avaliadas, incluindo variação da concentração e tipo da fonte de nitrogênio (KIM; BAE; LEE, 2016). Estas estratégias têm sido avaliadas tanto para cultivos autotróficos quanto para heterotróficos e mixotróficos (MITRA; VAN LEEUWEN; LAMSAL, 2012).

Além de favorecer o crescimento celular, a seleção do meio de condições de cultivo permite modificar a composição da biomassa microalgal, favorecendo, por exemplo, o acúmulo de lipídeos, carboidratos ou proteínas (ANUAR; ABDULLAH, 2016). Por exemplo, um dos métodos típicos para aumento do teor lipídico das microalgas em cultivos autotróficos, é o uso de condições de limitação de nitrogênio no meio (HO et al., 2013a). No entanto, a limitação de nitrogênio pode ser acompanhada pela redução da taxa de crescimento celular ou diminuição da concentração final de biomassa. Adicionalmente, deve-se observar que, dependendo da espécie utilizada e das faixas de concentração empregadas, o aumento da disponibilidade de fonte de nitrogênio pode até favorecer o acúmulo de lipídeos (KIM; BAE; LEE, 2016; FENG; LI; ZHANG, 2011).

No presente estudo, investigou-se a influência da concentração de nitrogênio na produção e composição da biomassa da microalga *Chlorella minutissima* 26a cultivada de forma autotrófica em fotobiorreator tipo tanque de bolhas em processo batelada. Os cultivos foram feitos em meio artificial Guillard f/2, variando-se a concentração inicial de nitrato de sódio no meio.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Microrganismo e preparo do inóculo

A microalga *Chlorella minutissima* 26a foi gentilmente cedida ao Laboratório de Meio Ambiente do Departamento de Engenharia Química da EEL/USP pelo Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (São Paulo, SP). Todos os reagentes utilizados na preparação dos meios de cultura foram de grau analítico ou adequados para microbiologia.

As culturas foram mantidas ativas em laboratório por meio do cultivo das microalgas em meio Guillard f/2 (GUILLARD, 1975), cuja composição é mostrada na Tabela 3.1. Nestes casos, os cultivos foram feitos em frascos Erlenmeyer de 250 mL, à temperatura ambiente sob iluminação artificial utilizando lâmpadas frias com fluxo de fótons de 125 a 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Estes cultivos eram mantidos sem aeração e, a cada 15 dias, a suspensão microbiana obtida foi inoculada em outro frasco contendo meio Guillard f/2, com um volume de inóculo de 10%. As culturas de inoculos foram preparadas no

mesmo meio f/2 (900 mL) com a adição de uma cultura de reserva (100 mL). Dessa forma, o cultivo do inóculo em metabolismo autotrófico foi realizado durante 10 dias usando um fotobiorreator tubular em processo batelada (PET transparente) de 12,0 mm de diâmetro e 28,0 mm de altura com aeração de 0,24 vvm. A iluminação foi artificial utilizando lâmpadas frias com fluxo de fótons de 125 a 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Tabela 3.1 – Composição do meio f/2 Guillard para crescimento microalgal

Componentes	Concentração
Sal marinho	33,3 g L ⁻¹
NaNO ₃	75 mg L ⁻¹
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	5 mg L ⁻¹
FeCl ₃ .6H ₂ O	3,15 mg L ⁻¹
Na ₂ EDTA	4,36 mg L ⁻¹
ZnSO ₄ .7H ₂ O	22,2 $\mu\text{g L}^{-1}$
MnCl ₂ .4H ₂ O	180 $\mu\text{g L}^{-1}$
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	6,3 $\mu\text{g L}^{-1}$
CoCl ₂ . 6H ₂ O	10 $\mu\text{g L}^{-1}$
CuSO ₄ .5H ₂ O	9,8 $\mu\text{g L}^{-1}$
Tiamina (B1)	100 $\mu\text{g L}^{-1}$
Cianocobalamina (B12)	0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$
Biotina (B7)	0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$

Fonte: Lourenço (2006).

3.2.2 Cultivo batelada em fotobiorreator tanque de bolhas

Os cultivos foram conduzidos em fotobiorreator tipo tanque de agitação proveniente da aeração, com volume total de 5,0 L. O volume útil do biorreator foi de 3,8 L, sendo o sistema aerados com vazão de 0,24 vvm, e mantido sob temperatura constante de 30°C em banho térmico. Empregou-se iluminação artificial utilizando lâmpadas frias com fluxo de fótons de 125 a 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O tempo total de cada batelada foi de 21 dias, com retiradas de amostra ao longo do cultivo para acompanhamento do crescimento celular. O sistema foi inoculado com suspensão de microalgas (10 % v/v) cultivada durante 10 dias conforme seção 3.2.1.

3.2.3 Avaliação do efeito da concentração da fonte de nitrogênio na composição da biomassa microalgal obtida em cultivo autotrófico em fotobiorreator tanque de bolhas

Foram montados quatros fotobiorreatores tanque de bolhas (Figura 3.1), com os processos conduzidos de forma descontínua e cultivo autotrófico, conforme seção 3.2.1. O meio utilizado foi proposto por Guillard f/2, porém variou-se a concentração do nitrato de sódio (NaNO_3) conforme a Tabela 3.2. O experimento 2 foi realizado empregando-se a concentração de NaNO_3 normalmente empregada no meio f/2, sendo que, para os experimentos 1, 3 e 4 esta concentração correspondeu, respectivamente, a 50, 150 e 200 % da usada no meio f/2. A biomassa produzida foi colhida por centrifugação e seca em estufa a 60 °C até peso constante. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 3.1 – Fotobiorreatores tanque de bolhas utilizados para cultivo da microalga *Chlorella minutissima* 26a em meio f/2 com diferentes concentrações do nitrato de sódio

Fonte: Do autor.

Tabela 3.2 – Variação da concentração de nitrato de sódio no meio de cultivo

Experimento	NaNO_3 (mg L^{-1})
1	37,5
2	75,0
3	112,5
4	150,0

Fonte: Do autor.

3.2.4 Acompanhamento do crescimento da biomassa microalgal

O crescimento microalgal foi acompanhado por três métodos:

a) medida da absorbância por espectrofotometria UV-visível: uma alíquota de 4,0 mL da amostra foi analisada em cubeta de quartzo por leitura da absorbância em equipamento Femto, modelo 700 Plus, a 680 nm;

b) contagem celular: realizada por um microscópio (Motic mod. BA400) com auxílio de um hemacitômetro tipo câmara de Neubauer de 0,1 mm de profundidade, sendo usados os quadrículos das extremidades e o quadrículo central do quadrado central para a contagem e,

c) determinação da biomassa seca: alíquotas de 10,0 mL do meio foram transferidas para tubos de centrifuga por meio de pipetas volumétricas e centrifugadas a 1800×g durante dez minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e a biomassa lavada com água destilada, repetindo-se o processo de lavagem e centrifugação três vezes. Em seguida, os tubos com a biomassa foram transferidos para estufa de secagem a 60 °C durante 24 h e, após o tempo de secagem, colocados no dessecador para resfriar até temperatura ambiente. A biomassa foi então determinada medindo-se a diferença de massa seca dos tubos antes e após a adição das alíquotas, utilizando-se balança analítica.

3.2.5 Colheita da biomassa microalgal

A biomassa microalgal foi colhida por centrifugação a 1800×g durante 10 minutos. Frascos de polietileno de 300 ml contendo as células foram centrifugados (centrifuga Daimon modelo CU 5000 IEC) e o sobrenadante desprezado. A biomassa foi então lavada com água destilada, repetindo-se o processo de lavagem e centrifugação três vezes. Em seguida, a biomassa foi transferida para vidro de relógio e seca em estufa a 60 °C até peso constante. Após a secagem a biomassa foi armazenada em frascos na geladeira a 8 °C.

3.2.6 Caracterização da biomassa microalgal

Para avaliar o efeito do nutriente, nitrato de sódio, sobre a composição da biomassa microalgal foi feita a caracterização com relação à umidade, conteúdo lipídico, teor de açúcares e proteína total. Essas análises foram feitas em triplicatas.

- Determinação da umidade na biomassa seca

A umidade foi determinada em uma balança infravermelho semi-analítica (Bel modelo I-Thermo-163). Aproximadamente 300 mg da amostra foram analisados na balança de infravermelho em um prato de alumínio tarado. O programa de aquecimento atingiu 135 °C, ocorrendo a secagem da massa pela radiação infravermelha. O resultado de teor de umidade foi obtido quando a amostra atingiu massa constante e expresso diretamente em porcentagem de sólidos no visor do equipamento.

- Determinação do conteúdo lipídico

Para a extração dos lipídeos foi utilizada a metodologia proposta por Bligh e Dyer (1959). Para isto, 500 mg de biomassa microalgal foram colocados em um tubo de ensaio e adicionados 6,0 mL de uma mistura de clorofórmio/metanol 2:1. A seguir, o tubo foi colocado em banho de ultrassom por 20 min e em seguida centrifugado por 10 min a 1800×g, sendo o sobrenadante transferido para um béquer e reservado. O procedimento de extração foi repetido mais duas vezes na biomassa. Após a extração, o solvente foi evaporado dos sobrenadantes que estavam reservados em béqueres, sendo determinado o teor lipídico por medida de massa em balança analítica. O rendimento em lipídeos obtido em cada experimento foi calculado em relação à biomassa total da amostra.

- Determinação do teor de açúcares

O teor de açúcares na biomassa microalgal foi determinado antes e após a extração dos lipídeos. O método utilizado foi o proposto por Moxley e Zhang (2007). Para isto, aproximadamente 300 mg da biomassa microalgal seca foi submetida à hidrólise com ácido sulfúrico em duas etapas: a primeira foi conduzida em tubos de ensaio com ácido sulfúrico 72% em um banho a 30 °C durante 60 minutos, sendo os tubos agitados manualmente a cada 10 minutos; a segunda etapa (pós-hidrólise) foi realizada em frascos Erlenmeyer de 250 mL, após adição de 84,0 mL de água destilada para obter-se um teor de ácido final de 4,0%. Em seguida, os frascos foram transferidos para a autoclave e mantidos a 121 °C por 60 minutos. Depois, a mistura foi filtrada em cadinhos de Gooch com placa porosa nº3 previamente tarados. O filtrado obtido foi guardado em congelador a temperatura de -10 °C para análise de açúcares em HPLC ou fenol sulfúrico para açúcares totais (DUBOIS et al., 1956).

No método fenol sulfúrico, 50 µL da amostra de hidrolisado foram adicionados ao tubo de ensaio com 450 µL de água e 500 µL de fenol. O tubo foi agitado e em seguida adicionado de 2,5 mL de ácido sulfúrico (98%). Agitou novamente o tubo contendo a mistura e, após 20 min de espera, a amostra foi analisada em espectrofotômetro a 490 nm. O resultado obtido da absorbância foi convertido em açúcares totais através de uma curva pré-determinada (APÊNDICE A).

Para a análise do teor de açúcares em CLAE, as amostras foram previamente filtradas em filtro Sep Pak C18 e injetadas no cromatógrafo, utilizando-se as seguintes condições: coluna BIO-RAD AMINEX HPX-87H (300 X 7,8 mm) mantida à temperatura de 45°C; volume de injeção de 20 µl; detector de índice de refração RID 6A; fase móvel H₂SO₄ 0,01 N e fluxo de eluente com 0,6 ml/min.

3.2.7 Determinação da taxa específica de crescimento (μ) e produtividade (Q)

A taxa específica de crescimento (μ , d⁻¹) foi calculada na fase exponencial de crescimento da microalga plotando-se o valor da biomassa seca em escala logarítmica em função do tempo e calculando-se o coeficiente linear (HO et al., 2013a).

A produtividade em biomassa (Q_x , mg L⁻¹ d⁻¹) foi calculada pela equação 1 (GRIFFITHS; HARRISON, 2009).

$$Q_x = \Delta x / \Delta t \quad (1)$$

Onde,

Δx - variação da concentração da biomassa;

Δt - tempo de cultivo.

A produtividade em lipídeos (Q_l) ou carboidratos (Q_c) foi determinada pelo produto da produtividade em biomassa pela fração mássica do lipídeo ou carboidrato (GRIFFITHS; HARRISON, 2009).

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Avaliação da reprodutibilidade do crescimento das microalgas durante o preparo do inóculo

A reprodutibilidade da metodologia de preparo do inóculo, feita conforme seção 3.2.1, foi avaliada pela leitura de absorbância e contagem de células com 15 dias de cultivo. Para avaliação desta reprodutibilidade, o preparo do inóculo foi repetido três vezes e os resultados de absorbância e contagem de células obtidos no inóculo preparado com 15 dias de cultivo estão apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Medidas de absorbância e contagem de células no inóculo preparado com 15 dias de cultivos em frascos Erlenmeyer

Experimento	Absorbância (680 nm)	Nº Células/mL ($\times 10^{-7}$)
1	0,742	2,53
2	0,767	2,62
3	0,756	2,57
Média $\pm$ desvio padrão	$0,762 \pm 0,008$	$2,57 \pm 0,05$

Fonte: Do autor.

De acordo com a Tabela 3.3, pode-se verificar que reprodutibilidade da metodologia de preparo do inóculo apresentou-se satisfatória, pois a absorbância e o número de células pouco variaram, com valores de desvio padrão representando menos de 2% da média. O crescimento das células microalgais durante o preparo do inóculo durou aproximadamente 14 dias e a coloração característica verde das células decorrente da “clorofila a” foi sendo evidenciada ao longo do tempo de cultivo (Figura 3.2).

Figura 3.2 – Fotografias dos reatores de cultivo da microalga *Chlorella minutissima* 26a durante o preparo do inóculo em meio f/2: a) início do cultivo; b) final do cultivo com valores de absorbância em torno de 0,750

(Fonte do autor)

3.3.2. Avaliação do efeito da concentração da fonte de nitrogênio no crescimento e composição da biomassa na *Chlorella minutissima* 26a cultivada em fotobiorreator tanque de bolhas

O crescimento da biomassa microalgal é resultado da interação entre os fatores biológicos, físicos e químicos (JOHN et al., 2011). No presente estudo, foi avaliada a influência da concentração da fonte de nitrogênio no crescimento microalgal em meio Guillard f/2 empregando-se diferentes concentrações iniciais de nitrato de sódio. O nitrogênio é nutriente essencial para os microrganismos para síntese de aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos, e o tipo e concentração da fonte deste elemento pode ter impacto sobre a eficiência do crescimento celular, formação dos metabólitos e composição química da biomassa (HO et al., 2013b).

A microalga, por ser um microrganismo fotossintético, utiliza luz como fonte de energia e possui pigmentos, em especial a clorofila, a qual confere a característica de cor verde que pode ser medida por absorbância a 680 nm, comprimento de onda de absorção da “clorofila a” (BRENNAN; OWENDE, 2010). Dessa forma, foi possível acompanhar o crescimento celular das microalgas verificando a pigmentação verde e medindo a absorbância do meio de cultivo nos experimentos (Figura 3.3).

Figura 3.3 – Imagens dos fotobiorreatores tanque de bolhas no início (a) e após 21 dias (b) de cultivo com diferentes meios contendo nitrato de sódio. Os ensaios 4, 3, 2 e 1 foram preparados em meios contendo, respectivamente, 37,5, 75,0, 112,5 e 150, mg L⁻¹ de NaNO₃

Fonte: Do autor.

A microalga *Chlorella minutíssima* 26a reproduz-se assexuadamente pela formação de dois, quatro ou oito autósporos, que são liberados por rompimento da parede materna (FRANCESCHINI, 2010). A reprodução microalgal da *Chlorella minutíssima* 26a foi visualizada por meio do hemacitômetro do tipo câmara de Neubauer e as imagens obtidas por um microscópico ótico (Figura 3.4). Foi evidenciada a fase de divisão por mitose, na qual se vê uma pequena divisão no interior da célula característica da segunda fase do processo de reprodução (Figura 3.4a). Já na imagem da Figura 3.4b, pode-se verificar a terceira fase do processo de reprodução, na qual ocorre a liberação e formação das células filhas provenientes da célula mãe.

Figura 3.4 - Imagem da microalga *Chlorella minutissima* 26a obtida por microscópio ótico com aumento de 600 vezes (a) e 1000 vezes (b), cultivada com $75,0 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrato de sódio

Fonte: Do autor.

De acordo com o gráfico da Figura 3.5, pode-se verificar que a concentração de nitrato de sódio no meio de cultivo influenciou no perfil de crescimento da microalga *Chlorella minutissima* 26a.

Analisando-se o perfil de crescimento da microalga *Chlorella minutissima* 26a por medida de biomassa seca (Figura 3.5a), verificou-se que houve aumento da biomassa em função do tempo em todos os ensaios. A modificação na concentração inicial de nitrato no meio não resultou em grande diferença na concentração de biomassa na faixa de $37,5 - 112,5 \text{ mg L}^{-1}$, embora menor crescimento tenha sido observado no experimento com a menor concentração da fonte de nitrogênio. Neste caso, a concentração de biomassa atingida ao final do cultivo foi de $3,4 \pm 0,4 \text{ g L}^{-1}$, enquanto que quando a concentração de nitrato no meio foi de $75,0 - 112,5 \text{ mg L}^{-1}$, a biomassa obtida ao final do cultivo foi de aproximadamente $4,0 \pm 0,4 \text{ g L}^{-1}$. O maior crescimento microalgal foi obtido empregando o fotobiorreator que continha maior concentração de nitrato de sódio no meio ($150,0 \text{ mg L}^{-1}$), com valor máximo de $5,3 \pm 0,4 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa obtido a partir do décimo sétimo dia de cultivo. Perfil similar também foi observado por Kim, Bae e Lee (2016), porém usando a microalga *Tetraselmis* sp. No trabalho destes autores, o aumento da concentração de 0 até $22,5 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$ de nitrato de sódio no meio aumentou o crescimento da biomassa, tendo sido obtido o valor máximo de $1,4 \text{ g L}^{-1}$ em quatorze dias de cultivo.

Figura 3.5 - Perfil de crescimento da microalga *Chlorella minutissima* 26a em função do tempo, avaliado pela medição da biomassa seca (mg L^{-1}) (a), contagem celular (células mL^{-1}) e absorbância (c), para os experimentos realizados com diferentes concentrações de nitrato de sódio no meio de cultivo

Fonte: Do Autor.

Observações semelhantes podem ser feitas na Figura 3.4b, na qual se fez a contagem da quantidade de células obtidas por volume de meio. Mesmo considerando-se o erro experimental inerente à contagem de células, a maior diferença com relação ao crescimento microalgal também ocorreu empregando-se $150,0 \text{ mg L}^{-1}$ de NaNO_3 , o que se tornou mais evidente após o décimo dia de cultivo. Neste caso, o maior valor da concentração celular foi de $2,40 \times 10^7$ células mL^{-1} no vigésimo primeiro dia de cultivo Figura 3.5b.

Como a produção de clorofila é proporcional ao crescimento celular da microalga, mediu-se a absorbância no comprimento a 680 nm (comprimento de onda característico verde) para avaliar a pigmentação verde (clorofila) produzida pelas microalgas durante a fotossíntese em cultivo autotrófico e consequentemente acompanhar o perfil de crescimento microalgal em função do tempo (BECKER, 1994) (Figura 3.5c).

Nos estágios iniciais do cultivo foi demonstrada elevada produção de clorofila para todos os ensaios, devido às curvas de absorbância apresentarem maior inclinação se

comparado com as da biomassa. Além disso, as concavidades das curvas de absorvância apresentaram-se opostas se comparadas com as da biomassa durante a fase exponencial. A máxima absorvância foi obtida com o valor de $0,767 \pm 0,02$ para o meio com concentração de $150,0 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrato no vigésimo primeiro dia de cultivo, mesmo comportamento obtido para a biomassa na mesma concentração de nitrato. Verificou-se também que quanto maior a concentração de nitrato no meio de cultivo maior a absorvância.

A disponibilidade de nitrogênio no meio influencia nos mecanismos celulares como fotossíntese, divisão celular, respiração, transporte intracelular, síntese proteica, etc. Em condições de estresse, ou seja, repressão de nitrogênio, as microalgas tendem acumular energia na forma de polissacarídeos e/ou lipídeos. Este mecanismo de defesa da célula microalgal vem sendo amplamente explorado para a produção de metabólitos como lipídeos, carotenoides e muitos outros (SINGH et al., 2016a). Nesse sentido, a influência do nutriente nitrato de sódio na composição química da microalga *Chlorella minutissima* 26a foi evidenciada caracterizando a biomassa em relação à quantidade de lipídeos e açúcares totais Figura 3.6.

Conforme mostrado na Figura 3.6, a fração mássica de lipídeos na biomassa aumentou 76,3% com o aumento da concentração de nitrato no meio de cultivo, passando de $24,1 \pm 2,4\%$ para $42,5 \pm 1,2\%$ quando a concentração de nitrato aumentou de $37,5 \text{ mg L}^{-1}$ para $150,0 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. Porém a maior variação ocorreu no aumento da concentração do nitrato de $37,5 \text{ mg L}^{-1}$ para $75,0 \text{ mg L}^{-1}$, com valor de 58%. A elevação no teor de lipídeos com o aumento da concentração de nitrato no meio de cultivo também foi avaliada em outros trabalhos utilizando outras espécies de microalgas. Kim, Bae e Lee (2016), por exemplo, cultivando a microalga *Tetraselmis* sp., em fotobiorreatores em batelada observaram aumento de até 51,0% no teor de lipídeos quando a concentração do nitrato no meio foi elevada de $75,0 \text{ mg L}^{-1}$ para $1500,0 \text{ mg L}^{-1}$. Em outro trabalho, Feng et al. (2011) estudaram a influência do uso de elevadas concentrações de nitrato de sódio no meio ($0,075$ a $9,0 \text{ g L}^{-1}$) na composição lipídica da microalga *I. zhangjiangensis*. Os resultados mostraram aumento de 35,1% no teor de lipídeos no cultivo contendo a maior concentração de nitrogênio - $9,0 \text{ g L}^{-1}$ (correspondendo a uma fração mássica de 53,1%) em comparação ao uso de $0,075 \text{ g L}^{-1}$, indicando que a microalga *I. zhangjiangensis* acumulou lipídeos em estresse com alta concentração de nitrato no meio. De fato, estes autores afirmaram que tanto a limitação quanto o excesso de nitrogênio são condições de estresse para as células e podem induzir a produção de lipídeos.

Figura 3.6 - Influência da concentração do nitrato de sódio no meio de cultivo na composição química da microalga *Chlorella minutissima* 26a avaliada pela quantidade de lipídeos e açúcares na composição da biomassa

Fonte: Do autor.

No presente trabalho, o aumento da concentração de nitrato de sódio de $3,75 \times 10^{-2}$ para $15,0 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$ proporcionou acréscimo no teor de carboidratos nas microalgas de até 175%, atingindo a fração mássica de $25,8 \pm 0,7\%$ na biomassa microalgal quando a maior concentração inicial de nitrato no meio foi empregada (Figura 3.6). No trabalho realizado por Pancha et al. (2014), por outro lado, o aumento na concentração de nitrato de sódio de 61,75 até 247,0 mg L^{-1} praticamente não modificou a quantidade de carboidratos na microalga *Scenedesmus sp. CCNM 1077*, mantendo-se este valor em aproximadamente 20% m/m. Já no trabalho realizado por Feng et al. (2011) o aumento de 0,075 à 9 g L^{-1} de nitrato no meio de cultivo diminuiu o teor de carboidrato de 26,6% para 11,1%, demonstrando o comportamento oposto dos resultados obtidos no presente trabalho.

Além da produção da biomassa e de sua análise composicional, a eficiência de extração de proteínas, carboidratos e lipídeos das microalgas de forma sequencial corresponde a um dos desafios que requerem mais estudos para a viabilização de biorefinaria 3G. A forma ou sequencia de extração das frações presentes ou de metabólitos gerados (proteína, lipídeo e carboidrato) influencia diretamente no rendimento global do processo, podendo aumentar o ganho líquido de extração em torno de 66, 5% superando o custo de geração da biomassa (ANSARI et al., 2017a). Particularmente, para a produção de

biocombustíveis, uma alternativa interessante é a extração dos lipídeos produzidos pelas células microalgais seguida da recuperação dos açúcares presentes, favorecendo, por exemplo, a produção de biodiesel e etanol de cada uma destas frações (SUALI; SARBATLY, 2012).

A Figura 3.7 mostra a quantidade de carboidratos presentes na biomassa bruta e após a extração dos lipídeos, em função da concentração do nitrato de sódio no meio de cultivo. Pode-se verificar que, em todos os ensaios, a fração mássica dos açúcares após a extração dos lipídeos apresentou-se maior se comparada com a da biomassa bruta. A maior diferença foi obtida para a biomassa cultivada nos meios contendo menores concentrações de nitrato (37,5 a 75,0 mg L⁻¹). Por exemplo, na concentração de nitrato de 37,5 mg L⁻¹, a Acréscimo dos açúcares na biomassa após a extração foi de 137%, com aumento de $9,7 \pm 0,6\%$ para $23 \pm 0,6\%$ na fração mássica dos carboidratos. Já na concentração de 150,0 mg L⁻¹ de nitrato no meio, observou-se aumento menor de 11,6% na fração mássica de carboidratos presentes, com valores diminuindo de $25,8 \pm 1,3\%$ para $28,8 \pm 0,7\%$. Esse comportamento ocorreu devido às células terem armazenado açúcares, sejam estruturais ou sob a forma de amido, com o aumento de concentração de nitrato no meio de cultivo, reafirmando os dados discutidos com referência à Figura 3.6.

Figura 3.7 – Conteúdo em carboidratos da biomassa microalgal bruta e após a extração dos lipídeos, em função da concentração do nitrato de sódio no meio de cultivo

Fonte: Do autor.

Os carboidratos totais presentes na biomassa microalgal antes e após a extração dos lipídeos foram hidrolisados com ácido sulfúrico e analisados com relação aos açúcares presentes. Os açúcares xilose, galactose e manose foram determinados em conjunto devido ao efeito da co-eluição desses na coluna de CLAE, conforme relatado no trabalho de Cheng et al. (2011).

Na Tabela 3.4 têm-se as frações mássicas do conjunto xilose-galactose-manose e da glicose nas células microalgais obtidas em meios com diferentes concentrações de NaNO_3 antes e após a extração dos lipídeos. O conjunto xilose-galactose-manose e a glicose são açúcares constituintes dos carboidratos comumente presentes nas células das microalgas e representam carboidratos estruturais e fisiológicos, sendo a composição dependente do tipo de microalga selecionada e das condições de cultivo (HERNÁNDEZ et al., 2015; DOAN et al., 2012). Conforme a Tabela 3.4, com relação à biomassa bruta, o cultivo em meio contendo $150,0 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrato de sódio resultou uma constituição celular com cerca de sete vezes mais do conjunto xilose-galactose-manose em comparação ao uso de meio contendo $37,5 \text{ mg L}^{-1}$ de NaNO_3 . Com relação a este conjunto de açúcares, a diferença foi menor para a faixa de concentrações de nitrato empregadas. Pode-se observar também que, em todos os casos, a fração mássica do conjunto xilose-galactose-manose presente foi igual ou superior à de glicose, atingindo o valor máximo de $7,8 \pm 0,6\%$ para concentração de $150,0 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrato de sódio. A Tabela 3.4 mostra também que, considerando-se a composição em carboidratos da biomassa após a extração dos lipídeos, a variação nos teores de glicose e do conjunto xilose-galactose-manose foram menores para os cultivos realizados com concentração inicial de nitrato no meio de $37,5 \text{ mg L}^{-1}$ a $150,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Tabela 3.4 - Composição dos carboidratos da biomassa bruta e após a extração dos lipídeos, extraída por hidrólise ácida e cultivada com diferentes concentrações de nitrogênio (média $\pm$ desvio padrão)

NaNO_3 (mg/L)	Fração mássica (%)			
	Biomassa bruta		Biomassa após a extração dos lipídeos	
	glicose	xil+gal+man*	glicose	xil+gal+man*
37,5	$0,8 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,5$	$6,6 \pm 0,4$	$7,6 \pm 0,5$
75,0	$1,4 \pm 0,3$	$4,7 \pm 0,2$	$6,7 \pm 0,6$	$7,4 \pm 0,6$
112,5	$2,4 \pm 0,4$	$6,2 \pm 0,4$	$6,1 \pm 0,7$	$6,1 \pm 0,4$
150,0	$7,5 \pm 0,3$	$7,8 \pm 0,6$	$7,7 \pm 0,8$	$9,6 \pm 0,8$

* Determinação do conjunto xilose+galactose+manose.

Fonte: Do autor.

Os açúcares redutores e polissacarídeos, como amido e celulose, representam os carboidratos obtidos nas células microalgais. Nas microalgas do gênero *Chlorella*, o amido é o polissacarídeo mais abundante. A determinação dos tipos de açúcares da composição da biomassa microalgal é um processo complexo e difícil. Porém, Ortiz-Tena et al. (2016) cultivaram *Chlorella vulgaris* em meio sintético chamado BG-11 sob cultivo autotrófico em batelada. Os autores observaram que 46,5% dos carboidratos da biomassa eram compostos por amido, seguido por 26,4% de açúcares monoméricos e apenas 6% de polissacarídeos estruturais (parede celular). Neste estudo ainda, encontraram as seguintes composições da biomassa: ramnose (29,1%), galactose (21,2%), glicose (16,2%), xilose e arabinose (11,4%), além da glucosamina (7,9%), manose (7,4%) e ácido glucurônico (6,8%). No presente estudo, não foram medidos os açúcares presentes especificamente na parede celular. No entanto, observou-se que a glicose foi aumentando com o acréscimo da concentração de nitrato. O aumento da concentração de nitrato para 150,0 mg L⁻¹ no meio de cultivo aumentou o teor de glicose na microalga, influenciando nas mudanças da parede celular ou no armazenamento de amido intracelular (HERNÁNDEZ et al., 2015).

A variação da concentração de fonte de nitrogênio no meio de cultivo também influencia a taxa de específica de crescimento (μ) e, conseqüentemente, a produtividade em biomassa (KIM; BAE; LEE, 2016; FENG et al., 2012). No presente estudo, o aumento da concentração inicial de nitrato de sódio no meio de 37,5 mg L⁻¹ até 112,5 mg L⁻¹ resultou em diminuição na taxa específica de crescimento (μ), de 0,222 d⁻¹ para 0,188 d⁻¹, comportamento similar ao observado para a produtividade em biomassa (173,9 $\pm$ 2,3 - 170,0 $\pm$ 11,3 mg L⁻¹ d⁻¹) (Tabela 3.5). Quando a maior concentração de nitrato foi empregada, obteve-se o maior valor de μ (0,320 d⁻¹) e produtividade em biomassa de 262,0 $\pm$ 4,3 mg L⁻¹ d⁻¹, demonstrando o efeito positivo do aumento da concentração de nitrato no meio de cultivo (Tabela 3.5).

Sankar, Daniel e Krastanov (2011) estudaram o cultivo da microalga *Chlorella minutissima* em fotobiorreator tipo tanque, agitado mecanicamente, variando a concentração de nitrato de sódio no meio entre 0 até 10,0 g L⁻¹. Nesse trabalho o melhor valor de $\mu_{\max}$ (0,1875 d⁻¹) foi obtido na concentração de 5 g L⁻¹, igual ao encontrado em nosso estudo para a concentração de 112,5 mg L⁻¹ (0,188 d⁻¹) e abaixo do valor máximo de 0,320 d⁻¹.

Tabela 3.5 – Influência da concentração de nitrato de sódio na taxa específica de crescimento e na produtividade em biomassa, lipídeos e carboidratos em cultivo batelada durante 21 dias de cultivo autotrófico (média $\pm$ desvio padrão)

NaNO ₃ (mg L ⁻¹)	μ (d ⁻¹)	Q _x (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	Q _l (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	Q _c (mg L ⁻¹ d ⁻¹)
37,5	0,222	173,9 $\pm$ 2,3	39,5 $\pm$ 0,5	6,8 $\pm$ 0,1
75,0	0,203	157,5 $\pm$ 17,8	52,9 $\pm$ 6,0	9,0 $\pm$ 1,0
112,5	0,188	170,0 $\pm$ 11,3	58,0 $\pm$ 3,9	19,2 $\pm$ 1,3
150,0	0,320	262,0 $\pm$ 4,3	105,2 $\pm$ 1,7	36,7 $\pm$ 0,6

μ - Taxa específica de crescimento; Q_x – Produtividade em biomassa; Q_l – Produtividade em lipídeos e Q_c – Produtividade em carboidratos.

Fonte: Do autor.

De uma forma geral, o valor máximo de produtividade em biomassa obtido no presente trabalho (262,0 $\pm$ 4,3 mg L⁻¹ d⁻¹) foi superior aos relatados em diferentes trabalhos da literatura. Arora et al. (2015), por exemplo, obtiveram 120 mg L⁻¹ d⁻¹ da produtividade em biomassa da *C. minutissima* em meio contendo 250 mg L⁻¹ de nitrato sódio. Já Ho et al. (2013a) cultivaram a microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E com 1,25 g L⁻¹ de nitrato de potássio no meio, obtendo uma produtividade em biomassa de 180 mg L⁻¹ d⁻¹ com 24 dias de cultivo.

A produtividade em lipídeos e carboidratos também aumentou com a variação na concentração de nitrato de sódio no meio de 37,5 mg L⁻¹ até 112,5 mg L⁻¹ (Tabela 3.5), com aumento percentual de 58,5% e 22,7% para cada uma destas frações macromoleculares, respectivamente. O comportamento da produtividade de lipídeos foi análogo ao trabalho realizado por Kim, Bae e Lee (2016), os quais relataram que a variação na concentração de nitrato de sódio de 75,0 mg L⁻¹ até 1500,0 mg L⁻¹ no cultivo da microalga *Tetraselmis* sp. aumentou a produtividade em lipídeos em 23,4%.

3.4 Conclusão

A variação da concentração inicial de nitrato sódio no meio de cultivo autotrófico da microalga *Chlorella minutissima* 26a influenciou o crescimento e a composição química da biomassa obtida, promovendo o aumento na quantidade e produtividade em biomassa, lipídeos e carboidratos. Os maiores valores de fração mássica de lipídeos e carboidratos obtidos na biomassa antes da extração de lipídeos foram de $42,5 \pm 1,2\%$ e $25,8 \pm 0,7\%$, respectivamente, em cultivo contendo a maior concentração de nitrato ($150,0 \text{ mg L}^{-1}$). A produtividade em lipídeos e carboidratos aumentou $58,5\%$ e $22,7\%$, respectivamente, quando a concentração de nitrato no meio aumentou de $37,5 \text{ mg L}^{-1}$ para $150,0 \text{ mg L}^{-1}$, obtendo-se, respectivamente, valores máximos de $105,2 \pm 1,7 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e $36,7 \pm 0,6 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Os dados demonstram que variação da concentração da fonte de nitrogênio no meio de cultivo influenciou a composição das células, a produtividade em biomassa, lipídeos e carboidratos, o qual consequentemente, é um fator fundamental a ser considerado para integração da produção de bioetanol e biodiesel a partir das microalgas.

Referências

- AL HATTAB, M.; GHALY, A.; PÉREZ DE LOS RÍOS, A. Production of biodiesel from marine and freshwater microalgae: a review. **Advances in Research Italy**, v. 3, n. 24, p. 107–155, 2015.
- ANSARI, F. A. et al. Exploration of microalgae biorefinery by optimizing sequential extraction of major metabolites from *Scenedesmus obliquus*. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 56, n. 12, p. 3407–3412, 2017.
- ANUAR, M. R.; ABDULLAH, A. Z. Challenges in biodiesel industry with regards to feedstock, environmental, social and sustainability issues: a critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 208–223, 2016.
- ARORA, N. et al. Synergistic dynamics of nitrogen and phosphorous influences lipid productivity in *Chlorella minutissima* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 79–87, 2015.
- BECKER, E. W. **Microalgae: biotechnology and microbiology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1994.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959.

- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae - a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557–577, 2010.
- CHENG, Y. S. et al. The impact of cell wall carbohydrate composition on the chitosan flocculation of *Chlorella*. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 1927–1933, 2011.
- CHEW, K. W. et al. Microalgae biorefinery: high value products perspectives. **Bioresource Technology**, v. 229, p. 53–62, 2017.
- DOAN, Q. C. et al. Microalgal biomass for bioethanol fermentation: implications for hypersaline systems with an industrial focus. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 79–88, 2012.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.
- FENG, D. et al. Increased lipid production of the marine oleaginous microalgae *Isochrysis zhangjiangensis* (Chrysophyta) by nitrogen supplement. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 12, p. 6710–6716, 2011.
- FENG, P. et al. Lipid accumulation and growth characteristics of *Chlorella zofingiensis* under different nitrate and phosphate concentrations. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, n. 4, p. 405–410, 2012.
- FENG, Y.; LI, C.; ZHANG, D. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 101–105, 2011.
- GRIFFITHS, M. J.; HARRISON, S. T. L. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, n. 5, p. 493–507, 2009.
- GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. L.; CHANLEY, M. H. (Eds.). Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. New York: Springer US, 1975. p. 29–60.
- HARUN, R.; DANQUAH, M. K. Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 304–309, 2011.
- HERNÁNDEZ, D. et al. Saccharification of carbohydrates in microalgal biomass by physical, chemical and enzymatic pre-treatments as a previous step for bioethanol production. **Chemical Engineering Journal**, v. 262, p. 939–945, 2015.
- HO, S. H. et al. Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 157–165, 2013a.
- HO, S. H. et al. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 191–198, 2013b.
- JOHN, R. P. et al. Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 186–193, 2011.
- KIM, G.; BAE, J.; LEE, K. Nitrate repletion strategy for enhancing lipid production from marine microalga *Tetraselmis* sp. **Bioresource Technology**, v. 205, p. 274–279, 2016.
- KIM, K. H. et al. Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 47–54, 2014.

LOURENÇO, S. DE O. **Cultivo de microalgas marinhas - princípios e aplicações**. São Carlos: Rlma, 2006. 606 p.

MILLÁN-OROPEZA, A.; TORRES-BUSTILLOS, L. G.; FERNÁNDEZ-LINARES, L. Simultaneous effect of nitrate (NO_3^-) concentration, carbon dioxide (CO_2) supply and nitrogen limitation on biomass, lipids, carbohydrates and proteins accumulation in *Nannochloropsis oculata*. **Biofuel Research Journal**, v. 5, n. 1, p. 215–221, 2015.

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

MITRA, D.; VAN LEEUWEN, J. (HANS); LAMSAL, B. Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. **Algal Research**, v. 1, n. 1, p. 40–48, 2012.

MOXLEY, G.; ZHANG, Y.-H. P. More accurate determination of acid-labile carbohydrates in lignocellulose by modified quantitative saccharification. **Energy and Fuels**, v. 21, n. 6, p. 3684–3688, 2007.

ORTIZ-TENA, J. G. et al. Revealing the diversity of algal monosaccharides: fast carbohydrate fingerprinting of microalgae using crude biomass and showcasing sugar distribution in *Chlorella vulgaris* by biomass fractionation. **Algal Research**, v. 17, p. 227–235, 2016.

PANCHA, I. et al. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource Technology**, v. 156, p. 146–154, 2014.

SANKAR, V.; DANIEL, D. K.; KRASTANOV, A. Carbon dioxide fixation by *Chlorella minutissima* batch cultures in a stirred tank bioreactor. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 25, n. 3, p. 2468–2476, 2011.

SINGH, P. et al. Trends and novel strategies for enhancing lipid accumulation and quality in microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 1–16, 2016.

SUALI, E.; SARBATLY, R. Conversion of microalgae to biofuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 6, p. 4316–4342, 2012.

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

4 CULTIVO CONTÍNUO DE *Chlorella minutissima* 26a EM FOTOBIORREATOR *AIRLIFT* DE TUBOS CONCÊNTRICOS COMO ALTERNATIVA PARA BIORREFINARIAS “3G”

RESUMO

A taxa de crescimento e a composição da biomassa das microalgas são influenciadas pelo tipo de fotobiorreator empregado e concentração da fonte de nitrogênio no meio durante o cultivo. A fim de melhorar a produtividade em biomassa, lipídios, carboidratos e proteínas em um cultivo de microalgas *Chlorella minutissima* 26a, utilizou-se o fotobiorreator *airlift* de tubos concêntricos com diferentes concentrações de nitrato no meio. Os resultados demonstraram que o aumento da concentração de nitratos no cultivo contínuo resultou em aumento na concentração da biomassa e do teor de lipídios, diminuindo o teor de carboidratos sem alterar a composição proteica das microalgas. Utilizando-se a concentração de 225 mg L⁻¹ de nitrato no meio, atingiram-se valores de 49,3% de lipídios e 20% de proteínas na biomassa microalgal. Além disso, quando a concentração de nitrato de sódio foi aumentada de 75 para 225 mg L⁻¹ no meio, a produtividade em lipídios, carboidratos, proteínas e biomassa no processo contínuo no fotobiorreator *airlift* foi de 92,8 mg L⁻¹ d⁻¹, 29,1 mg L⁻¹ d⁻¹, 37,7 mg L⁻¹ d⁻¹ e 188,6 mg L⁻¹ d⁻¹, respectivamente.

Palavras-chave: *Chlorella minutissima*. Cultivo contínuo de microalgas. Fotobiorreator *airlift* de tubos concêntricos. Biorrefinaria 3G. Efeito da concentração de nitrogênio

4.1 Introdução

A emissão de dióxido de carbono e outros gases na atmosfera pela queima de combustíveis fósseis tem impacto considerável no efeito estufa, promovendo aquecimento global e mudanças climáticas indesejáveis (MAITY et al., 2014). Assim, as ações estratégicas para reduzir as emissões de gases de efeito estufa e seus efeitos prejudiciais sobre o meio ambiente são urgentes e obrigatórias. Sabe-se que os gases emitidos pela queima de combustíveis renováveis ou fósseis podem ser sequestrados através da fotossíntese durante o crescimento da biomassa de alguns seres vivos (ANUAR; ABDULLAH, 2016; NIGAM; SINGH, 2011) e, neste contexto, as microalgas vêm sendo consideradas como uma das fontes alternativas renováveis mais promissoras para a produção de biocombustíveis devido à rápida taxa de crescimento e alta produtividade em biomassa.

A biomassa microalgal pode ser empregada como matéria-prima para produção de combustíveis e outros compostos de interesse, pois é constituída de lipídios, carboidratos e outros metabólitos que podem ser transformados em biodiesel, bioetanol e químicos diversos. Seu cultivo requer pequenos espaços físicos em comparação com outras culturas e contribui significativamente para a redução do efeito estufa por captura de CO₂ (ZHANG; FUNG; NG, 2015; HARUN; DANQUAH, 2011; BRENNAN; OWENDE, 2010). Além disso, as microalgas também produzem grande quantidade de compostos bioativos para diferentes aplicações em suplementos alimentares, cosméticos, farmacêuticos, entre outros (VAZ et al., 2016). Assim, uma indústria de multiproduto flexível pode ser imaginada através de instalações integradas de uma biorrefinaria “3G” aproveitando o potencial destes organismos (PATEL et al., 2016; SILVA et al., 2016; SETH; WANGIKAR, 2015).

No entanto, existem vários obstáculos que devem ser superados para o uso das microalgas em processos em grande escala, tais como redução dos custos de produção e maximização da produtividade de biomassa, lipídios, carboidratos e outros compostos (JOHN et al., 2011). A fim de aumentar a produção de biomassa e modificar sua composição química, estratégias apropriadas vêm sendo estudadas como a avaliação do efeito e da concentração da fonte de nitrogênio no meio de cultivo (HO et al., 2013b; KIM; BAE; LEE, 2016), promoção da interação das microalgas com o meio, otimização do fluxo de fótons e da fonte de carbono durante o cultivo, e a escolha do modo de operação do fotobiorreator adotado (KUNJAPUR; ELDRIDGE, 2010; OLIVIERI et al., 2015).

Para obtenção de rendimentos apropriados no cultivo de microalgas em escala de bancada são necessários estudos que permitam medir, avaliar e controlar fatores ambientais e nutricionais que afetam o crescimento e a composição da biomassa (VEGA-ESTRADA et al., 2005). Esses estudos de referência possibilitam a aquisição de informações necessárias à produção de microalgas em grande escala. Nesse caso, os fotobiorreatores permitem o metabolismo fotossintético celular e oferecem várias vantagens, como baixa possibilidade de contaminação, melhor controle da taxa de transferência de massa gás-líquido, maior densidade de biomassa, maior exposição à luz, alta produtividade por área e baixo custo de colheita de biomassa. No entanto, a principal desvantagem dos fotobiorreatores é a baixa penetração da luz devido ao aumento da densidade celular no meio durante o tempo de cultivo (KUNJAPUR; ELDRIDGE, 2010). Dessa forma, uma avaliação cuidadosa do projeto do biorreator em relação à geometria interna, ao fluxo de ar apropriado e outras condições de operação, permite a otimização da transferência de oxigênio, condições de mistura, tempo de recirculação e frequência de exposição à luz para o crescimento adequado de microalgas (OLIVIERI; SALATINO; MARZOCHELLA, 2014; KUNJAPUR; ELDRIDGE, 2010; ACIÉN FERNÁNDEZ et al., 2001; GARCÍA CAMACHO et al., 1999). No cultivo contínuo de microalgas, a elevada produtividade em biomassa pode ser obtida graças à redução do tempo não produtivo e emprego de um meio de cultura uniforme e otimizado que facilite etapas futuras do processo (MANDENIUS, 2016).

Apesar de suas vantagens, os fotobiorreatores *airlift* foram poucos relatados na literatura para o cultivo de microalgas em modo contínuo (CHISTI, 2007; VEGA-ESTRADA et al., 2005). Para a microalga do gênero *Chlorella*, estes fotobiorreatores têm sido relatados como promissores (AREMU et al., 2015; ARORA et al., 2015), pois promovem rápido crescimento. Nestes sistemas têm sido obtidos teores lipídicos variando de 10,0 a 48,0% (mássico) (BREDDA et al., 2016; FERREIRA et al., 2013), de carboidratos de 12,0 a 17,0% (mássico) e de proteínas de 40,0 a 60,0% (mássico) (SHEKH et al., 2016; AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015), dependendo das condições de cultivo.

No presente estudo relata-se o efeito de diferentes concentrações de fonte de nitrogênio sobre o crescimento e composição da microalga *Chlorella minutissima* 26a em cultivo autotrófica usando um fotobiorreator *airlift* de tubos concêntricos. O cultivo foi operado em modo contínuo com avaliação da produção de biomassa e composição química em lipídios, carboidratos, proteínas e cinzas.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Microrganismo e preparo do inóculo

A microalga *Chlorella minutissima* 26a foi gentilmente fornecida pela coleção de culturas marinhas do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (São Paulo, SP, Brasil). As microalgas foram armazenadas e mantidas em meio marinho artificial f/2 (GUILLARD, 1975) composto por: 33,3 g L⁻¹ NaCl, 75,0 mg L⁻¹ NaNO₃, 5,0 mg L⁻¹ NaH₂PO₄·H₂O, 3,15 mg L⁻¹ FeCl₃·6H₂O, 22,2 µg L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O, 180 µg L⁻¹ MnCl₂, 6,3 µg L⁻¹ Na₂MoO₄·2H₂O, 10 µg L⁻¹ CoCl₂·6H₂O, 9,8 µg L⁻¹ CuSO₂·5H₂O, 100 µg L⁻¹ Tiamina (B₁), 0,5 µg L⁻¹ Cianocobalamina (B₁₂) e 0,5 µg L⁻¹ Biotina (B₇). O armazenamento foi feito em frascos Erlenmeyer de 250 mL mantidos a 20 °C sob condições luminosas (fluxo de fótons de 80 a 90 µmol m⁻² s⁻¹) e subcultivadas a cada seis semanas. Os inóculos foram preparados no mesmo meio f/2 (900 mL) com a adição de 100 mL da cultura estoque, sendo o cultivo autotrófico realizado durante 10 dias usando um fotobiorreator tubular de 12,0 mm de diâmetro e 28,0 mm de altura em processo batelada (PET transparente) com aeração de 0,24 vvm.

4.2.2 Fotobiorreator airlift de Tubos concêntricos

O fotobiorreator *airlift* de tubos concêntricos usado neste estudo teve as seguintes dimensões: 550 mm de altura por 120 mm de diâmetro com tubos concêntricos (tubo menor concêntrico no interior do maior) de 340 mm por 60 mm, com um volume de trabalho de 3,8 L. O *layout* do biorreator é mostrado na Figura 4.1. Os tubos foram feitos de acrílico transparente para a observação visual e penetração efetiva da luz. O tubo cilíndrico interno foi colocado concentricamente em relação ao tubo externo com espaço de 30 mm entre eles, visando a promover um fluxo ascendente no tubo central e descendente no espaço entre os tubos interno e externo. Ar comprimido foi bombeado através de um filtro estéril e fornecido ao biorreator através de pedras porosas colocadas centralmente na base do tubo interno, com vazão de 0,24 vvm. Para todos os ensaios, a temperatura foi mantida a 30 ± 2 °C e a luz foi fornecida continuamente por meio de lâmpadas fluorescentes com densidade de fluxo de fótons de 125 a 130 µmol m⁻² s⁻¹.

Utilizou-se uma bomba peristáltica para alimentar o fotobiorreator durante a operação em modo contínuo.

Figura 4.1 - Diagrama esquemático do sistema de cultivo utilizado para o crescimento da microalga *C. minutissima* 26a. Fotobiorreator *airlift* com Tubos concêntricos (a), detalhes do sistema *airlift* interno (b)

Fonte: Do autor.

4.2.3 Cultivo batelada no fotobiorreator airlift de tubos concêntricos

Os experimentos em batelada foram realizados para determinar a taxa específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) e, conseqüentemente, determinar o fluxo de alimentação durante o cultivo contínuo. O meio de cultivo sintético f/2 foi utilizado contendo 150 mg L^{-1} de NaNO_3 , e o inóculo (preparado conforme descrito na seção 4.2.1) adicionado de forma a representar uma fração volumétrica de 10% no reator. As amostras foram periodicamente retiradas para medições da biomassa seca. A taxa de crescimento específico foi estimada na fase exponencial pela inclinação da regressão linear obtida na parte linear da curva do logaritmo natural da massa seca em função do tempo. O tempo de residência hidráulico (TRH) foi calculado pela equação $\text{TRH} = 1/D$, com $D = 0,8 \times \mu_{\max}$ (vazão específica de alimentação). A produtividade (P , $\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) foi calculada usando a equação $P = C \times D \times 24 \times 1000$, sendo do C a concentração em massa seca (g L^{-1}).

4.2.4 Cultivo contínuo em fotobiorreator airlift de tubos concêntricos

Em todas os experimentos, o inóculo (preparado como descrito na seção 4.2.1) foi adicionado ao meio de cultivo com fração volumétrica de 10%. No início do cultivo o fotobiorreator *airlift* foi operado em batelada até o crescimento da microalga atingir a fase exponencial. Posteriormente, o fotobiorreator *airlift* foi alimentado com o meio de cultivo f/2 com fluxo de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, variando-se, no entanto, a concentração de nitrato de sódio de 75 a 225 mg L^{-1} . A colheita foi realizada diariamente (em torno de 24 h), sendo a solução de cultivo centrifugada a $1800\times g$ e seca em um estufa a 60°C durante 24 h.

4.2.5 Métodos Analíticos

O crescimento celular foi monitorado medindo-se a biomassa seca. Aliquotas de 10 ml do meio foram centrifugadas a $1800\times g$ durante 10 min, secas em estufa a 60°C por 24 h e pesadas em balança analítica. A umidade foi determinada utilizando uma balança semi-analítica de infravermelho (modelo MB25, OHAUS, Pine Brook, EUA) com um programa de aquecimento para obter a temperatura final de 135°C . As concentrações de nitrato no meio de cultivo foram determinadas de acordo com o método padrão da APHA 4500- NO_3^- (APHA, 1992).

Os lipídios totais intracelulares foram extraídos seguindo o procedimento proposto por Bligh e Dyer (1959), e o rendimento lipídico (%) foi calculado levando em consideração a biomassa seca da amostra. Os carboidratos na biomassa microalgal foram determinados seguindo o método proposto por Moxley e Zhang (2007), utilizando o método fenol-sulfúrico para a determinação total do açúcar (DUBOIS et al., 1956) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a medição de diferentes açúcares monoméricos presentes no hidrolisado de biomassa. O aparelho de CLAE série HPLC Agilent 1200 (Agilent Technologies, Inc., EUA) foi equipado com uma coluna HPX-87H ($300\times 7,8 \text{ mm}$) (Bio-Rad, EUA) e as condições de análise foram as seguintes: temperatura da coluna de 45°C , H_2SO_4 0,01 N como a fase móvel e taxa de fluxo de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ e 20 μL de volume de injeção com detector de índice de refração RID-6A. O teor de proteína bruta foi estimado de acordo com Becker (1994) ("concentração de proteína = teor de nitrogênio $\times 6,25$ "), sendo a concentração total de nitrogênio medida pelo método de Kjeldahl (KIRK, 1950). O teor de cinzas foi determinado seguindo o método analítico de Wychen e Laurens (2013). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Perfil de crescimento em batelada da *Chlorella minutissima* 26a em fotobiorreator airlift de tubos concêntricos

Considerando o perfil de crescimento das microalgas em batelada, a taxa específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) obtida foi $0,008 \text{ h}^{-1}$ ($0,19 \text{ d}^{-1}$) (APÊNDICE B), valor próximo ao relatado por Cabello, Morales e Revah (2014) para a microalga *Scenedesmus obtusiusculus* quando cultivada em fotobiorreator *airlift* de tubos concêntricos de 20,0 L ($\mu_{\max}$, $0,005 \text{ h}^{-1}$). No entanto, os valores de $\mu_{\max}$ podem variar amplamente, como mostrado no trabalho de Olivieri, Salatino e Marzocchella (2014), que relataram valores de 0,1 a $0,8 \text{ d}^{-1}$ para diferentes espécies de *Chlorella*. Esta variação no $\mu_{\max}$ é devida a diferenças nos sistemas e meios de cultivos utilizados.

Embora diferentes concentrações de fontes de nitrogênio usadas em cultivo contínuo possam resultar na modificação dos valores de $\mu_{\max}$, o valor calculado durante o experimento de crescimento em batelada foi selecionado para obtenção de uma estimativa da vazão específica de alimentação a ser utilizada nos ensaios contínuos. Assim, foi considerado um valor de “D” 20% inferior ao valor de $\mu_{\max}$ ($D = 0,006 \text{ h}^{-1}$), com o objetivo de evitar a lavagem no reator (“washout”). Esta diluição correspondeu a um tempo de residência hidráulica (TRH) de 155 h. O biorreator foi então alimentado com fluxo de $0,40 \text{ mL min}^{-1}$ para um volume de trabalho de 3,8 L.

4.3.2 Efeito da concentração de nitrato de sódio no crescimento microalgal em fotobiorreator *airlift* de tubos concêntricos em processo contínuo

O cultivo contínuo foi iniciado após 155 h do processo batelada, alimentando-se o biorreator continuamente com o fluxo especificado de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$. A operação contínua foi realizada por 720 h. Os resultados obtidos para biomassa e concentração de nitrato de sódio remanescente no meio (medido nas alíquotas do cultivo batelada e no fluxo de saída na cultivo contínuo) são mostrados na Figura 4.2. Duas fases principais de cultivo foram apresentadas, uma batelada e outra contínua. A operação contínua foi apresentada considerando os tempos das residências hidráulicas: TRH_1 , TRH_2 e TRH_3 .

Figura 4.2 - Perfil da biomassa (a) e concentração de nitrato remanescente (b) no fotobiorreator *airlift* de tubos concêntricos durante o processo batelada e contínuo com diferentes concentrações de nitrato no meio. TRH – tempo de residência hidráulica

Fonte: Do autor.

Como mostrado na Figura 4.2, a biomassa das microalgas foi maior com o aumento na concentração da fonte de nitrogênio no meio. Os valores de biomassa (Figura 4.2a) na fase batelada foram 0,25 g L⁻¹, 0,40 g L⁻¹ e 0,6 g L⁻¹ para concentrações iniciais de nitratos de 75 mg L⁻¹, 150 mg L⁻¹ e 225 mg L⁻¹, respectivamente. Variação na concentração de biomassa também foi observada usando maiores concentrações de fonte de nitrogênio após o início da alimentação contínua no reator a 155 h. A Figura 4.2a mostra que, durante o primeiro tempo de residência hidráulica de cultivo, TRH₁ (155-310 h), o perfil de crescimento foi instável, provavelmente devido à transição entre modos de operação em batelada e contínuo. Isso era esperado, pois o valor TRH representa o tempo necessário para trocar todo o volume do reator com um dado fluxo de alimentação. Pode-se observar também que, após o primeiro tempo de residência hidráulica, no início da fase TRH₂, o cultivo contínuo atingiu o estado estacionário, com os valores de biomassa (média ± desvio

padrão) neste estado de $0,70 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$, $0,96 \pm 0,09 \text{ g L}^{-1}$ e $1,31 \pm 0,08 \text{ g L}^{-1}$ para os experimentos nos quais a solução de nitrato de sódio na alimentação continha a concentração de 75 mg L^{-1} , 150 mg L^{-1} e 225 mg L^{-1} , respectivamente.

A Figura 4.2b mostra a concentração remanescente de nitrato no fotobiorreator durante o processo de cultivo. Pode-se verificar diminuição na concentração de nitrato de sódio no biorreator durante a fase batelada para o valor de aproximadamente de 10 mg L^{-1} até início do fluxo contínuo de alimentação. Durante a fase contínua, pequenas diferenças podem ser observadas para os ensaios com a alimentação contendo diferentes concentrações de nitrato. Essas diferenças foram mais evidentes na região TRH₃, com concentrações remanescentes de nitrato de sódio de 14 mg L^{-1} , 25 mg L^{-1} e 37 mg L^{-1} para ensaios com fluxo de alimentação iniciais de nitrato de sódio contendo 75 mg L^{-1} , 150 mg L^{-1} e 225 mg L^{-1} , respectivamente. Esta concentração de nitrogênio restante no meio indicou que a quantidade fornecida era maior que a necessária para o crescimento celular, com a fonte de nitrogênio não consumida completamente, mesmo após 6 dias (144 h) de cultivo em batelada. O consumo completo da fonte de nitrogênio foi observado no trabalho de Millán-Oropeza, Torres-Bustillos e Fernández-Linares (2015) em um cultivo batelada da microalga *Nannochloropsis oculata*, após um período de 6, 8 e 8 dias em culturas com concentrações iniciais de nitrato de sódio de 150, 200 e 250 mg L^{-1} , respectivamente. No presente estudo, o biorreator foi alimentado com nitrato em processo contínuo antes de um completo consumo da fonte de nitrogênio. No entanto, a concentração inicial da fonte de nitrogênio teve efeito sobre a biomassa total produzida e sobre a composição das microalgas.

Um perfil semelhante de redução da concentração de nitrogênio no meio de cultivo foi relatado por Kim, Bae e Lee (2016), os quais cultivaram a microalga *Tetraselmis sp.* em diferentes concentrações de nitratos. Eles relataram, no entanto, que a fonte de nitrogênio restante no meio após a fase contínua foi completamente consumida em uma fase seguinte, na qual a biomassa foi cultivada em uma nova fase batelada (*starvation*) sem adição de fonte de nitrogênio (em um segundo biorreator), promovendo estresse na microalga, o que consequentemente provocou mudanças de composição adicionais nas células.

A Figura 4.3 mostra o perfil de crescimento da microalga *Chlorella minutissima* 26a avaliado por absorbância e contagem celular. A absorbância foi medida a 680 nm para avaliar a pigmentação verde (clorofila) produzida pelas microalgas durante a fotossíntese em cultivo autotrófico. Tendo em vista que a produção de clorofila é proporcional ao

crescimento celular microalgal, foi possível acompanhar o perfil de crescimento das células medindo a absorbância neste comprimento de onda (BECKER, 1994) (Figura 4.3a).

Figura 4.3 - Perfil de absorbância (a) e contagem celular (b) no fotobiorreator *airlift* de tubos concêntricos durante a fase batelada e processo contínuo com diferentes concentrações de nitrato no meio. THR – tempo de residência hidráulica

Fonte: Do autor.

Com relação à contagem de células (Figura 4.3b), não houve diferença importante observável nas curvas na fase batelada (até 155 h) com o aumento da concentração de 75 até 225 mg L⁻¹. Após 155 h de cultivo, no processo contínuo, houve grande variação de número de células com o aumento da concentração de nitrato, sendo que, quanto maior a concentração de nitrato no meio maior a contagem de células.

4.3.3 Efeito da variação da concentração de nitrato de sódio na composição da biomassa produzida em fotobiorreator *airlift* de tubos concêntricos em processo contínuo

Além da produção de biomassa, a concentração da fonte de nitrogênio tem sido considerada como um fator decisivo na composição celular de microalgas cultivadas em processo autotrófico (KIM; BAE; LEE, 2016; MILLÁN-OROPEZA; TORRES-BUSTILLOS; FERNÁNDEZ-LINARES, 2015). A Figura 4.4 mostra a composição dos principais componentes bioquímicos da biomassa em função da concentração de NaNO_3 no cultivo contínuo em fotobiorreatores *airlift* de tubos concêntricos considerando três tempos de residência hidráulica após o início do fluxo de alimentação. Conforme mostrado, durante o primeiro tempo de residência hidráulica (TRH_1 , 155-310 h), a concentração inicial de nitrato no meio de alimentação (no fluxo de alimentação) apresentou pequena diferença na composição química da biomassa em comparação com a composição da biomassa obtida a partir do estado estacionário (tempos de residência hidráulicos HRT_2 e HRT_3 , 310-620 h). No entanto, para ambos, tempo de transição ou estado estacionário, houve um comportamento semelhante em relação às mudanças de composição em diferentes concentrações de nitratos.

O teor de proteínas na biomassa não foi influenciado pelas alterações na concentração inicial de nitrato no meio dentro do intervalo avaliado, permanecendo cerca de 20% para todas as concentrações de estudadas. Embora existam alguns relatos na literatura que indicam mudança no teor de proteína devido à variação na concentração inicial da fonte de nitrogênio (AREMU et al., 2015; ILLMAN; SCRAGG; SHALES, 2000), este comportamento depende da faixa avaliada. Kim, Bae e Lee (2016), por exemplo, encontraram maior teor de proteínas na biomassa quando a concentração de nitrato aumentou de 75 mg L^{-1} para 375 mg L^{-1} . Em outro trabalho, Pancha et al. (2014) não observaram qualquer diminuição no teor de proteína bruta nas microalgas *Scenedesmus sp. CCNM 1077* quando a concentração de nitrato no meio de crescimento diminuiu de 247 para $61,75 \text{ mg L}^{-1}$.

Figura 4.4 - Composição bioquímica da *Chlorella minutissima* 26a cultivada em meios com diferentes concentrações de nitratos em fotobiorreator *airlift* de tubos concêntricos em processo contínuo. Os dados correspondem à composição média em diferentes tempos de residência hidráulica (TRH)

Fonte: Do autor.

No presente trabalho, observaram-se mudanças principalmente no teor de lipídios e carboidratos (Figura 4.4), mas somente quando a concentração de nitratos aumentou de 75 para 150 mg L⁻¹, não havendo alterações consideráveis quando a concentração de nitrato de

sódio aumentou de 150 para 225 mg L⁻¹. No estado estacionário, o conteúdo lipídico aumentou de valores médios em torno de 45% para 49% quando a concentração inicial de nitrato de sódio foi alterada de 75 para 150 mg L⁻¹. Por outro lado, o teor de carboidratos diminuiu de valores em torno de 21% para 16% quando a concentração variou de 75 a 150 mg L⁻¹ e apresentou uma ligeira diminuição quando a concentração de nitrato de sódio mudou para 225 mg L⁻¹. Um comportamento semelhante foi relatado por Feng et al. (2011) usando *Isochrysis zhangjiangensis* cultivada em batelada com adição de nitrato em intervalos regulares. Nesse trabalho, os experimentos foram realizados com variação da concentração de nitratos de sódio em uma ampla faixa (0,075-9,0 g L⁻¹). Os autores observaram que o aumento da concentração de nitrogênio no meio resultou em maior teor de lipídios nas células e menores concentrações de carboidratos, sem alterações importantes no teor de proteína.

A acumulação de lipídeos em microalgas promovida pelo aumento da concentração de nitrato no meio de cultura pode ser atribuída a uma maior atividade da enzima acetil-coa carboxilase e outras enzimas chave, as quais promovem a conversão de polissacarídeos em lipídios (MAITY et al., 2014). Diferentemente do observado no presente trabalho, artigos da literatura relatam que a falta ou mesmo um período sem nitrogênio pode levar à acumulação de lipídios em microalgas em vários tipos de meios de cultura (HO et al., 2013b; FENG et al., 2012). Evidentemente, no entanto, a variação da composição microalgal em função da concentração da fonte de nitrogênio no meio depende das espécies de microalgas cultivadas, dos tipos das fontes de nitrogênio e das modificações genéticas e metabólicas, entre outros fatores (KIM; BAE; LEE, 2016; NIGAM; SINGH, 2011).

A Tabela 4.1 mostra a composição da fração mássica de carboidratos da biomassa cultivada em diferentes concentrações de nitrato no estado estacionário, durante o terceiro tempo de residência hidráulica (TRH₃). Os açúcares xilose, galactose e manose foram determinados em conjunto por serem coeluídos na coluna de CLAE empregado, conforme já relatado por Cheng et al. (2011).

O conjunto xilose+galactose+manose apresentou-se em maior quantidade (10,85 ± 0,55%) em meio alimentado com 75 mg L⁻¹ de nitrato de sódio, representando em torno de 50,2% dos açúcares totais, enquanto a glicose representou o segundo maior valor (5,94 ± 0,31%) com 27,5% dos açúcares totais. No entanto, para a biomassa cultivada com 225 mg L⁻¹ de nitrato de sódio, a glicose apresentou-se com o maior valor de fração mássica (8,18

$\pm 0,28\%$), representando 53,8% dos açúcares totais, enquanto os açúcares monoméricos totais (xilose+galactose+manose) representaram apenas 33,6% do valor total. Em todos os casos, a arabinose foi encontrada em menor quantidade ($\sim 4\%$), com diminuição do seu valor de fração mássica quando a concentração inicial de nitrato foi aumentada.

Tabela 4.1 - Composição dos carboidratos após hidrólise ácida da biomassa cultivada em estado estacionário (TRH₃) sob diferentes concentrações de nitrato de sódio no meio (média $\pm$ desvio padrão)

Açúcares	Fração mássica (%)		
	Concentração de NaNO ₃ (mg L ⁻¹)		
	75	150	225
Carboidrato total	21,6 $\pm$ 2,10	16,1 $\pm$ 1,98	15,2 $\pm$ 1,56
Glicose	5,94 $\pm$ 0,31	6,07 $\pm$ 0,52	8,18 $\pm$ 0,28
Xil+Gal+Man	10,85 $\pm$ 0,55	7,12 $\pm$ 0,43	5,11 $\pm$ 0,48
Arabinose	3,60 $\pm$ 0,62	1,51 $\pm$ 0,32	1,12 $\pm$ 0,41
Outros	1,21 $\pm$ 0,42	1,40 $\pm$ 0,61	0,79 $\pm$ 0,39

Fonte: Do autor.

Entre os carboidratos de reserva, o amido é geralmente o polissacarídeo mais abundante nas espécies do gênero *Chlorella*. Ortiz-Tena et al. (2016) cultivaram *Chlorella vulgaris* em meio BG-11 sob cultivo autotrófico em processo batelada e observaram que 46,5% dos carboidratos da biomassa eram compostos por amido, seguido por 26,4% de açúcares monoméricos e apenas 6% de polissacarídeos estruturais (parede celular). Neste estudo, os autores encontraram as seguintes composições: ramnose (29,1%), galactose (21,2%), glicose (16,2%), xilose e arabinose (11,4%), além da glucosamina (7,9%), manose (7,4%) e ácido glicurônico (6,8%). No presente estudo, os açúcares presentes na parede celular não foram medidos. No entanto, a glicose foi determinada em pequenas quantidades quando utilizado 75 mg L⁻¹ de nitrato de sódio no meio de alimentação. O acréscimo na concentração de nitrato de sódio para 225 mg L⁻¹ no meio de cultivo aumentou o teor de glicose, provavelmente porque levou à acumulação de amido na microalga (HERNÁNDEZ et al., 2015).

O efeito da concentração da fonte de nitrogênio avaliado no processo contínuo deve ser considerado a partir de um ponto de vista global e, portanto, a produtividade é um parâmetro importante. A Tabela 4.2 mostra o efeito de diferentes concentrações de

nitrogênio no meio na produtividade em biomassa, lipídios, proteínas e carboidratos durante o estado estacionário. Quando a concentração de nitrato de sódio aumentou de 75 mg L⁻¹ para 225 mg L⁻¹, as produtividades em biomassa, lipídios, proteínas e carboidratos também aumentaram em 88%, 106%, 81% e 37%, respectivamente. Embora o teor de carboidratos na biomassa tenha diminuído com o aumento da concentração de nitrato de sódio no meio (Figura 4.4), a produtividade aumentou, atingindo o valor máximo de $29,1 \pm 1,7$ mg L⁻¹ d⁻¹ para a concentração de 225 mg L⁻¹ (Tabela 4.2), o que pode ser explicado pelo elevado crescimento da biomassa nestas condições.

Tabela 4.2 - Influência da concentração de nitrato de sódio na corrente de alimentação e nas produtividades em lipídeos, carboidratos, proteína e biomassa durante o cultivo contínuo em fotobiorreator *airlift* de tubos concêntrico no estado estacionário (média $\pm$ desvio padrão) com $D = 0,006$ h⁻¹

Concentração NaNO ₃ (mg L ⁻¹)	Produtividade (mg L ⁻¹ d ⁻¹)			
	Biomassa	Lipídeos	Proteína	Carboidrato
75	100,2 $\pm$ 6,1	45,1 $\pm$ 2,7	20,8 $\pm$ 1,3	21,3 $\pm$ 1,3
150	138,8 $\pm$ 12,3	67,9 $\pm$ 6,0	27,8 $\pm$ 2,5	22,6 $\pm$ 2,0
225	188,6 $\pm$ 11,2	92,8 $\pm$ 5,5	37,7 $\pm$ 2,2	29,1 $\pm$ 1,7

Fonte: Do autor.

Os valores na Tabela 4.2 demonstram o grande potencial do fotobiorreator *airlift* de tubos concêntricos no cultivo da microalga *Chlorella minutissima* 26a operado em modo contínuo. As produtividades máximas foram $188,6 \pm 11,2$ mg L⁻¹ d⁻¹ em biomassa e $92,8 \pm 5,5$ mg L⁻¹ d⁻¹ em lipídeos. Estes valores são superiores aos observados no trabalho de Tang et al. (2012), os quais avaliaram processo de cultivo contínuo e autotrófico de *Chlorella minutissima*. No trabalho destes autores, as microalgas foram cultivadas em fotobiorreator tipo tanque com agitação mecânica e processo contínuo e as produtividades máximas em biomassa e lipídios foram de 140 mg L⁻¹ d⁻¹ e 50 mg L⁻¹ d⁻¹, respectivamente. Embora sejam necessários mais estudos para otimizar o cultivo autotrófico em processo contínuo (por exemplo: uso de CO₂ em vez de ar) e investigar outras opções (cultivo heterotrófico ou mixotrófico), o fotobiorreator *airlift* de tubos concêntricos utilizado neste estudo demonstrou ser uma alternativa interessante. Estudos futuros de avaliação de outras possibilidades de utilização deste biorreator, como o controle no fotoperíodo, podem também fornecer informações importantes. De fato, no fotobiorreator, existem duas zonas

de cultivo, com uma região iluminada entre o tubo externo e interno (“*downcomer*”), e uma região escura dentro do tubo interno (“*riser*”) (Figura 4.1b). Na região luminosa, as células recebem luz artificial ou natural ao longo do comprimento do reator para permitir a fotossíntese. Na zona escura, há a mistura de ar com as células, as quais são mantidas sem ou com pouca exposição à luz. Assim, o fotoperíodo realizado pelo fotobiorreator *airlift* permite evitar o efeito da foto-inibição que poderia reduzir a produtividade em biomassa (ABU-GHOSH et al., 2016).

4.4 Conclusão

A variação da concentração da fonte de nitrogênio no meio influenciou fortemente o crescimento e a composição da microalga *Chlorella minutissima* 26a quando cultivada em fotobiorreator *airlift* de tubos concêntricos em processo contínuo. O aumento na concentração de nitrato no meio de cultivo promoveu maior produção de biomassa e maior conteúdo lipídico, resultando ainda em menor teor de carboidratos. No estado estacionário, as produtividades máximas em biomassa, lipídeos, proteína e carboidratos foram de 188,6 mg L⁻¹ d⁻¹, 92,8 ± 5,5 mg L⁻¹ d⁻¹, 37,7 ± 2,2 mg L⁻¹ d⁻¹, 29,1 ± 1,7 mg L⁻¹ d⁻¹, respectivamente, utilizando a concentração de 225 mg L⁻¹ de nitrato de sódio. Nesta condições, a biomassa apresentou 49,2% de lipídios, 20% de proteínas e 15,4% de carboidratos. O fotobiorreator *airlift* de tubos concêntricos demonstrou assim grande potencial para o crescimento da *Chlorella minutissima* em processo contínuo.

Referências

- ABU-GHOSH, S. et al. Flashing light in microalgae biotechnology. **Bioresource Technology**, v. 203, p. 357–363, 2016.
- ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G. et al. Airlift-driven external-loop tubular photobioreactors for outdoor production of microalgae: Assessment of design and performance. **Chemical Engineering Science**, v. 56, n. 8, p. 2721–2732, 2001.
- AL HATTAB, M.; GHALY, A.; PÉREZ DE LOS RÍOS, A. Production of biodiesel from marine and freshwater microalgae: A review. **Advances in Research Italy**, v. 3, n. 24, p. 107–155, 2015.
- ANUAR, M. R.; ABDULLAH, A. Z. Challenges in biodiesel industry with regards to feedstock, environmental, social and sustainability issues: a critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 208–223, 2016.
- APHA. American Public Health Association. **Standard methods for the examination of**

water and wastewaters, 18th edition, Washington DC, 1992.

AREMU, A. O. et al. Manipulation of nitrogen levels and mode of cultivation are viable methods to improve the lipid, fatty acids, phytochemical content, and bioactivities in *Chlorella minutissima*. **Journal of Phycology**, v. 51, n. 4, p. 659–669, 2015.

ARORA, N. et al. Synergistic dynamics of nitrogen and phosphorous influences lipid productivity in *Chlorella minutissima* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 79–87, 2015.

BECKER, E. W. **Microalgae: biotechnology and microbiology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1994. 293 p.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959.

BREDDA, E. H. et al. Evaluation of oil productivity of *Chlorella minutissima* cultivated in two homemade photobioreactors (bubble column and tank). **Journal of Multidisciplinary Engineering Science and Technology**, v. 3, n. 11, p. 6060–6066, 2016.

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

CABELLO, J.; MORALES, M.; REVAH, S. Dynamic photosynthetic response of the microalga *Scenedesmus obtusiusculus* to light intensity perturbations. **Chemical Engineering Journal**, v. 252, p. 104–111, 2014.

CHENG, Y. S. et al. The impact of cell wall carbohydrate composition on the chitosan flocculation of *Chlorella*. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 1927–1933, 2011.

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

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

FENG, D. et al. Increased lipid production of the marine oleaginous microalgae *Isochrysis zhangjiangensis* (Chrysophyta) by nitrogen supplement. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 12, p. 6710–6716, 2011.

FENG, P. et al. Lipid accumulation and growth characteristics of *Chlorella zofingiensis* under different nitrate and phosphate concentrations. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, n. 4, p. 405–410, 2012.

FERREIRA, S. P. et al. Revisão : microalgas : uma fonte alternativa na obtenção de ácidos gordos essenciais. Review : microalgae : an alternative source to obtain essential fatty acids. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n. 3, p. 275–287, 2013.

GARCÍA CAMACHO, F. et al. Use of concentric-tube airlift photobioreactors for microalgal outdoor mass cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, n. 3–4, p. 164–172, 1999.

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. L.; CHANLEY, M. H. (Eds.). Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. New York: Springer US, 1975. p. 29–60.

HARUN, R.; DANQUAH, M. K. Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 304–309, 2011.

HERNÁNDEZ, D. et al. Saccharification of carbohydrates in microalgal biomass by physical, chemical and enzymatic pre-treatments as a previous step for bioethanol production. **Chemical Engineering Journal**, v. 262, p. 939–945, 2015.

HO, S. H. et al. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 191–198, 2013.

ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme Microbial Technology**, v. 27, p. 631–635, 2000.

JOHN, R. P. et al. Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 186–193, 2011.

KIM, G.; BAE, J.; LEE, K. Nitrate repletion strategy for enhancing lipid production from marine microalga *Tetraselmis* sp. **Bioresource Technology**, v. 205, p. 274–279, 2016.

KIRK, P. L. Kjeldahl method for total nitrogen. **Analytical Chemistry**, v. 22, n. 2, p. 354–358, 1950.

KUNJAPUR, A. M.; ELDRIDGE, R. B. Photobioreactor design for commercial biofuel production from microalgae. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 49, n. 8, p. 3516–3526, 2010.

MAITY, J. P. et al. Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives: a mini review. **Energy**, v. 78, p. 104–113, 2014.

MANDENIUS, C.-F. et al. **Bioreactors: design, operation and novel applications**. London: Wiley-VCH, 2016. v. 31.

MILLÁN-OROPEZA, A.; TORRES-BUSTILLOS, L. G.; FERNÁNDEZ-LINARES, L. Simultaneous effect of nitrate (NO_3^-) concentration, carbon dioxide (CO_2) supply and nitrogen limitation on biomass, lipids, carbohydrates and proteins accumulation in *Nannochloropsis oculata*. **Biofuel Research Journal**, v. 5, n. 1, p. 215–221, 2015.

MOXLEY, G.; ZHANG, Y.-H. P. More accurate determination of acid-labile carbohydrates in lignocellulose by modified quantitative saccharification. **Energy and Fuels**, v. 21, n. 6, p. 3684–3688, 2007.

NIGAM, P. S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, n. 1, p. 52–68, 2011.

OLIVIERI, G. et al. Photobioreactors for microalgal cultures: A Lagrangian model coupling hydrodynamics and kinetics. **Biotechnology Progress**, v. 31, n. 5, p. 1259–1272, 2015.

OLIVIERI, G.; SALATINO, P.; MARZOCHELLA, A. Advances in photobioreactors for intensive microalgal production: Configurations, operating strategies and applications. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 89, n. 2, p. 178–195, 2014.

ORTIZ-TENA, J. G. et al. Revealing the diversity of algal monosaccharides: Fast carbohydrate fingerprinting of microalgae using crude biomass and showcasing sugar distribution in *Chlorella vulgaris* by biomass fractionation. **Algal Research**, v. 17, p. 227–235, 2016.

PANCHA, I. et al. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the

- microalgae *Scenedesmus sp. CCNM 1077*. **Bioresource Technology**, v. 156, p. 146–154, 2014.
- PATEL, B. et al. Environmental profile of algal hydrothermal liquefaction: a country specific case study. **Algal Research**, v. 16, p. 127–140, 2016.
- SETH, J. R.; WANGIKAR, P. P. Challenges and opportunities for microalgae-mediated CO₂ capture and biorefinery. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, n. 7, p. 1281–1296, 2015.
- SHEKH, A. Y. et al. Stress enhances poly-unsaturation rich lipid accumulation in *Chlorella sp.* and *Chlamydomonas sp.* **Biomass and Bioenergy**, v. 84, p. 59–66, 2016.
- SILVA, C. M. et al. A comparison between microalgae virtual biorefinery arrangements for bio-oil production based on lab-scale results. **Journal of Cleaner Production**, v. 130, p. 58–57, 2016.
- TANG, H. et al. Continuous microalgae cultivation in a photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 10, p. 2468–2474, 2012.
- VAZ, S. et al. Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 73–77, 2016.
- VEGA-ESTRADA, J. et al. *Haematococcus pluvialis* cultivation in split-cylinder internal-loop airlift photobioreactor under aeration conditions avoiding cell damage. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 1, p. 31–35, 2005.
- WYCHEN, S. VAN; LAURENS, L. M. L. **Determination of total solids and ash in algal biomass: laboratory analytical procedure (LAP)**. Denver: NREL, 2013. 7 p. Technical report, NREL/TP-5100-60956.
- ZHANG, D.; FUNG, K. Y.; NG, K. M. Design of outdoor-gas-treatment photobioreactors: A laboratory - simulated approach. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 54, n. 35, p. 8640–8649, 2015.

5 CULTIVO CONTÍNUO DE *CHLORELLA MINUTISSIMA* 26A EM MEIO CONTENDO LIXIVIADO DILUÍDO DE ATERRO SANITÁRIO USANDO FOTOBIORREATOR *AIRLIFT* DE TUBOS CONCÊNTRICOS

RESUMO

Microalgas são microrganismos com elevado potencial para a obtenção de diferentes compostos de interesse e que possuem características importantes como a possibilidade de crescimento em meios contendo águas residuais e lixiviados de aterro sanitário. Neste caso, pode-se produzir uma biomassa valiosa concomitantemente promovendo a biorremediação destes meios. Neste contexto, o uso de lixiviado de aterro sanitário na composição de meio de cultivo da microalga *Chlorella minutissima* 26a em fotobiorreator *airlift* de tubos concêntricos em processo contínuo foi avaliado, verificando-se também o efeito das microalgas na remoção de compostos orgânicos, nitrato e metais do meio. As concentrações de lixiviado avaliadas foram 5, 7,5 e 10 %, sendo este diluído em solução aquosa contendo 20 g L⁻¹ de NaCl. A influência da concentração de lixiviado no perfil de crescimento da biomassa microalgal, bem como o teor e a produtividade em lipídeos, carboidratos e proteínas foi verificada. O aumento da concentração de 5% até 10% de lixiviado no meio diminuiu o teor de lipídeos na biomassa, aumentou o de carboidratos e não influenciou de forma apreciável o valor da proteína. Os máximos valores de produtividade em biomassa, lipídeos, carboidratos e proteínas foram $232,0 \pm 7,6$, $96,6 \pm 7,8$, $33,4 \pm 2,1$ e $69,2 \pm 3,0$ mg L⁻¹ d⁻¹, respectivamente, dependendo da concentração de lixiviado utilizado no meio de cultivo. Obteve-se também remoção de 92,8%, 90,5% e 100%, respectivamente, na demanda química de oxigênio, compostos orgânicos totais e nitrato presentes. Além disso, metais presentes foram removidos do meio durante o cultivo, resultando na remoção de até 63%, 72%, 100% e 67% para Cr, Fe, Al e Ba, respectivamente. A utilização do lixiviado diluído proveniente de aterro sanitário como meio de cultivo demonstrou ser viável para produção de biomassa microalgal com alto teor e produtividade em lipídeos, carboidratos e proteínas. Esse processo mostrou-se ainda favorável à biorremediação, promovendo a remoção de compostos orgânicos, nitrato e metais presentes.

Palavras-chave: Microalga. Lipídeos. Carboidratos. Lixiviado. Biorremediação.

5.1 Introdução

As microalgas são conhecidas como uma poderosa plataforma biotecnológica para produção de vários produtos de interesse, incluindo biocombustíveis como o bioetanol e o biodiesel, alimentos para animais e aquicultura, pigmentos, polissacarídeos, bioplásticos e compostos orgânicos (GULDHE et al., 2017a). Estes microrganismos também têm sido utilizados como um modelo para biorrefinarias, sendo assim possível obter, em instalações industriais integradas, diferentes produtos a partir da biomassa microalgal (GULDHE et al., 2017b).

O cultivo de microalgas vem sendo realizado em fotobiorreatores com diversas configurações, tais como tubular, placa plana, coluna de bolhas e *airlift*. Estes reatores apresentam vantagens como baixo risco de contaminação, fácil controle e elevada taxa de transferência de massa gás-líquido, redução de perda de água, alta produtividade e baixo custo da colheita (OLIVIERI; SALATINO; MARZOCHELLA, 2014). Se utilizados em processo contínuo, resultam em elevada produtividade em biomassa em função da redução do tempo não produtivo e uniformidade do meio e condições de cultivo, facilitando ainda as etapas posteriores (MANDENIUS et al., 2016).

O metabolismo microalgal pode variar de acordo com a disponibilidade dos nutrientes no meio e condições de cultivo. Quando CO_2 é usado como única fonte de carbono, o metabolismo é chamado de autotrófico, sendo a luz, neste caso, usada como fonte de energia. Quando são utilizados nutrientes orgânicos tais como a glicose, ureia, acetato e outros, como fonte de carbono, o metabolismo é chamado de heterotrófico. Há ainda cultivos microalgais nos quais estes dois tipos de metabolismo ocorrem simultaneamente, sendo usado tanto o CO_2 quanto compostos orgânicos como fonte de carbono, em sinergia, e, neste caso, o metabolismo é chamado de mixotrófico (BRENNAN; OWENDE, 2010). O cultivo mixotrófico apresenta vantagens, tais como rápido crescimento e elevado rendimento em biomassa, além da possibilidade de produção de maior teor de lipídeos, o que seria interessante, por exemplo, para obtenção de biodiesel (MITRA; VAN LEEUWEN; LAMSAL, 2012; HEREDIA-ARROYO et al., 2011).

O meio para cultivo mixotrófico de microalgas pode incluir ampla variedade de opções para sua formulação, entre as quais meios baseados em efluentes. De fato, muitas espécies de microalgas são capazes de utilizar os nutrientes contidos nas águas residuais para seu desenvolvimento, gerando biomassa com elevados rendimentos em lipídeos,

carboidratos e proteínas (GULDHE et al., 2017b; QIN et al., 2014; CHO et al., 2013; FAROOQ et al., 2013; TAM; WONG, 1989). Além disso, as microalgas são conhecidas por absorção de metais (bioacumulação), podendo então ser eficazes na remoção destes em fluxos de águas residuais (RICHARDS; MULLINS, 2013). Uma alternativa interessante e ainda pouco explorada para o cultivo de microalgas é a utilização de meios contendo lixiviados provenientes de aterros sanitários. Lixiviado é um líquido de coloração negra gerado em decorrência da decomposição dos resíduos em aterros, o qual, sob ação das chuvas e atividade microbiana, percolam através da massa. Este efluente provém basicamente das seguintes fontes: da umidade natural dos aterros (que aumenta em períodos de chuva), dos materiais que possuem água em sua constituição, da água superficial e da mistura resultante do processo de decomposição dos resíduos (PENG, 2017). A composição dos lixiviados de aterros apresenta variações dependendo dos constituintes dos aterros sanitários, do tipo de flora microbiana, das características do solo, do padrão de precipitação pluviométrica e da idade do aterro (EL-GOHARY; KAMEL, 2016). No entanto, a maioria dos lixiviados tem a mesma composição basal caracterizada por quatro grupos de poluentes: matéria orgânica dissolvida expressa como “Demanda Química de Oxigênio” (DQO) ou “Carbono Orgânico Total” (COT), incluindo CH_4 , ácidos graxos voláteis e alguns compostos refratários como compostos fúlvicos e húmicos; componentes macroinorgânicos como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- ; metais pesados e compostos orgânicos xenobióticos como hidrocarbonetos aromáticos, fenóis e alifáticos clorados (NAVEEN et al., 2016).

O uso de lixiviado como meio de cultivo de microalgas ou uso de microalgas como método de tratamento e opção para reutilização de lixiviados provenientes de aterros sanitários ainda é pouco relatado na literatura (LIN et al., 2007; REIS, 2014; ZHAO et al., 2014), sendo o desafio fundamental encontrar a espécie, condições do meio e outros fatores para que o microrganismo possa crescer, tendo em vista a toxicidade dos poluentes contidos nos lixiviados (ARUNBABU; INDU; RAMASAMY, 2017). As espécies marinhas de microalgas parecem ser mais adequadas para crescimento em meios contendo lixiviado de aterros sanitários em comparação às espécies de água doce, pois a presença de sal no meio pode reduzir consideravelmente a contaminação pela biota contida no lixiviado ou adquirida durante o processo, eliminando custos da desinfecção ou controle prévio (RICHARDS; MULLINS, 2013).

No entanto, para avaliar o uso de lixiviado proveniente de aterro sanitário como meio de cultivo de microalgas e ainda utilizar a biomassa produzida nesse processo como

fonte de matéria-prima na produção de biocombustíveis, é necessário o estudo das condições que permitam maior absorção dos nutrientes orgânicos e metais presentes e resultem em maior produtividade em biomassa, lipídeos, carboidratos e outros componentes gerados pelas microalgas. Neste sentido, no presente trabalho avaliou-se o cultivo mixotrófico da espécie marinha de microalga *Chlorella minutissima* 26a em meio contendo lixiviado proveniente de aterro sanitário, empregando-se um fotobiorreator tipo *airlift* de tubos concêntricos. O processo foi operado em modo contínuo, com avaliação da produção de biomassa e composição química desta em lipídeos, carboidratos, proteínas e cinzas. Procedeu-se também à caracterização do lixiviado antes e após o cultivo em relação à DQO, Carbono Orgânico Total (COT) e concentração de metais, verificando-se assim o potencial de uso do processo para biorremediação. O fotobiorreator do tipo *airlift* foi selecionado em função de algumas vantagens, como favorecimento da mistura e transferência de massa gás-líquido, além de ser uma configuração adequada para o contato da luz com as células microalgais (MERCHUK; GLUZ, 2002). Com relação à espécie de microalga utilizada, esta foi empregada devido a suas características desejáveis, como elevada taxa de crescimento e absorção de nutrientes, baixo estresse e grande capacidade de competição com outros micro-organismos em ambientes eutróficos (FRANCESCHINI et al., 2009).

5.2 Materiais e Métodos

5.2.1 Espécie, armazenamento e cultivo do inóculo

A microalga *Chlorella minutissima* 26a foi gentilmente fornecida pela coleção de culturas marinhas do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (São Paulo, SP, Brasil). Foram mantidas em meio marinho artificial f/2 (GUILLARD, 1975) com 33,3 g L⁻¹ NaCl, 75,0 mg L⁻¹ NaNO₃, 5,0 mg L⁻¹ NaH₂PO₄·H₂O, 3,15 mg L⁻¹ FeCl₃·6H₂O, 22,2 µg L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O, 180 µg L⁻¹ MnCl₂, 6,3 µg L⁻¹ Na₂MoO₄·2H₂O, 10 µg L⁻¹ CoCl₂·6H₂O, 9,8 µg L⁻¹ CuSO₂·5H₂O, 100 µg L⁻¹ Tiamina (B₁), 0,5 µg L⁻¹ Cianocobalamina (B₁₂) e 0,5 µg L⁻¹ Biotina (B₇). Os cultivos de manutenção foram feitos em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio, mantidos a 20 °C sob condições de iluminação com lâmpadas fluorescentes (fluxo de fótons de 80 a 90 µmol m⁻²

s^{-1}) e subcultivadas a cada seis semanas. Os inóculos foram preparados no mesmo meio f/2 com volume de 900 mL e com adição de 100 mL da cultura estoque, porém com concentração de NaCl no meio de $20,0 \text{ g L}^{-1}$. Neste caso, o cultivo autotrófico foi realizado durante 10 dias usando um fotobiorreator tubular de bolhas (PET transparente) de 12,0 mm de diâmetro e 28,0 mm de altura, em processo batelada com aeração de 0,24 vvm.

5.2.2 Procedência e armazenamento do lixiviado de aterro sanitário

O lixiviado proveniente de aterro sanitário foi coletado do tanque de lixiviado no Aterro Sanitário de Cachoeira Paulista/SP, Brasil, o qual está sob administração da empresa Vale Soluções Ambientais (VSA, Cachoeira Paulista, SP, Brasil). O volume de 200 L foi acondicionado em bombona sob temperatura de 9°C em câmara fria. O lixiviado foi filtrado com filtro de papel quantitativo (80 g m^{-2}) antes de ser utilizado na preparação dos meios de cultivo.

5.2.3 Cultivo batelada e contínuo da microalga em fotobiorreator *airlift* de tubos concêntricos

O meios de cultivo empregados foram preparados contendo inicialmente 5%, 10% ou 15% (v/v) de lixiviado diluído em água e 20 g L^{-1} de NaCl. O fotobiorreator utilizado foi o *airlift* de tubos concêntricos com dimensões de 550 mm de comprimento por 120 mm de diâmetro do tubo externo e 340 mm de comprimento por 60 mm de diâmetro do tubo interno, sendo o sistema utilizado nos ensaios mostrado na Figura 5.1. O cultivo foi realizado com volume de trabalho de 3,8 L, sendo inoculado com 10% v/v suspensão de microalgas preparada conforme descrito na seção 5.2.1.

Processo batelada foi realizado com meio contendo 5% de lixiviado para determinar a taxa específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) e, consequentemente, determinar a vazão de alimentação durante o cultivo contínuo. A taxa específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) foi estimada na fase exponencial pela inclinação da curva obtida por regressão linear do logaritmo natural da massa seca em função do tempo (considerou-se apenas a região linear do gráfico).

Figura 5.1 -Sistema de cultivo usado na produção da microalga *Chlorella minutissima* 26a em meio contendo lixiviado diluído: imagem do fotobiorreator vazio (a) e carregado com meio de cultivo (b)

Fonte: Do autor.

Para o cultivo contínuo, o tempo de residência hidráulico (TRH) foi calculado pela Equação 2 e a produtividade (P , $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) foi calculada usando a equação 3.

$$TRH = \frac{1}{D} \quad (2)$$

Em que: D é a vazão específica de alimentação e foi considerada como 80% de μ_{max} .

$$P = C \times D \times 24 \times 1000 \quad (3)$$

Em que C é a concentração de biomassa seca em g L^{-1} .

No início do cultivo contínuo, o fotobiorreator *airlift* foi operado em batelada com o meio contendo 5% de lixiviado até o crescimento da microalga atingir a fase exponencial. Posteriormente, o reator passou a ser alimentado com meio com fluxo calculado com base no valor da vazão específica de alimentação (D). O cultivo contínuo foi realizado em três fases, cada uma delas com duração de pelo menos 3 TRH e contendo concentrações crescentes de lixiviado no meio (v/v): 5%, 7,5% e 10%.

O perfil de crescimento microalgal foi monitorado diariamente por contagem de células, medida de biomassa seca e absorbância a 680nm, medindo-se também nas amostras a concentração de nitrato no meio.

A colheita foi realizada periodicamente, sendo a suspensão obtida centrifugada a 1800×g e seca em estufa a 60 °C durante 24 h.

5.2.4 Métodos analíticos

Para a medição da biomassa seca, alíquotas de 10 ml do meio foram centrifugadas a 1800×g durante 10 min, secas em estufa a 60 °C por 24 h e pesadas em balança analítica. A umidade foi determinada utilizando uma balança semi-analítica de infravermelho (modelo MB25, OHAUS, Pine Brook, EUA) com um programa de aquecimento para obter a temperatura final de 135 °C. Os valores de absorbância foram medidos por espectrofotometria UV-visível (espectrofotômetro Jenway, modelo 7305, Stone, Staffs, UK) em 680 nm, sendo que, para isto, alíquotas de 3,0 mL da amostra foram analisadas em cubeta de quartzo. A contagem celular foi realizada em um microscópio (Motic mod. BA400) com auxílio de um hemacitômetro tipo câmara de Neubauer de 0,1 mm de profundidade, sendo usados os quadrículos das extremidades e o quadrículo central do quadrado central para a contagem.

Para determinação do diâmetro médio das células foi utilizado o programa Image J, o qual é um programa para processamento e análise de imagens, desenvolvido por Wayne Rasband no *National Institute of Mental Health*, USA, em linguagem Java (RASBAND, 2017). Para isto, micrografias obtidas em microscópio óptico (magnificação de 600 vezes) foram tratadas com auxílio do programa, tendo-se por base o trabalho de Arora et al. (2015).

As concentrações de nitrato no meio de cultivo foram determinadas por espectrofotometria de acordo com o método padrão da APHA 4500-NO₃⁻ (APHA, 1992). Para isto, no cultivo em batelada, as análises foram feitas nas amostras retiradas periodicamente do reator. Para o caso do cultivo contínuo, amostras periódicas foram retiradas da corrente de saída.

As análises de COT e DQO do lixiviado antes após o cultivo com a microalga foram realizadas empregando-se os métodos 5310-A e 5520-B, respectivamente, conforme descrito no “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*” (APHA/AWWA/WEF, 2005). Por se tratar de amostra salina, a análise de DQO foi feita após diluição em água e adição de sulfato de mercúrio, conforme Kayaalp et al. (2010). O valor de COT foi determinado empregando-se o analisador Shimadzu modelo TOC-V CPN (Shimadzu, Japão), fazendo-se um teste em branco com uma solução de cloreto de sódio

20g/L para que a influência do sal na análise fosse considerada. O valor de DQO foi determinado pela redução dos compostos orgânicos oxidáveis usando o dicromato de potássio, em meio ácido e na presença de um catalisador. A amostra foi digerida 200°C por 2 horas com auxílio de um bloco digestor, reduzindo-se o íon dicromato para íon crômico de cor verde e medindo-se a absorbância no comprimento de onda 620 nm (BRITO, 2014). Por se tratar de amostra salina, a análise de DQO foi feita após diluição em água e adição de sulfato de mercúrio, conforme Kayaalp et al. (2010).

A análise de metais das amostras foi feita utilizando a técnica de Espectrometria de Emissão Óptica, ICP-OES, realizada no Laboratório de Meio Ambiente da Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. O equipamento utilizado foi o modelo Optima 8000 da marca PerkinElmer (PerkinElmer, USA).

A composição lipídica da biomassa microalgal foi determinada após a extração dos lipídeos feita conforme o procedimento proposto por Bligh e Dyer (1959). O teor lipídico (%) foi calculado levando em consideração a biomassa seca da amostra antes e após a extração. O teor carboidratos (%) na biomassa microalgal foi determinado seguindo o método proposto por Moxley e Zhang (2007), e a determinação dos açúcares totais utilizando o método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) e Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi utilizada para a medição dos açúcares monoméricos presentes no hidrolisado de biomassa. O cromatógrafo série HPLC Agilent 1200 (Agilent Technologies, Inc., EUA) foi equipado com uma coluna HPX-87H (300x7,8 mm) (Bio-Rad, EUA) e as condições de análise foram as seguintes: temperatura da coluna de 45 °C, H₂SO₄ 0,01 N como fase móvel com vazão de 0,6 mL min⁻¹ e 20 µL de volume de injeção com detector de índice de refração RID-6A. O teor de proteína bruta foi estimado de acordo com Becker (1994), sendo "teor de proteína = concentração de nitrogênio×6,25", com a concentração total de nitrogênio medida pelo método de Kjeldahl (KIRK, 1950). O teor de cinzas (%) foi calculado segundo o método analítico de Wychen e Laurens (2013). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Cultivo da microalga *Chlorella minutissima* 26a em batelada em fotobiorreator *airlift* de tubos concêntricos em meio contendo lixiviado: determinação da taxa específica máxima de crescimento microbiano

As microalgas foram cultivadas de forma mixotrófica em fotobiorreator *airlift* de tubos concêntricos contendo lixiviado de aterro sanitário e cloreto de sódio. Para o cultivo, considerando-se a presença de sal no lixiviado, a concentração de cloreto de sódio empregada (20 g L^{-1}) foi inferior à normalmente utilizada no meio Guillard f/2 ($33,3 \text{ g L}^{-1}$). O valor empregado foi baseado em experimentos preliminares e no trabalho de Cao et al. (2014), no qual foram cultivadas células de *Chlorella minutissima* UTEX 2341. A adição de NaCl no meio de cultivo também propicia baixa contaminação por meio da biota contida no lixiviado devido a ação da pressão osmótica exercida extracelularmente nas células em meio salino.

Com base no perfil de crescimento das microalgas no processo em batelada, a taxa específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) obtida foi de $0,01247 \text{ h}^{-1}$ ($0,30 \text{ d}^{-1}$) (APÊNDICE C), valor similar ao relatado por Zhao et al. (2014) para a microalga *Chlorella pyrenoidosa* cultivada em frascos de 500 mL contendo 10% (v/v) de lixiviado proveniente de aterro sanitário ($\mu_{\max} = 0,28 \text{ d}^{-1}$).

O valor calculado no sistema de cultivo em processo batelada foi usado como base para determinar a vazão específica de alimentação (D) a ser utilizada no ensaio contínuo. Com objetivo de evitar a lavagem do reator (“washout”) e favorecer elevada produtividade em biomassa, o valor de D ($0,009 \text{ h}^{-1}$) empregado foi 20% inferior ao de $\mu_{\max}$. Esta vazão específica de alimentação correspondeu a um tempo de residência hidráulica (TRH) de 103,2 h e, desta forma, o fotobiorreator *airlift* foi alimentado, durante o processo contínuo, com fluxo de $0,62 \text{ mL min}^{-1}$ de meio de cultivo para um volume de trabalho de 3,8 L.

O meio contendo lixiviado diluído mostrou-se favorável ao crescimento da microalga *Chlorella minutissima* 26a. De fato, progressivamente, a cor verde característica da pigmentação da “clorofila a” foi se intensificando, apresentando maior intensidade no quarto dia de cultivo, conforme mostrado na Figura 5.2.

Figura 5.2 – Imagem da microalga *Chlorella minutissima* 26a no fotobiorreator *airlift* durante o primeiro (a), segundo (b), terceiro (c) e quarto (d) dia de cultivo em meio contendo 5% (v/v) de lixiviado diluído

Fonte: Do autor.

5.3.2 Efeito da concentração do lixiviado no meio de cultivo da microalga *Chlorella minutissima* 26a usando o fotobiorreator *airlift* de tubos concêntricos em processo contínuo

A alimentação do processo contínuo foi iniciada após 103,2 h do cultivo batelada, sendo o fotobiorreator alimentado com um fluxo de $0,62 \text{ mL min}^{-1}$ de meio contendo diferentes concentrações de lixiviado de aterro sanitário. A operação contínua foi realizada até 1082 h de cultivo e os resultados obtidos para a biomassa seca e a concentração de íons nitrato remanescente no meio de cultivo são mostrados na Figura 5.3. A concentração de nitrato foi medida na corrente de saída do reator como um representativo das fontes de nitrogênio presentes no meio.

Figura 5.3 - Perfil da biomassa (a) e nitrato remanescente no meio (b) correspondentes ao cultivo realizado com diferentes concentrações de lixiviado (5, 7,5 e 10% (v/v)) usando fotobiorreator *airlift* de tubos concêntricos

Fonte: Do autor.

O cultivo da microalga *Chlorella minutissima* 26a usando lixiviado diluído como meio de crescimento apresentou-se viável nas condições estudadas. O perfil da concentração de biomassa no processo contínuo apresentou pequena variação de valores em função do aumento da concentração de lixiviado no meio (Figura 5.3a). A baixa variação na concentração de biomassa em função das diferentes concentrações de lixiviado no meio correspondeu a um comportamento similar ao observado por Markou; Ionomou e Muylaert (2016). Estes autores relataram que o uso de concentração inicial de lixiviado proveniente de águas residuais da produção de aves de 10% a 25% (v/v) resultou em pouca alteração na produção de biomassa da *C. vulgaris*, obtendo-se valores de concentração entre 1,76 - 1,86 g L⁻¹ em cultivo batelada.

Conforme mostrado na Figura 5.3, uma fase transiente parece ter ocorrido quando a concentração de lixiviado na alimentação foi elevada de 5% para 7,5% (v/v) entre 480 h e 600 h de cultivo (Figura 5.3a). Esta fase transiente também foi observada quando a concentração foi elevada para 10% de lixiviado na alimentação, ocorrendo entre 890h até 960h de cultivo. Neste caso, houve um decréscimo inicial da concentração de biomassa, seguido por um aumento neste valor, indicando que as células precisaram de um período de adaptação à maior concentração de lixiviado empregada. Este comportamento também é evidenciado pela Figura 5.3b, na qual se observou aumento inicial da concentração remanescente de nitrato no meio, seguido de redução no valor.

Em média, durante o cultivo com 5, 7,5 e 10% (v/v) de lixiviado no meio de alimentação, a concentração da biomassa seca produzida na fase estacionária foi de $0,96 \pm 0,04$, $1,09 \pm 0,02$ e $1,01 \pm 0,04$ g L⁻¹, respectivamente. Estes valores foram inferiores aos obtidos por Zhao et al. (2014), os quais estudaram o cultivo batelada da microalga *Chlorella pyrenoidosa* (FACHB-9) em meio contendo lixiviado diluído de aterro sanitário, variando a concentração inicial deste de 0 a 20% (v/v). A maior concentração de biomassa obtida naquele trabalho foi de 1,58 g L⁻¹ no meio contendo 10% (v/v) de lixiviado diluído. Deve-se, no entanto, considerar que foi empregada uma espécie de microalga diferente da utilizada no presente trabalho cultivada em batelada em um meio contendo lixiviado de outra origem.

A Figura 5.3b mostra que a concentração de nitrato remanescente variou com a concentração de lixiviado no meio de cultivo. O lixiviado de aterro sanitário apresentava, inicialmente, cerca de 90 mg L⁻¹ de nitrato. Na fase batelada com 5% (v/v) de lixiviado diluído na alimentação (até 103,2 h), a concentração de nitrato remanescente no meio diminuiu proporcionalmente ao aumento da biomassa, demonstrando que a fonte de nitrogênio existente no lixiviado foi consumida pela microalga para o desenvolvimento celular. Após o início da alimentação do fotobiorreator, a concentração de nitrato diminuiu lentamente até atingir, em 288,7 h, valores não detectáveis. Quando se passou a alimentar o reator com 7,5% (v/v) de lixiviado, a concentração de nitrato aumentou, em uma fase transiente, até atingir 45,5 mg L⁻¹, diminuindo até atingir valores próximos de zero em 650 h. O aumento na concentração de lixiviado na alimentação para 10% (v/v) resultou em aumento na concentração de nitrato remanescente até atingir o valor de 74,8 mg L⁻¹, diminuindo em seguida até o valor médio de 24,3 mg L⁻¹, não sendo totalmente consumido no processo. A análise das Figura 5.3a,b mostrou que, ao aumentar-se a concentração de lixiviado de 5% para 7,5%, com o consequente aumento na concentração de nitrato e

outras fontes de nitrogênio presentes, observou-se maior concentração de biomassa. O aumento de 7,5% para 10% de lixiviado, no entanto, não teve o mesmo efeito, resultando inclusive em um consumo apenas parcial de nitrato. Este comportamento pode ser atribuído ao estresse provocado pelo aumento da concentração de componentes tóxicos contidos no lixiviado, os quais inibem o crescimento microalgal (KIM; BAE; LEE, 2016; LIN et al., 2007). Uma alternativa, neste caso, seria a suplementação do meio com outras fontes de nitrogênio o que, no entanto, iria aumentar os custos do processo.

Analisando o perfil da absorbância a 680 nm em função do tempo de cultivo (Figura 5.4a), observou-se que seu valor aumentou durante a fase batelada e continuou aumentando após o início do processo contínuo. O valor máximo (1,42) foi atingido em 191 h de cultivo, sendo que, após este tempo o valor de absorbância foi diminuindo gradativamente até atingir cerca de 0,65 no tempo de 384 h. Este valor permaneceu então aproximadamente constante durante o período no qual a alimentação continha 5% de lixiviado, sendo notadas apenas pequenas variações quando a concentração de lixiviado foi aumentada para 7,5% e 10% v/v. Os resultados mostrados na Figura 5.4a demonstram que a fase transiente observada após o início da alimentação contínua foi maior para os resultados de absorbância em comparação ao verificado para biomassa seca (Figura 5.3a), de fato, a medida de absorbância a 680 nm está relacionada à quantidade de “clorofila a” presente nas células, sendo assim um indicativo indireto da atividade fotossintética das microalgas. Desta forma, a redução no valor da absorbância observada após 191 h de cultivo indica modificação do metabolismo das microalgas, aumentando-se a participação das fontes orgânicas de nutrientes presentes no meio no crescimento microalgal. Esta modificação foi gradual e resultou na longa fase transiente mostrada na Figura 5.4a, sendo dependente de fatores como a adaptação das células ao meio após a estabilização das condições no sistema contínuo.

Figura 5.4 - Perfil da absorbância a 680 nm (a) e número de células (b) correspondentes ao cultivo realizado com diferentes concentrações de lixiviado (5, 7,5 e 10% (v/v)) usando fotobiorreator *airlift* de tubos concêntricos

Fonte: Do autor.

A Figura 5.4b apresenta o perfil da contagem do número de células em função do tempo de cultivo. Conforme mostrado, a população de células de microalgas cresceu na fase batelada e no início do processo contínuo, atingindo um valor máximo de $14,25 \times 10^6$ células mL⁻¹ no tempo de 166,8 h. Após este tempo, a concentração foi diminuindo, atingindo o valor de $7,00 \times 10^6$ células mL⁻¹ no tempo de 239,8 h. Após o início da alimentação contínua com cada uma das diferentes concentrações de lixiviado avaliadas, houve uma fase transitória até a estabilização em um estado estacionário, com valores em média menores quando 10% de lixiviado foi empregado no meio alimentado no reator.

A redução no número médio de células para maior concentração de lixiviado na corrente de alimentação está relacionada à maior concentração de compostos tóxicos presentes neste caso, a qual resultou em redução na população microalgal. Esta redução

populacional, no entanto, foi acompanhada de aumento no tamanho médio das células microalgais (Figura 5.5 e Tabela 5.1), o que acarretou maior concentração de biomassa, como mostrado na Figura 5.3a.

Tabela 5.1 - População média no estado estacionário e o tamanho médio das células de microalgas em função da concentração de lixiviado no meio na corrente de alimentação do fotobiorreator *airlift* durante o cultivo contínuo (média $\pm$ desvio padrão)

Concentração de lixiviado no meio (% v/v)	População média de microalgas ($\times 10^{-6}$) (células/mL)	Tamanho médio das células ($\times 10^4$) (mm)
5	7,16 $\pm$ 0,61	1,01 $\pm$ 0,03
7,5	7,02 $\pm$ 0,29	1,10 $\pm$ 0,02
10	4,41 $\pm$ 0,33	1,53 $\pm$ 0,23

Fonte: Do autor.

O aumento no tamanho médio das células para maiores concentrações de lixiviado no meio pode estar relacionado às condições de estresse às quais as microalgas foram submetidas nestas condições. Neste caso, em resposta à maior presença de compostos tóxicos, porém com maior abundância de fontes de carbono, as células podem estar acumulando compostos de reserva, como amido ou outro polissacarídeo.

Figura 5.5 - Micrografias da microalga *Chlorella minutissima* 26a correspondentes ao cultivo realizado com diferentes concentrações de lixiviado usando fotobiorreator airlift de tubos concêntricos. Concentração de lixiviado na alimentação do reator: (a) 5% (v/v), (b) 7,5% (v/v) e (c, d) 10% (v/v)

Aumento de 600 vezes (a, b e c) e 1000 vezes (d).

Fonte: Do autor.

5.3.3 Efeito da concentração do lixiviado diluído na composição e produtividade da biomassa produzida no fotobiorreator *airlift* de tubos concêntricos em processo contínuo

A biomassa da *Chlorella minutissima* 26a cultivada em meio contendo 5%, 7,5% e 10% (v/v) de lixiviado diluído foi colhida diariamente, agrupada de acordo com os tempos de residência hidráulica (TRH1, TRH2 e TRH3). As biomassas cultivadas no estado estacionário (de forma geral, em TRH2 e TRH3), foram analisadas quanto a sua composição em lipídeos, carboidratos, proteína e cinzas (Figura 5.6).

A falta de nitrogênio no meio de cultivo possibilita o acúmulo de lipídeos e carboidratos na biomassa devido ao estresse gerado na célula pela falta do nutriente (“Nitrogen starvation”) (KIM; BAE; LEE, 2016; HO et al., 2013a). Porém em nosso

estudo, o consumo integral do nitrato no meio contendo 5% e 7,5% de lixiviado (Figura 5.3b), não possibilitou a formação do estresse pela falta do nutriente. Pois o meio estava sendo alimentado continuamente, fluxo contínuo, com fonte de nitrato, o qual provavelmente foi sendo consumindo para a formação da biomassa proporcional a concentração no meio. E ainda, possivelmente existem outras fontes de nitrogênio proveniente do lixiviado, como nitrogênio amoniacal, que o método utilizado não detectou. Dessa forma, podemos afirmar que o processo de estresse no meio de cultivo não foi gerado nesse trabalho.

Figura 5.6 - Composição da biomassa de *Chlorella minutissima* 26a cultivada em meios com diferentes diluições de lixiviado no meio alimentado em fotobiorreator *airlift* de tubos concêntricos no processo contínuo durante o estado estacionário: (a) 5% v/v de lixiviado no meio; (b) 7,5% v/v de lixiviado no meio; (c) 10% v/v de lixiviado no meio

Fonte: Do autor.

A análise da Figura 5.6 mostra que a variação na concentração de lixiviado no meio alimentado no reator em processo contínuo teve pouca influência em sua composição em termos de proteínas, cujo teor ficou próximo de 30% em todos os casos. Com relação ao teor de lipídeos, por outro lado, o aumento na concentração de lixiviado resultou em redução no teor deste componente, de 47,3% para 37,%, respectivamente, para concentrações de lixiviado de 5% e 10% v/v. O aumento na concentração de lixiviado resultou ainda em maior teor de cinzas nas células microalgais. Além disso, obteve-se um teor de carboidratos de cerca de 9% para concentrações de lixiviado de 5% e 7,5% v/v, valor este elevado para cerca de 15% quando a concentração de lixiviado na alimentação foi de 10%.

Com referência ao aumento no teor de cinzas, este pode estar relacionado à absorção dos nutrientes inorgânicos e metais contido no lixiviado (RICHARDS; MULLINS, 2013), conforme será discutido na próxima seção.

Com relação à variação no teor de lipídeos nas microalgas, a variação na quantidade deste componente na biomassa é dependente de diferentes fatores, entre os quais a disponibilidade de fonte de nitrogênio (MILLÁN-OROPEZA; TORRES-BUSTILLOS; FERNÁNDEZ-LINARES, 2015). A escassez de fontes de nitrogênio ou mesmo a submissão das células a um período sem nitrogênio (“starvation”) pode levar à acumulação de lipídios em microalgas em vários tipos de meios de cultura (HO et al., 2013b; FENG et al., 2012). No entanto, este comportamento pode variar dependendo da espécie, da faixa de concentrações avaliada e da composição do meio e tipo de cultivo, sendo possível a redução no teor lipídico com aumento da disponibilidade da fonte de nitrogênio (KIM; BAE; LEE, 2016). Quando efluentes são utilizados na composição do meio para cultivo mixotrófico, o metabolismo celular é afetado também por outros fatores, como temperatura, intensidade de luz, etc. (FAROOQ et al., 2013). No trabalho realizado por Ansari et al. (2017b), por exemplo, o aumento da suplementação de meio contendo águas residuais de aquicultura com NaNO_3 de 200 até 1500 mg L^{-1} em processo batelada diminuiu o conteúdo lipídico das microalgas *Chlorella sorokiniana* e *Ankistrodesmus falcatus*, comportamento similar ao observado no presente trabalho. No trabalho realizado por Zhao et al. (2014), no entanto, o aumento da concentração de lixiviado proveniente de aterro sanitário no meio de cultivo da microalga *Chlorella pyrenoidosa* resultou em elevação no conteúdo lipídico das células para meios de cultivo com até 10% de lixiviado diluído em efluente municipal, reduzindo-se o conteúdo lipídico quando maiores concentrações de lixiviado foram empregadas.

Nota-se também, pela análise da Figura 5.6, que o metabolismo das microalgas foi direcionado ao acúmulo de carboidratos quando a maior concentração de lixiviado foi empregada no meio. Conforme mencionado na seção anterior, este maior acúmulo de carboidratos pode estar relacionado ao estresse causado pela maior quantidade de componentes tóxicos no meio de cultivo, mesmo considerando a maior disponibilidade de fontes de carbono.

Para a determinação dos açúcares que compõe a fração carboidrato das microalgas, a técnica de hidrólise empregada no protocolo de análise desempenha um papel significativo na digestão dos polissacarídeos em monossacarídeos e, consequentemente, na sua quantificação (ORTIZ-TENA et al., 2016). No presente trabalho, procedeu-se à hidrólise ácida (com H_2SO_4) em duas fases, sendo a primeira empregando H_2SO_4 72% (m/m) a 30 °C durante 1 h e a segunda empregando H_2SO_4 4% (m/m) a 121 °C durante 1h para favorecer a hidrólise completa da biomassa (MIRANDA; PASSARINHO; GOUVEIA, 2012; MOXLEY; ZHANG, 2007). Os resultados de composição em açúcares obtidos na biomassa seca são mostrados na Tabela 5.2. Os açúcares xilose, galactose e manose foram determinados em conjunto porque foram coeluídos na coluna Aminex HPX-87H do CLEA, conforme já previamente relatado por Cheng et al. (2011).

Analizando os dados da Tabela 5.2, verifica-se que a fração mássica do grupo xilose, galactose e manose foi maior em todos os casos, seguido, em sequencia, pela glicose e arabinose. Os açúcares presentes nas microalgas podem servir de reserva ou serem componentes de estruturas como a parede celular. No trabalho de Ortiz-tena et al. (2016), por exemplo, os autores relataram que, para a microalga *C. vulgaris*, os principais carboidratos estruturais identificados foram, em ordem decrescente de teor: galactose, ramnose, ácido glucurônico, xilose+arabinose e manose. De acordo com estes autores, os resultados por eles obtidos demonstram a complexidade da parede celular destes microrganismos. Evidentemente, a composição encontrada irá variar com a espécie microalgal, as condições de cultivo e a técnica de análise utilizada (HERNÁNDEZ et al., 2015).

Tabela 5.2 - Composição em açúcares no estado estacionário determinada após hidrólise ácida da biomassa microalgal cultivada em processo contínuo sob diferentes concentrações de lixiviado no meio no estado estacionário. Análise realizada por cromatografia líquida de alto desempenho no hidrolisado obtido (média± desvio padrão)

Concentração do lixiviado (% v/v)	Açúcares		
	Glicose	Xil+Gal+Man*	Arabinose
5	2,3 ± 0,1	3,7 ± 0,1	1,2 ± 0,4
7,5	2,0 ± 0,3	5,1 ± 0,4	1,1 ± 0,3
10	4,3 ± 0,1	6,8 ± 0,6	1,9 ± 0,3

* Determinação do conjunto xilose+galactose+manose.

Fonte: Do autor.

O aumento da concentração de lixiviado de 5% para 10% no meio de cultivo promoveu, em média, o acréscimo na concentração de glicose, xilose+manose+galactose e arabinose em 87%, 83,8% e 58,3%, respectivamente. Como mostrado, o maior aumento foi observado para a glicose, sendo o acúmulo de amido uma hipótese para explicação deste comportamento. De fato, sob dadas condições, microalgas podem acumular reserva na forma de amido (JOHN et al., 2011).

O conhecimento da composição da microalga em termos de açúcares é fundamental para aplicações em biorrefinarias. Os açúcares mencionados na Tabela 5.2, por exemplo, podem ser considerados para produção de etanol, sendo, entretanto, necessário utilizar microrganismos específicos para fermentação de cada um deles (DOAN et al., 2012; BALAT, 2011).

A Tabela 5.3 mostra a influência da concentração de lixiviado no meio na produtividade em lipídeos, carboidratos, proteínas e biomassa de *Chlorella minutissima* 26a cultivada no fotobiorreator airlift de tubos concêntricos em processo contínuo e em estado estacionário. Como pode ser observado, o acréscimo da concentração de lixiviado de 5% para 7,5% aumentou a produtividade em biomassa em 11,7%, atingindo o valor de $232,0 \pm 7,6 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ quando 7,5% de lixiviado foi utilizado. Já quando a concentração do lixiviado mudou de 7,5% para 10% (v/v), a produtividade em biomassa diminuiu para $223,7 \pm 13,7 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Cabe comentar que todos os valores de produtividade em biomassa obtidos no presente estudo foram superiores se comparados com o maior valor de ($131,7 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) obtido no cultivo da *Chlorella pyrenoidosa* com 10% de lixiviado diluído proveniente de aterro sanitário no trabalho realizado por Zhao et al. (2014). Os

valores obtidos no cultivo em lixiviado diluído foram também superiores aos obtidos no cultivo autotrófico em meio sintético, o qual resultou em produtividade máxima de 188,6 mg L⁻¹ d⁻¹, conforme discutido no capítulo 4.

Tabela 5.3 - Influência da concentração do lixiviado de aterro sanitário no meio de cultivo na produtividade em lipídeos, carboidratos, proteínas e biomassa de *Chlorella minutissima* 26a durante o cultivo contínuo em fotobiorreator *airlift* de tubos concêntrico no estado estacionário (média ± desvio padrão) com D = 0,009 h⁻¹

Concentração do lixiviado (% v/v)	Produtividade (mg L ⁻¹ d ⁻¹)			
	Biomassa	Lipídeo	Carboidrato	Proteína
5	207,9 ± 11,2	96,6 ± 7,8	19,3 ± 2,1	62,8 ± 3,5
7,5	232,0 ± 7,6	95,3 ± 5,2	20,7 ± 1,6	69,2 ± 3,0
10	223,7 ± 13,7	83,9 ± 3,2	33,4 ± 2,1	65,1 ± 2,5

Fonte: Do autor.

Pode-se observar também que a variação na concentração de lixiviado no meio de cultivo permite o direcionamento da composição da biomassa para obtenção de componentes de interesse, de acordo com a necessidade de um dado processo industrial (Tabela 5.3). A produtividade em lipídeos, por exemplo, diminuiu com o aumento da concentração de lixiviado no meio de 5 para 10% (v/v), com o valor máximo de 96,6 ± 7,8 mg L⁻¹ d⁻¹ obtido na menor concentração de lixiviado. A produtividade em carboidratos, por outro lado, apresentou comportamento oposto ao observado para os lipídeos, com valores crescentes quando a concentração do lixiviado aumentou de 5 para 10% (v/v) no meio. A produtividade em proteínas, por sua vez, variou pouco com a modificação na concentração de lixiviado no meio de cultivo, atingindo o valor mínimo de 62,8 ± 3,5 mg L⁻¹ d⁻¹ na concentração de 5% (v/v) de lixiviado e valor máximo de 69,2 ± 3,0 mg L⁻¹ d⁻¹ para a concentração de 7,5% (v/v).

O processo contínuo de cultivo da *Chlorella minutissima* 26a utilizando o fotobiorreator *airlift* de tubos concêntricos e lixiviado diluído como meio de cultivo indicou um grande potencial para a produção de biomassa, lipídeos, carboidratos e proteína. Esse sistema, além de possibilitar a produção de biocombustíveis, como o bioetanol e o biodiesel, derivados dos carboidratos e lipídeos, pode concomitantemente contribuir para a biorremediação do lixiviado proveniente de aterro sanitário (CHEAH et al., 2016), conforme discutido a seguir.

5.3.4 Efeito do cultivo da microalga *Chlorella minutissima* no tratamento de lixiviado diluído em fotobiorreator *airlift* em processo contínuo

O lixiviado de aterro sanitário apresenta uma composição complexa e que inclui diversos compostos tóxicos ao crescimento microbiano (GHOSH; THAKUR; KAUSHIK, 2017). Além disso, é um líquido turvo de cor marrom escuro que dificulta a passagem de luz e, sendo assim necessária sua diluição para redução de toxicidade e aumento da transparência para permitir o processo de fotossíntese realizado durante o crescimento microalgal.

O uso do lixiviado no cultivo das microalgas possibilita seu crescimento e favorece sua destoxificação, uma vez que estes microrganismos possuem capacidade de utilizar os nutrientes e compostos orgânicos presentes, principalmente os nitratos, fosfatos, metais e hidrocarbonetos (LIN et al., 2007). Assim, além da obtenção da biomassa microalgal de interesse, tem-se concomitantemente um processo de biorremediação.

A Tabela 5.4 mostra o efeito do cultivo da microalga *Chlorella minutissima* 26a na remoção de compostos orgânicos do meio avaliada por DQO e COT, além da remoção de $\text{NO}_3\text{-N}$. Em todos os ensaios observou-se redução no valor destes parâmetros, sendo a porcentagem de remoção de DQO maior no meio contendo 7,5% (v/v) de lixiviado diluído, com valor de 92,8%, enquanto que para o COT a maior remoção foi de 90,5% para esta mesma concentração de lixiviado no meio. Com relação à remoção de $\text{NO}_3\text{-N}$, esta foi menor no meio contendo 10,0% (v/v) de lixiviado (86,6% de remoção).

Os valores de remoção apresentados na Tabela 5.4 são comparáveis aos relatados em outros trabalhos da literatura nos quais microalgas foram cultivadas em diversos efluentes. Para exemplificar, cita-se o trabalho de Wang et al. (2010a), os quais estudaram o cultivo da microalga *Chlorella sp.* em quatro diferentes tipos de efluentes provenientes da planta de tratamento de efluente municipal de Saint Paul, Minnesota, Estados Unidos. Os autores relataram que em todos os ensaios houve remoção de componentes do meio durante o cultivo. Os maiores valores de remoção obtidos foram: para DQO - 83%; para P-PO_4 - 90,6%; para N-NH_3 - 82,4%; e para N-NO_3 - 62,5%.

Tabela 5.4 – Resultados de análise de DQO, COT e NO₃-N do meio contendo diferentes concentrações de lixiviado antes e após o cultivo contínuo de *Chlorella minutissima* 26a (dados obtidos da corrente de saída do reator em estado estacionário)

Lixiviado diluído (%)	DQO (mg O ₂ L ⁻¹)			COT (mg C L ⁻¹)			NO ₃ -N (mg L ⁻¹)		
	Antes	Após	Remoção (%)	Antes	Após	Remoção (%)	Antes	Após	Remoção (%)
5,0	158,7	40,7	74,4	77,4	30,1	61,1	88,9	0,0	100,0
7,5	238,1	17,2	92,8	116,6	11,7	90,5	131,1	0,2	99,8
10,0	317,4	63,7	79,9	154,8	25,6	83,5	174,9	23,5	86,6

Fonte: Do autor.

Segundo Becker (1994), as microalgas podem também ser usadas para remoção de metais em águas residuais, sendo este um método econômico e com alto potencial para redução na concentração de metais pesados. Esse processo resulta em um efluente de alta qualidade para ser reutilizado, com concomitante formação de biomassa valiosa. Além disso, diversos trabalhos foram relatados demonstrando a capacidade de microalgas de reduzir a concentração de metais em solução (SINGH et al., 2016b; SURESH KUMAR et al., 2015; RICHARDS; MULLINS, 2013).

A biorremediação de metais pela microalga ocorre em duas formas: (I) bioacumulação por células vivas, e (II) biosorção pela biomassa das células mortas. O primeiro (absorção bioacumulativa) constitui o princípio para os processos de destoxificação de resíduos, considerando que o rendimento de biosorção por células mortas é menor e, assim, esta técnica não vem sendo recomendada (SURESH KUMAR et al., 2015). O primeiro passo na bioacumulação dos íons metálicos pelas células vivas ocorre na parede celular das microalgas, sendo que diferentes grupos como OH⁻, SH⁻, COO⁻, PO₄³⁻, NO₃⁻, RNH₂⁻, RS⁻ e RO⁻ promovem a adsorção dos íons metálicos. Em seguida, os íons são transportados para dentro das células e, com o auxílio das proteínas citosólicas, armazenados nos vacúolos e organelas (KUMAR; PANDEY; GAUR, 2016). Os principais fatores que afetam a biosorção dos íons metálicos pela microalgas são a concentração dos íons e da biomassa, pH, temperatura, tempo de contato e presença de íons concorrentes (ZERAATKAR et al., 2016).

No presente trabalho, foi avaliada a capacidade de redução na concentração de diversos metais contidos no lixiviado proveniente de aterro sanitário pela microalga

Chlorella minutissima 26a durante o cultivo contínuo, sendo os valores obtidos apresentados na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 - Resultados de concentração de metais e remoção destes do meio contendo diferentes concentrações de lixiviado antes e após o cultivo contínuo de *Chlorella minutissima* 26a (dados obtidos da corrente de saída do reator em estado estacionário)

Concentração do lixiviado (% v/v)		Metais						
		Cr	Fe	K	Ca	Al	Ba	Na
5,0	Conc. (mg L ⁻¹)	0,270	23,270	116,000	6,862	1,194	0,744	34124,887
		0,099	14,481	115,453	0,000	0,000	0,499	7511,41
	Remoção (%)	63,3	37,8	0,50	100,0	100,0	32,9	78,0
7,5	Conc. (mg L ⁻¹)	0,405	34,905	174,000	10,293	1,791	1,116	41187,331
		0,198	17,751	121,182	0,000	0,000	0,397	7669,58
	Remoção (%)	51,1	49,1	30,4	100,0	100,0	64,4	85,0
10,0	Conc. (mg L ⁻¹)	0,539	46,539	232,001	13,723	2,387	1,488	48255,768
		0,299	13,092	197,985	0,470	0,000	0,499	8436,07
	Remoção (%)	44,5	71,9	14,7	96,6	100,0	66,5	70,1

Fonte: Do autor.

Analisando os dados da Tabela 5.5, pode-se verificar que os metais Cr, Fe, K, Ca, Al, Ba e Na tiveram redução da concentração em todos os ensaios. Particularmente, o Al foi totalmente removido em todos os ensaios, enquanto que o Ca foi totalmente removido nos ensaios com 5% e 7,5% de lixiviado no meio de cultivo. Pode-se verificar também que a remoção dos metais Fe e Ba aumentou com o acréscimo da concentração de lixiviado de 5 para 10% no meio de cultivo, atingindo valores de 71,9% e 66,5% para cada um destes metais, respectivamente. Já a remoção do Cr diminuiu com o aumento da concentração do lixiviado de 5% para 10% no meio de cultivo, sendo reduzida de 63,3% para 44,5%.

O comportamento de remoção de metais demonstrado na Tabela 5.5 pode ser comparado com outro trabalho na literatura. Richards e Mullins (2013), estudaram a produção de lipídeos combinado com a remoção de metais em meio contendo lixiviado diluído usando uma cultura mista de microalgas como *Pavlova lutheri*, *Tetraselmis chuii*, *Chaetoceros muelleri* e *Nanochloropsis gaditana*. Os metais e remoção obtidos foram: Al

– 37,1%, Fe – 95,5%, Mn – 28,8%, Ba – 49,1%, Ce – 100% e La – 100%. Esse estudo também indicou que o uso de microalgas como biorremediação de metais é um método viável para o tratamento de resíduos e produção de lipídeos.

5.4 Conclusão

Conclui-se que o uso de lixiviado diluído como meio de cultivo da microalga *Chlorella minutissima* 26a em fotobiorreator *airlift* é viável. O aumento da concentração de 5% até 10% de lixiviado no meio apresentou pouca influência sobre a concentração da biomassa obtida, resultando, no entanto, em menor número de células microalgais, porém com maior tamanho médio. Maior concentração de lixiviado no meio resultou também na diminuição do teor de lipídeos na biomassa e aumento no teor de carboidratos, não influenciando de forma apreciável o valor da proteína. A produtividade em biomassa e em seus constituintes foi dependente da concentração do lixiviado no meio de cultivo, sendo obtidos os seguintes valores: para biomassa - $232,0 \pm 7,6 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, empregando 7,5% (v/v) de lixiviado; para lipídeos - $96,6 \pm 7,8 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, empregando 5% (v/v) de lixiviado, para carboidratos - $33,4 \pm 2,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, empregando 10% (v/v) de lixiviado e; para proteínas - $69,2 \pm 3,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, empregando 7,5% (v/v) de lixiviado. A remoção máxima de DQO e COT foi de 92,8% e 90,5%, respectivamente, para o meio contendo 7,5% (v/v) de lixiviado, enquanto para o nitrato inorgânico foi de 100% no meio contendo 5% (v/v) de lixiviado. Já para os metais, a remoção total foi obtida para Al e Ca em todas as diluições, enquanto que para o Fe e Ba os valores foram 71,9% e 66,5% em meio contendo 10% de lixiviado, para o K e Na foram 30,4% e 85% de remoção em meio contendo 7,5% (v/v) de lixiviado e para o Cr a remoção foi de 63,3% em meio com 5% de lixiviado. O cultivo da microalga *Chlorella minutissima* 26a em fotobiorreator *airlift* usando lixiviado como componente do meio pode ser utilizado para obtenção de biomassa e biorremediação do meio, promovendo a redução na concentração de compostos orgânicos, nitrato e metais.

Referências

- ANSARI, F. A. et al. Microalgal cultivation using aquaculture wastewater: Integrated biomass generation and nutrient remediation. **Algal Research**, v. 21, p. 169–177, 2017.
- APHA. American Public Health Association. **Standard methods for the examination of water and wastewaters**, 18th edition, Washington DC, 1992.
- APHA/AWWA/WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21th ed. New York: WPCF, 2005.
- ARORA, N. et al. Synergistic dynamics of nitrogen and phosphorous influences lipid productivity in *Chlorella minutissima* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 79–87, 2015.
- ARUNBABU, V.; INDU, K. S.; RAMASAMY, E. V. Leachate pollution index as an effective tool in determining the phytotoxicity of municipal solid waste leachate. **Waste Management**, 2017.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 858–875, 2011.
- BECKER, E. W. **Microalgae: biotechnology and microbiology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1994.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae - a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557–577, 2010.
- BRITO, R. A. D. E. **Ozonização catalítica do chorume proveniente do aterro sanitário de Cachoeira Paulista - SP na presença de ferro em sistema contínuo**. 2014. 219f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia Química de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.
- CAO, J. et al. Significance evaluation of the effects of environmental factors on the lipid accumulation of *Chlorella minutissima* UTEX 2341 under low-nutrition heterotrophic condition. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 177–184, 2014.
- CHEAH, W. Y. et al. Cultivation in wastewaters for energy: a microalgae platform. **Applied Energy**, v. 179, p. 609–625, 2016.
- CHENG, Y. S. et al. The impact of cell wall carbohydrate composition on the chitosan flocculation of *Chlorella*. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 1927–1933, 2011.
- CHO, S. et al. Microalgae cultivation for bioenergy production using wastewaters from a municipal WWTP as nutritional sources. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 515–520, 2013.
- DOAN, Q. C. et al. Microalgal biomass for bioethanol fermentation: implications for hypersaline systems with an industrial focus. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 79–88, 2012.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

- EL-GOHARY, F. A.; KAMEL, G. Characterization and biological treatment of pre-treated landfill leachate. **Ecological Engineering**, v. 94, p. 268–274, 2016.
- FAROOQ, W. et al. Two-stage cultivation of two *Chlorella sp.* strains by simultaneous treatment of brewery wastewater and maximizing lipid productivity. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 230–238, 2013.
- FENG, P. et al. Lipid accumulation and growth characteristics of *Chlorella zofingiensis* under different nitrate and phosphate concentrations. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, n. 4, p. 405–410, 2012.
- FRANCESCHINI, I. M. et al. **Algas**: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica. Porto Alegre: Artmed, 2009. 332p.
- GHOSH, P.; THAKUR, I. S.; KAUSHIK, A. Bioassays for toxicological risk assessment of landfill leachate: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 141, n. January, p. 259–270, 2017.
- GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. L.; CHANLEY, M. H. (Eds.). Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. New York: Springer US, 1975. p. 29–60.
- GULDHE, A. et al. Prospects, recent advancements and challenges of different wastewater streams for microalgal cultivation. **Journal of Environmental Management**, v. 203, p. 299–315, 2017a.
- GULDHE, A. et al. Heterotrophic cultivation of microalgae using aquaculture wastewater: A biorefinery concept for biomass production and nutrient remediation. **Ecological Engineering**, v. 99, p. 47–53, 2017b.
- HEREDIA-ARROYO, T. et al. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 5, p. 2245–2253, 2011.
- HERNÁNDEZ, D. et al. Saccharification of carbohydrates in microalgal biomass by physical, chemical and enzymatic pre-treatments as a previous step for bioethanol production. **Chemical Engineering Journal**, v. 262, p. 939–945, 2015.
- HO, S. H. et al. Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 157–165, 2013a.
- HO, S. H. et al. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 191–198, 2013b.
- JOHN, R. P. et al. Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 186–193, 2011.
- KAYAALP, N. et al. A new approach for chemical oxygen demand (COD) measurement at high salinity and low organic matter samples. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 17, n. 9, p. 1547–1552, 2010.
- KIM, G.; BAE, J.; LEE, K. Nitrate repletion strategy for enhancing lipid production from marine microalga *Tetraselmis sp.* **Bioresource Technology**, v. 205, p. 274–279, 2016.
- KIRK, P. L. Kjeldahl method for total nitrogen. **Analytical Chemistry**, v. 22, n. 2, p. 354–358, 1950.

KUMAR, D.; PANDEY, L. K.; GAUR, J. P. Metal sorption by algal biomass: from batch to continuous system. **Algal Research**, v. 18, p. 95–109, 2016.

LIN, L. et al. Use of ammoniacal nitrogen tolerant microalgae in landfill leachate treatment. **Waste Management**, v. 27, n. 10, p. 1376–1382, 2007.

MANDENIUS, C.-F. et al. **Bioreactors: design, operation and novel applications**. London: Wiley-VCH, 2016. v. 31.

MARKOU, G.; ICONOMOU, D.; MUYLAERT, K. Applying raw poultry litter leachate for the cultivation of *Arthrospira platensis* and *Chlorella vulgaris*. **Algal Research**, v. 13, p. 79–84, 2016.

MERCHUK, J. C.; GLUZ, M. Bioreactors, air-lift reactors. In: Encyclopedia of Bioprocess Technology. Israel: John Wiley and Sons, 2002. p. 320–324.

MILLÁN-OROPEZA, A.; TORRES-BUSTILLOS, L. G.; FERNÁNDEZ-LINARES, L. Simultaneous effect of nitrate (NO_3^-) concentration, carbon dioxide (CO_2) supply and nitrogen limitation on biomass, lipids, carbohydrates and proteins accumulation in *Nannochloropsis oculata*. **Biofuel Research Journal**, v. 5, n. 1, p. 215–221, 2015.

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

MITRA, D.; VAN LEEUWEN, J. (HANS); LAMSAL, B. Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. **Algal Research**, v. 1, n. 1, p. 40–48, 2012.

MOXLEY, G.; ZHANG, Y.-H. P. More accurate determination of acid-labile carbohydrates in lignocellulose by modified quantitative saccharification. **Energy and Fuels**, v. 21, n. 6, p. 3684–3688, 2007.

NAVEEN, B. P. et al. Physico-chemical and biological characterization of urban municipal landfill leachate. **Environmental Pollution**, v. 220, p. 1–12, 2016.

OLIVIERI, G.; SALATINO, P.; MARZOCHELLA, A. Advances in photobioreactors for intensive microalgal production: Configurations, operating strategies and applications. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 89, n. 2, p. 178–195, 2014.

ORTIZ-TENA, J. G. et al. Revealing the diversity of algal monosaccharides: Fast carbohydrate fingerprinting of microalgae using crude biomass and showcasing sugar distribution in *Chlorella vulgaris* by biomass fractionation. **Algal Research**, v. 17, p. 227–235, 2016.

PENG, Y. Perspectives on technology for landfill leachate treatment. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S2567–S2574, 2017.

QIN, L. et al. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in dairy wastewater pretreated by UV irradiation and sodium hypochlorite. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 2, p. 1121–1130, 2014.

RASBAND, W. **IMAGE J**, 2017. Disponível em: <<http://rsb.info.nih.gov/ij/>>. Acesso em 02/set/2017>.

REIS, C. E. R. **Construção de um biorreator tubular para crescimento da microalga *Chlorella sp.* em meio de lixiviado**. 2014. 49 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Química) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

- RICHARDS, R. G.; MULLINS, B. J. Using microalgae for combined lipid production and heavy metal removal from leachate. **Ecological Modelling**, v. 249, p. 59–67, 2013.
- SINGH, P. et al. Combined metals and EDTA control: an integrated and scalable lipid enhancement strategy to alleviate biomass constraints in microalgae under nitrogen limited conditions. **Energy Conversion and Management**, v. 114, p. 100–109, 2016.
- SURESH KUMAR, K. et al. Microalgae: a promising tool for heavy metal remediation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 113, p. 329–352, 2015.
- TAM, N. F. Y.; WONG, Y. S. Wastewater nutrient removal by *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus sp.* **Environmental Pollution**, v. 58, n. 1, p. 19–34, 1989.
- WANG, L. et al. Cultivation of green algae *Chlorella sp.* in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 4, p. 1174–1186, 2010.
- WYCHEN, S. VAN; LAURENS, L. M. L. **Determination of total solids and ash in algal biomass: laboratory analytical procedure (LAP)**. Denver: NREL, 2013. 7 p. Technical report, NREL/TP-5100-60956.
- ZERAATKAR, A. K. et al. Potential use of algae for heavy metal bioremediation, a critical review. **Journal of Environmental Management**, v. 181, p. 817–831, 2016.
- ZHAO, X. et al. Characterization of microalgae-bacteria consortium cultured in landfill leachate for carbon fixation and lipid production. **Bioresource Technology**, v. 156, p. 322–328, 2014.

6 CONCLUSÕES GERAIS E RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

6.1 Conclusões gerais

De um modo geral, o perfil de crescimento, a composição química e a produtividade da biomassa e dos metabólitos gerado como lipídeos, carboidratos e proteína da microalga *Chlorella minutissima* 26a foi influenciado com o acréscimo da concentração de nitrato no meio de cultivo em fotobiorreator *airlift* com processo contínuo ou de tanque de bolhas em batelada. Na maior concentração, 150,0 g L⁻¹, de nitrato de sódio no meio de cultivo em fotobiorreator de tanque de bolhas a produtividade máxima obtida em biomassa, lipídeos e carboidratos foram 262,0 ± 4,3, 105,2 ± 1,7 e 36,7 ± 0,6 mg L⁻¹ d⁻¹, respectivamente, com taxa específica de crescimento de 0,320 d⁻¹. No cultivo utilizando o fotobiorreator *airlift* de tubos concêntricos, a produtividade máxima em biomassa, lipídeos, carboidratos e proteínas foram 188,6 ± 11,2, 92,8 ± 5,5, 37,7 ± 2,2 e 29,1 ± 1,7 mg L⁻¹ d⁻¹, respectivamente, em meio contendo a maior concentração (225 mg L⁻¹) de nitrato de sódio.

A variação da concentração de nitrato no meio de cultivo também influenciou o teor dos lipídeos, carboidratos, proteína e cinzas da biomassa da *Chlorella minutissima* 26a cultivada em fotobiorreator *airlift* ou de tanque de bolhas. No fotobiorreator de tanque de bolhas em processo batelada, o aumento da concentração de nitrato no meio de cultivo de 37,5 até 150,0 mg L⁻¹, acrescentou o teor de lipídeos e carboidratos de 24,1 à 42,5% e 9,7 à 25,8%, respectivamente. Enquanto que em cultivo contínuo usando fotobiorreator *airlift* o aumento da concentração de nitrato entre 75 mg L⁻¹ até 225 mg L⁻¹ não influenciou o teor de lipídeos, apresentando valores médios de 46,5%, mesmo comportamento para a proteína o qual foi em média 22,2%. Já para o carboidrato o teor diminuiu de 22,2% para 15,7% e, para cinzas houve um leve aumento de 8,7% para 9,8%.

A utilização do lixiviado diluído proveniente de aterro sanitário como meio de cultivo da *Chlorella minutissima* 26a mostrou-se aplicável apresentando grande potencial de uso como nutriente para o crescimento da microalga. A variação da diluição do lixiviado no meio de cultivo afetou o teor produtividade da biomassa e dos componentes como carboidratos, lipídeos e proteínas. O aumento da concentração de 5 até 10% (v/v) de lixiviado no meio de cultivo em fotobiorreator *airlift* em processo contínuo diminuiu a

produtividade de lipídeo de $96,6 \pm 7,8 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para $83,9 \pm 3,2 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e aumentou o de carboidrato de $19,3 \pm 2,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para $33,4 \pm 2,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. A maior produtividade da biomassa ($232,0 \pm 7,6 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) e proteína ($69,2 \pm 3,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) foi obtida em meio contendo 7,5 % (v/v) de lixiviado diluído.

A utilização do lixiviado diluído como meio de cultivo de microalga também pode ser analisado do ponto de vista da biorremediação de compostos orgânicos, inorgânicos e metais durante o crescimento da microalga. As análises de DQO, COT e de metais antes e após o cultivo em processo contínuo demonstraram altas reduções no meio promovendo a biorremediação.

O uso do fotobiorreator *airlift* de tubos concêntricos como sistema de cultivo e biorremediação de microalga em meio sintético ou contendo lixiviado diluído mostrou-se apropriado com alta capacidade de produtividade de biomassa e dos componentes como lipídeos e carboidratos essenciais para a produção de biocombustíveis como biodiesel e bioetanol.

6.2 Recomendações para trabalhos futuros

- Utilizar um fotobiorreator de tanque de bolhas em série na saída do fotobiorreator *airlift* para empregar o tempo de residência hidráulica desse biorreator no processo de “starvation”. Pois deixar a biomassa produzida por um tempo sem a presença de nitrogênio reduzirá o conteúdo de proteína e aumentará os de lipídeos e carboidratos, que consequente potencializará a produtividade desses compostos aumentando a capacidade de produção de biodiesel e bioetanol.
- Aplicar um planejamento de experimento para avaliar a influência dos fatores como concentração e fonte de nitrogênio, taxa específica de crescimento e concentração do lixiviado no meio de cultivo.
- Aplicar o conceito de reciclo no sistema contínuo do fotobiorreator *airlift* visando o aumento da taxa de alimentação e consequentemente na produtividade de lipídeos, carboidratos e biomassa.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Curva de calibração pré-determinada da relação de absorbância com a concentração de açúcares totais da metodologia Fenol Sulfúrico

APÊNDICE B – Curva da regressão linear de $\ln(\text{biomassa seca})$ em função do tempo na fase exponencial de crescimento da *Chlorella minutissima* 26a em fotobiorreator airlift cultivado em meio sintético

APÊNDICE C – Curva da regressão linear de $\ln(\text{Absorbância})$ em função do tempo na fase exponencial de crescimento da *Chlorella minutissima* 26a em fotobiorreator *airlift* cultivado em meio contendo lixiviado diluído