PRISCILA DA COSTA CARVALHO DE JESUS

Uso de microalgas tolerantes a altas concentrações de CO_2 na conversão de CO_2 em bioprodutos de alto valor agregado

São Paulo

2020

PRISCILA DA COSTA CARVALHO DE JESUS

Uso de microalgas tolerantes a altas concentrações de CO_2 na conversão de CO_2 em bioprodutos de alto valor agregado

Versão Corrigida

Tese apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2020

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.

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, _____ de _____ de _____

Assinatura do autor: _____

Assinatura do orientador: _____

Catalogação-na-publicação

Jesus, Priscila
Uso de microalgas tolerantes a altas concentrações de CO2 na conversão de CO2 em bioprodutos de alto valor agregado / P. Jesus -- versão corr. -- São Paulo, 2020.
200 p.

Tese (Doutorado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1.microalgas 2.fotobiorreatores 3.carotenoides 4.ácidos graxos I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II.t.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Priscila da Costa Carvalho de Jesus
Título do trabalho: Uso de microalgas tolerantes a altas concentrações de CO_2 na conversão de CO_2 em bioprodutos de alto valor agregado

Tese apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Claudio Augusto Oller do Nascimento

Coorientador: Prof. Dr. Thiago Olitta Basso

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Ao meu avô Benedito Ernesto,

terceira geração de engenheiros da família

e grande incentivador das gerações seguintes

Agradecimentos

Aos meus avós, maternos e paternos, pela sabedoria e legado que contribuíram para a minha formação.

Aos meus pais, Silvana e José Ernesto, pela vida toda de incentivo e por proporcionarem todo o suporte e carinho para que eu pudesse morar em São Paulo e estudar com conforto.

Ao meu irmão e parceiro de moradia, Pedro Henrique, à minha família em São Paulo e ao Fabiano, pelo apoio durante esses anos morando em São Paulo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Claudio Augusto Oller do Nascimento, por confiar a mim esse projeto desafiador, e pela supervisão e suporte, principalmente nas tomadas de decisão.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Thiago Olitta Basso, pelo apoio, principalmente em conferências e revisão de textos, e por confiar a mim a supervisão do trabalho de estágio da aluna Anne Peñaranda.

À Profa. Dra. Elen Aquino Perpétuo, coordenadora dos Projetos 17 (no qual este trabalho está inserido) e 18 do RCGI, pelo auxílio e acompanhamento do projeto; e à Profa. Dra. Rita Maria de Brito Alves, coordenadora do programa de Físico-Química do RCGI, por todo auxílio.

Ao RCGI, pelo suporte financeiro e organização dos workshops anuais, e aos seus membros, pelo empenho e transferência de conhecimentos. Particularmente, aos pesquisadores Letícia Cardoso e Dra. Sara Malvar, pela parceria em alguns experimentos; Dra. Louise Gracioso, pelas análises de biologia molecular para identificação das microalgas; e Dr. Bruno Karolski, pela coleta das amostras e auxílio durante as fases iniciais do trabalho.

À Dra. Maria Anita Mendes, do Dempster Lab, pelo suporte no desenvolvimento de metodologias para a caracterização dos lipídeos e carotenoides, principalmente nos equipamentos GC-MS, LC-MS e MALDI-TOF; e Dra. Meriellen Dias, pelo auxílio na utilização de alguns dos equipamentos.

À Dra. Franciele Fossaluza, pela amizade, apoio, auxílio na implementação de metodologias e discussão de experimentos.

Ao Dr. Paulo Firmino Moreira Júnior, por solucionar diversos problemas, como construção e soldagem para a fabricação das placas de LED para iluminação da incubadora e dos painéis de LED em torno dos reatores, e à implementação do sistema de aeração dos reatores utilizando o controlador de fluxo mássico.

Ao Rodrigo Ramos, pelo auxílio no uso de diversos equipamentos, principalmente o espectrômetro de fluorescência, na montagem dos frascos para os ensaios em frascos agitados, e assuntos cotidianos do laboratório.

Ao Dr. Enrique Rozas, pelo suporte na concepção dos sistemas de iluminação, auxílio na purificação dos extratos de carotenoides em coluna de sílica e em diversas etapas do trabalho.

À Dra. Lidiane Maria de Andrade, pela disponibilidade e paciência em repassar seus conhecimentos sobre o cultivo de microalgas; e à Dra. Fabíola Aliaga de Lima, pelo auxílio durante o processo de isolamento das microalgas.

À Dra. Flávia Saldanha-Corrêa, do Instituto Oceanográfico da USP, pela atenção, disponibilidade e auxílio durante o processo de isolamento das microalgas.

Aos pesquisadores Dr. Bruno Labate e Dielle Procópio, pela disponibilidade e auxílio nos ensaios em biorreatores; e à Laís Giraldi, também pelo auxílio no início dos ensaios em fotobiorreatores e na etapa de extração de DNA para identificação das microalgas, parte realizada no laboratório da Dra. Flávia Winck, do Instituto de Química da USP.

Ao Prof. Dr. Aldo Tonso, pela supervisão do meu estágio PAE na disciplina de Engenharia Bioquímica, à utilização do controlador de fluxo mássico nos experimentos em frascos agitados e suporte de algumas peças dos biorreatores.

À aluna de Iniciação Científica, Mariana Lenzi, cujo trabalho supervisionei durante aproximadamente um ano e que colaborou, principalmente, no desenvolvimento das metodologias de extração de lipídeos e análise da composição de ácidos graxos.

Ao Leonardo Diniz, do grupo AdOx – *Research in Advanced Oxidation Processes*, pela disponibilidade e auxílio nos ensaios de actinometria e interpretação dos resultados.

Aos amigos e pesquisadores Caroline Satye e Rafael David, por diversas contribuições, grande apoio e discussões durante o período do doutorado. À amiga e pesquisadora Dra. Bianca Maniglia, que me acompanhou na USP de Ribeirão Preto e também na de São Paulo. Aos amigos e pesquisadores, ainda não citados: Silas, Helena, Thamiris, Gabriel, Kevy, Thaís, Thiago, Ana e Isabella pelas contribuições em discussões e no cotidiano do laboratório.

Aos amigos e colegas dos grupos de pesquisa no Bloco Semi-Industrial.

Á minha família e amigos de Campinas, São Paulo, Ribeirão Preto, Rio de Janeiro, e de outros lugares do mundo, que, de alguma forma, me incentivaram durante esses anos.

Aos amigos do CORALUSP, dos grupos Feminino e Todo Canto, regidos pela maestrina Paula Christina Monteiro, pelos encontros valiosos e apresentações.

À Universidade de São Paulo e à Escola Politécnica, principalmente aos membros da secretaria de pós-graduação do Departamento de Engenharia Química, e ao Prof. Dr. Galo Le Roux, por todo auxílio durante o doutorado.

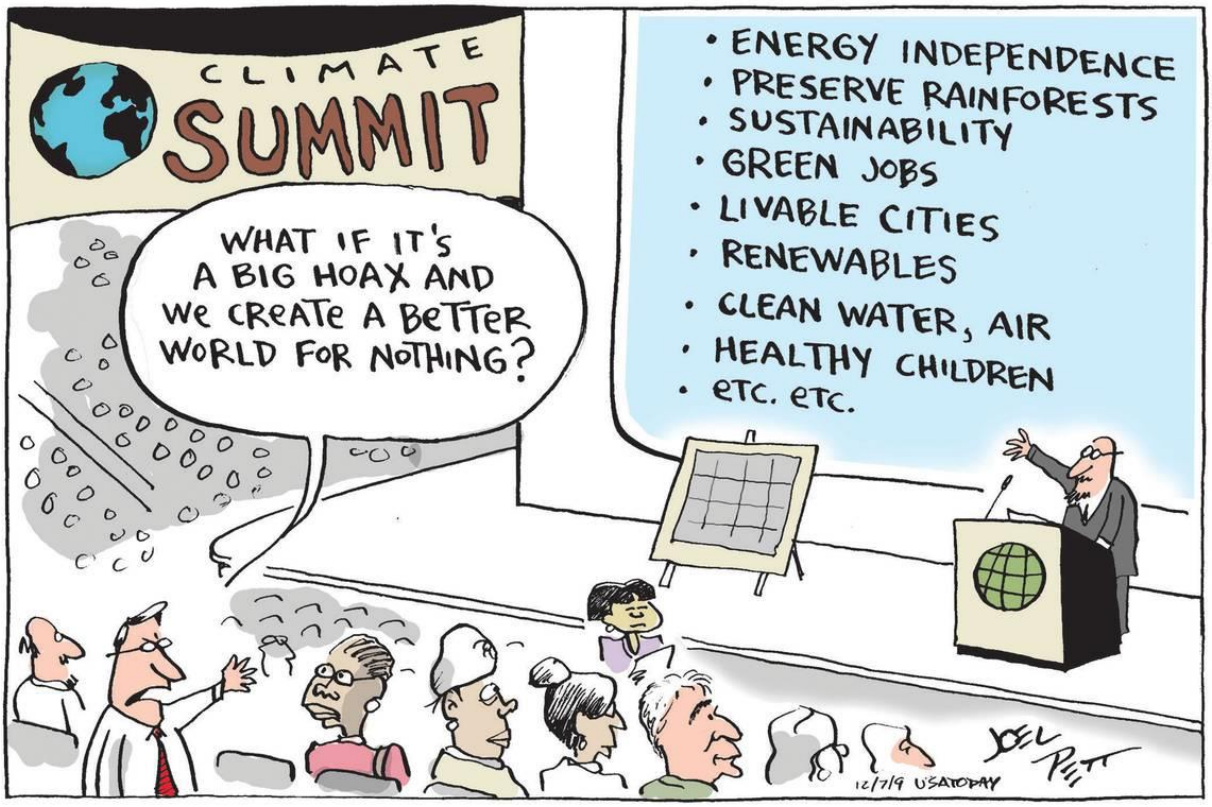
À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado e pelo suporte financeiro.

"Nós somos a primeira geração a sentir os efeitos das mudanças climáticas e a última que pode fazer algo sobre isso"

Barack Obama, ex-presidente dos Estados Unidos, durante a reunião da COP21 em Paris, em 2015

"Não pode existir Plano B porque não existe Planeta B"

Ban Ki-moon, oitavo secretário-geral da ONU



A cúpula do clima: - Independência energética; - Preservar as florestas tropicais; - Sustentabilidade; - Trabalhos "verdes"; - Cidades habitáveis; - Renováveis; - Água e ar limpos; - Crianças saudáveis; - etc, etc.
E se tudo isso for um grande engano e nós criarmos um mundo melhor pra nada?

Joel Pett

RESUMO

JESUS, Priscila da Costa Carvalho. **Uso de microalgas tolerantes a altas concentrações de CO_2 na conversão de CO_2 em bioprodutos de alto valor agregado**. 2020. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A fixação de CO_2 utilizando microrganismos fototróficos de rápido crescimento fornece uma alternativa promissora para a mitigação das mudanças climáticas. Além disso, ela é potencialmente rentável quando associada à produção de bioprodutos de alto valor, como ácidos graxos e carotenoides, considerando a crescente demanda do mercado por produtos naturais. Durante o cultivo de microalgas, o enriquecimento com CO_2 é um dos requisitos para alcançar altas produtividades, porém altos níveis desse gás são normalmente estressantes para as células, podendo inibir o crescimento. Apesar disso, o estresse celular é estratégia para induzir a produção de lipídeos intracelulares e carotenoides. O objetivo deste trabalho foi a bioprospecção de microalgas tolerantes a CO_2 e a avaliação das cinéticas de crescimento, parâmetros fisiológicos e produção de bioprodutos em cultivos sob concentrações de CO_2 até 30%, como potencial estratégia para induzir a formação desses bioprodutos. Amostras de água e sedimentos coletadas em mangues foram enriquecidas em meio de cultura sob temperatura e luminosidade controladas e atmosfera de 30% de CO_2, obtendo-se consórcios de microalgas, a partir dos quais quatro espécies diferentes foram isoladas, três delas identificadas como *Parachlorella kessleri*, *Scenedesmus* sp. e *Chlorella vulgaris*. Os ensaios cinéticos em frascos agitados sob diferentes concentrações de CO_2 (0,04, 5, 15 e 30%) mostraram que, de forma geral, a suplementação com CO_2 (de 5 a 15 %) foi necessária para aumentar o crescimento. Dentre as cepas, *P. kessleri* e *Scenedesmus* sp. apresentaram os melhores resultados de crescimento e produção de biomassa (aproximadamente 1 g L^{-1}) e foram avaliadas em ensaios em fotobiorreatores. Particularmente, *P. kessleri* produziu um pigmento extracelular avermelhado ao final do cultivo (14º dia) quando a suprimento de CO_2 foi interrompido no 10º dia, uma condição de estresse imperativa para as células liberarem o pigmento, a qual foi reprodutível em fotobiorreator. O pigmento apresentou atividade antioxidante e características de carotenoides confirmadas pelos espectros de UV-Vis e perfis de fragmentação em espectrômetro de massas. Ainda, foi proposto um método de purificação em HPLC semi-preparativo, no qual duas frações (amarela e vermelha) foram separadas.

As concentrações de carotenoides totais ao final dos cultivos de *P. kessleri* em fotobiorreatores foram significativamente diferentes ($p<0,01$) entre as condições de CO_2 (5, 15 e 30%), com o maior valor de 0,030 µg mL^{-1} obtido sob 5% de CO_2. Já as cinéticas de crescimento foram semelhantes em todas as condições de CO_2 avaliadas ($p>0,05$), com os maiores valores de μ_{max}, concentração de biomassa, teor lipídico e taxa de fixação de CO_2 de 0,77 dia^{-1}, 1,24 g L^{-1}, 241 mg g^{-1} (massa seca) e 165 mg L^{-1} d^{-1}, respectivamente. Os perfis de ácidos graxos na biomassa variaram em resposta às condições de CO_2. Em geral, maiores concentrações de CO_2 (15 e 30%) favoreceram a produção de ácidos graxos saturados e mono-insaturados enquanto diminuíram drasticamente a produção dos poli-insaturados.

Palavras-chave: microalgas, fotobiorreatores, ácidos graxos, carotenoides.

ABSTRACT

JESUS, Priscila da Costa Carvalho. **Use of CO_2-tolerant microalgae in the conversion of CO_2 to high value bioproducts**. 2020. Thesis (Ph.D. in Science, Chemical Engineering) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Carbon dioxide fixation using fast-growing photoautotrophic microorganisms provides a very promising alternative for climate change mitigation. Besides, it is potentially cost-effective when associated to the production of high value bioproducts, such as fatty acids and carotenoids, considering the growing demand for natural products. During microalgae cultivation, CO_2 enrichment is a requirement to reach high productivities, although high CO_2 levels are normally stressful to the cells, which can lower their growth. On the other hand, cellular stress is strategy to induce the production of intracellular lipids and carotenoids. The aim of this work was the bioprospection of CO_2-tolerant microalgae and evaluation of their growth kinetics, physiological parameters and bioproducts production in cultivations under CO_2 concentrations up to 30%, as a potential strategy to induce bioproducts formation. Water and sediment samples collected from mangroves were enriched in culture medium under controlled temperature, luminosity and atmosphere of 30% CO_2, obtaining microalgae consortia, from which four different species were isolated, three of them identified as *Parachlorella kessleri*, *Scenedesmus* sp. and *Chlorella vulgaris*. The kinetic assays under different CO_2 concentrations (0.04, 5, 15 and 30%) conducted in shake flasks showed that CO_2 supplementation (from 5 to 15%) were, in general, necessary to increase the growth of the evaluated microalgae. Among the isolates, *P. kessleri* and *Scenedesmus* sp. presented the highest growth rates and biomass productions (approximately 1 g L^{-1}), so they were evaluated in photobioreactor assays. Particularly, *P. kessleri* produced an extracellular reddish pigment in the end of the cultivation (14th day) when CO_2 supply was interrupted in the 10th day, a stressful and imperative condition for the cells to release the pigment, which was reproducible in photobioreactors. The pigment presented antioxidant activity and characteristics of carotenoids confirmed by UV-Vis spectra and mass spectrometry fragmentation profiles. A purification method was also proposed using a semi-preparative HPLC, in which two fractions (yellow and red) were separated. Total carotenoid concentrations by the end of *P. kessleri* cultivations in photobioreactors were significantly different ($p<0.01$) among the CO_2 conditions, with the highest value of 0.030 µg mL^{-1} obtained under 5% CO_2. In contrast, growth kinetics were similar ($p>0.05$) under all tested conditions, with the highest values of μ_{max}, biomass concentration, lipid content and CO_2 fixation rate of 0.77 day^{-1}, 1.24 g L^{-1}, 241 mg g^{-1} (d.w) and 165 mg L^{-1} d^{-1}, respectively. The fatty acid profiles in the biomass varied in response to CO_2 levels in the cultivations. In general, higher CO_2 concentrations (15 and 30%) favored the production of saturated and mono-unsaturated fatty acids, while drastically decreased the production of the poly-unsaturated.

Keywords: microalgae, photobioreactors, fatty acids, carotenoids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Exemplos de edifícios com cultivo de microalgas como fonte de energia: a) prédio BIQ, Hamburgo, Alemanha; b) Process zero, Los Angeles, EUA; c) Green Loop Tower, Chicago, EUA .. 25
Figura.1.2 Fluxograma das principais rotas de conversão química e biológica para utilização do gás natural estudadas nos projetos do programa de Físico-Química do RCGI, com destaque para o trabalho em questão 26
Figura 1.3 Fluxograma representativo das principais etapas do trabalho 29
Figura 2.1 Principais reações do ciclo de Calvin 35
Figura 2.2 Vias metabólicas simplificadas para a biossíntese de ácidos graxos em microalgas..... 38
Figura 2.3 Hipótese simplificada para a biossíntese de TAG na alga verde *C. reinhardtii*. 39
Figura 2.4 Principais vias metabólicas de microalgas relacionadas à formação de reservas de carbono 40
Figura 2.5 Esquema simplificado das vias de biossíntese de pigmentos em microalgas e cianobactérias 43
Figura 2.6 Principais produtos produzidos a partir da biomassa microalgal..... 44
Figura 2.7 Reator piloto tipo lagoa aberta com capacidade de 1.000 L para cultivo de *Chlorella vulgaris*..... 50
Figura 2.8 Fotobiorreatores para cultivo de microalgas: a) lagoa aberta; b) tubular horizontal; c) painel; d) tanque agitado; e) coluna de bolhas; f) *airlift* com loop interno; g) *airlift* com loop interno concêntrico; h) *airlift* com loop externo..... 51
Figura.3.1 Imagem de satélite dos locais de amostragem próximos às costas de Santos e Guarujá 56
Figura 3.2 Esquema de pré-seleção de consórcios de microalgas sob atmosfera a 30% de CO_2..... 58
Figura 3.3 Esquema do experimento de crescimento de microalgas em placa de 24 poços com diferentes porcentagens de inóculo na presença de antibiótico e/ou antifúngico..... 60
Figura 4.1 Esquema representativo da incubadora Infors HT, evidenciando as posições..... 73
Figura 4.2 Frascos inoculados com a microalga *Scenedesmus* sp. para avaliar o efeito da intensidade luminosa na incubadora rotacional Infors HT..... 73
Figura 4.3 Sistema experimental dos ensaios cinéticos a diferentes concentrações de CO_2..... 74
Figura 4.4 Esquema ilustrativo do abastecimento da atmosfera no interior do frasco com mistura de ar e CO_2 nas devidas proporções (tamanhos não correspondentes com os reais) 75
Figura 4.5 Fotos da biomassa de microalgas com metanol e clorofórmio (2/1 v/v) para extração dos lipídeos (a) e após adição de água e posterior centrifugação, separando as fases aquosa e orgânica (verde) (b)..... 76
Figura 4.6 Esquema das etapas de extração dos lipídeos de microalgas e reação de transesterificação para análise dos ácidos graxos correspondentes..... 77
Figura 4.7 Cinéticas de crescimento de *Scenedesmus* sp. nas diferentes posições (de 1 a 8) da incubadoradora, com diferentes intensidades luminosas..... 79
Figura 4.8 Comparação entre as medidas de absorbância (DO_{680nm}) e massa seca (X (g L^{-1})) referentes às cinéticas de crescimento de microalgas cultivadas sob 30% de CO_2: a) *P. kessleri*, b) *C. vulgaris* e c) *Scenedesmus* sp. 80
Figura 4.9 Cinéticas de crescimento das microalgas *P.kessleri*, *C. vulgaris* e *Scenedesmus* sp. sob 0,04% (a), 5% (b), 15% (c) e 30% de CO_2 (d) 81
Figura 4.10 Cinéticas de crescimento das microalgas *P. kessleri* (a), *C. vulgaris* (b) e *Scenedesmus* sp.(c) cultivadas sob 0,04, 5, 15 e 30% de CO_2 84
Figura 4.11 Comparação entre as velocidades específicas máximas das microalgas *P. kessleri*, *C. vulgaris* e *Scenedesmus* sp. cultivadas sob 0,04, 5, 15 e 30% de CO_2 86

Figura 4.12 Comparação entre as concentrações máximas de biomassa das microalgas *P. kessleri*, *C. vulgaris* e *Scenedesmus* sp., cultivadas sob 0,04, 5, 15 e 30% de CO_2, após 14 dias de cultivo..... 86
Figura 4.13 Cromatograma de separação de ácidos graxos por GC-MS de *C. vulgaris* cultivada sob 30% de CO_2..... 90
Figura 4.14 Porcentagens relativas de SFA nas microalgas *P. kessleri*, *C.vulgaris* e *Scenedesmus* sp. cultivadas sob 0,04, 15 e 30% CO_2 92
Figura 5.1 Interior da dorna do reator com as lâmpadas LED acesas 97
Figura 5.2 Desenho esquemático do biorreator utilizado nos experimentos..... 97
Figura 5.3 Desenho esquemático das configurações de operação dos biorreatores para cultivo de microalgas: a) aeração contínua e b) aeração intermitente..... 100
Figura 5.4 Biorreatores utilizados nos experimentos: a) sem painel luminoso e b) com painel luminoso ao redor da dorna e coberto com folha de PVA preta para não dissipar a luz..... 101
Figura 5.5 Imagem de uma amostra coletada ao final do cultivo de *P. kessleri*, após separação das células por centrifugação, mostrando o sobrenadante avermelhado produzido 102
Figura 5.6 Curvas de emissão de fótons por tempo referentes ao Reator A (a) e ao Reator B (b)..... 107
Figura 5.7 Perfis de oxigênio dissolvido e pH durante o cultivo de *Scenedesmus* sp. em fotobiorreator sob aeração contínua a 5% CO_2 (a) e sob aeração intermitente a 5% CO_2 (b)..... 109
Figura 5.8 Cinéticas de crescimento de *Scenedesmus* sp. em fotobiorreator sob aeração contínua e intermitente a 5% CO_2 (a) e teor de clorofila-a ao longo dos cultivos (b) 112
Figura 5.9 Composição relativa dos principais ácidos graxos detectados em diferentes fases de crescimento (dias 0, 5 e 10 - D0, D5 e D10) de *Scenedesmus* sp. sob 5% de CO_2 em sistema de aeração contínua 114
Figura 5.10 Cinéticas de crescimento de *P. kessleri* em fotobiorreator sob aeração intermitente a 5, 15 e 30% CO_2. As barras de erro são os desvios padrões de 4 repetições 115
Figura 5.11 Perfis de oxigênio dissolvido durante os cultivos de *P. kessleri* em fotobiorreator sob aeração intermitente a 5% CO_2 (a), 15% CO_2 (b) e 30% CO_2 (c)..... 117
Figura 5.12 Perfis de pH durante os cultivos de *P. kessleri* em fotobiorreator sob aeração intermitente a 5% CO_2 (a), 15% CO_2 (b) e 30% CO_2 (c) 119
Figura 5.13 Perfis de emissão de fluorescência de clorofila-a durante os dias cultivo de *P. kessleri* em fotobiorreator sob aeração intermitente a 5% CO_2 (a), 15% CO_2 (b) e 30% CO_2 (c) 121
Figura 5.14 Perfis de intensidade máxima normalizada de emissão de fluorescência durante o cultivo de *P. kessleri* nos fotobiorreatores sob aeração intermitente a 5, 15 e 30% CO_2..... 122
Figura 5.15 Perfis de clorofila-a durante o cultivo de *P. kessleri* em fotobiorreator sob aeração intermitente a 5, 15 e 30% CO_2..... 123
Figura 5.16 Comparação entre parâmetros fisiológicos dos cultivos de *P. kessleri* em fotobiorreator sob aeração intermitente a 5, 15 e 30% CO_2: velocidade específica de crescimento (μ_{max}) (a), concentração celular máxima em massa seca (b), teor de lipídeos totais (c) e taxa de fixação de CO_2 (d) 124
Figura 5.17 Concentração de carotenoides totais ao final dos cultivos de *P. kessleri* sob diferentes concentrações de CO_2..... 131
Figura 5.18 Composição dos principais ácidos graxos em diferentes dias durante o cultivo de *P. kessleri* sob 5% (a), 15% (b) e 30% de CO_2 (c) 135
Figura 5.19 Porcentagens relativas de ácidos graxos saturados, insaturados, com 16C e com 18C em diferentes dias de cultivo de *P. kessleri* sob 5, 15 e 30% de CO_2: a) Dia 3; b) Dia 12 (15 e 30% CO_2) e Dia 14 (5% CO_2) 138
Figura 6.1 Estrutura química dos principais carotenoides reportados em microalgas 140

Figura 6.2 Sequência de etapas de purificação do produto e caracterização das frações de carotenoides 142
Figura 6.3 Etapas de pré-purificação dos pigmentos em coluna empacotada de sílica C18 e eluição com solventes orgânicos..... 144
Figura 6.4 Foto do tubo de ensaio contendo o extrato metanólico após extração com clorofórmio e água e separação das fases 145
Figura 6.5 Espectros de absorção na região do UV-Vis dos extratos metanólicos. a) Reator A e b) Reator B 149
Figura 6.6 Curva padrão de Trolox do ensaio da atividade antioxidante 151
Figura 6.7 Espectros de massas da fragmentação TOF/TOF dos extratos metanólicos referentes aos cultivos sob 5 e 15% de CO_2 e comparação com o padrão de astaxantina..... 153
Figura 6.8 Cromatograma da amostra R6B em HPLC analítico com detector PDA e espectros de absorção na região do UV-Vis referentes aos picos que apresentaram absorção na região do visível, com as respectivas imagens das frações coletadas após serem concentradas 154
Figura 6.9 Cálculo de III/II (%) como indicativo de estrutura fina espectral..... 155
Figura 6.10 Cromatograma com detector PDA (a), espectro de massas ESI (b) e espectros de massas MS/MS (c) do pigmento amarelo..... 156
Figura 6.11 Cromatograma com detector PDA (a), espectro de massas ESI (b) e espectros de massas MS/MS (c) do pigmento vermelho..... 157

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Composições de diferentes microalgas com base na massa seca 33
Tabela 2.2 Teor de lipídeos de algumas espécies de microalgas reportadas na literatura..... 34
Tabela 3.1 Composição do meio de cultura sintético WC 57
Tabela 3.2 Nomenclatura das amostras coletadas para crescimento de microalgas..... 57
Tabela 3.3 Concentração de DNA extraído, A_{260} e A_{260}/A_{280} das microalgas isoladas 66
Tabela 3.4 Identificação por análise de sequências de DNA das microalgas isoladas. As imagens por microscopia óptica foram obtidas com aumento de 400X 67
Tabela 4.1 Tolerância a CO_2 de diversas espécies de microalgas reportadas em estudos anteriores ao ano 2000 71
Tabela 4.2 Medidas de intensidade luminosa nas diferentes posições da incubadora Infors HT..... 78
Tabela 4.3. Comparação entre os parâmetros velocidade específica máxima (μ_{max}), e concentração máxima de biomassa (X), após 14 dias de cultivo, das microalgas *P. kessleri*, *C. vulgaris* e *Scenedesmus* sp. cultivadas sob 0,04, 5, 15 e 30% de CO_2. 87
Tabela 4.4 Teor dos principais ácidos graxos nas microalgas *P. kessleri*, *C. vulgaris* e *Scenedesmus* sp. cultivadas sob 0,04, 15 e 30% de CO_2 90
Tabela 4.5 Teores de SFA, MUFA e PUFA nas microalgas *P. kessleri*, *C.vulgaris* e *Scenedesmus* sp. cultivadas sob 0,04, 15 e 30% de CO_2 91
Tabela 5.1 Denominação dos ensaios em fotobiorreator de acordo com a concentração de CO_2..... 101
Tabela 5.2 Taxas de emissão de fótons referentes aos fotobiorreatores A e B 107
Tabela 5.3 Velocidade máxima específica (μ_{max}), concentração em massa seca no dia 10 de cultivo (X) e taxa de fixação de CO_2 (PCO_2) no cultivo de *Scenedesmus* sp. sob aeração contínua ou intermitente a 5% de CO_2 e comparação com os ensaios em frascos agitados nas mesmas condições 112
Tabela 5.4 Valores de velocidade máxima específica (μ_{max}) referentes aos cultivos da *P. kessleri* sob 5, 15 e 30% CO_2 115
Tabela 5.5 Pressão parcial de O_2 e concentração de O_2 dissolvido na saturação, de acordo com a concentração de CO_2 na mistura com ar 116
Tabela 5.6 Taxas de fixação de CO_2 de microalgas do gênero *Chlorella* spp. cultivadas sob diferentes condições de CO_2 127
Tabela 5.7 Taxas de fixação de CO_2 de diferentes espécies de microalgas 127
Tabela 5.8 Biomassa resultante ao final dos cultivos de *P. kessleri* sob diferentes concentrações de CO_2. 129
Tabela 5.9 Concentração de carotenoides totais ao final dos cultivos de *P. kessleri* sob diferentes concentrações de CO_2..... 130
Tabela 5.10 Teor dos principais ácidos graxos da microalga *P. kessleri* cultivada sob 5, 15 e 30% de CO_2. Os valores são as médias das porcentagens relativas para cada condição..... 133
Tabela 6.1 Cálculo da concentração equivalente de Trolox dos extratos etanólicos 151
Tabela 6.2 Padrão de fragmentação MS/MS, com possíveis perdas de unidades de massas, λ_{max} (nm) e III/II (%) do pigmento vermelho 158
Tabela 6.3 Padrão de fragmentação MS/MS, λ_{max} (nm) e III/II (%) dos isômeros *cis* e *trans* da luteína e da zeaxantina 160

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$A_{1cm}^{1\%}$	Coeficiente de Absortividade Molar
μ_{max}	Velocidade específica máxima de crescimento
λ	Comprimento de onda
III/II (%)	Parâmetro para identificação da estrutura fina espectral
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
ACCase	Acetil-CoA carboxilase
ACP	Proteína transportadora de acila
APCI	Ionização química à pressão atmosférica
ATP	*Adenosine triphosphate* - Adenosina trifosfato
BLAST	*Basic Local Aligment Search Tool*
BIQ	*Bio Intelligent Quotient*
C_3	Ciclo de Calvin
Cc	Teor de Carbono
CCM	*CO_2 concentrating mechanisms* - Mecanismos de concentração de CO_2
CCS	*Carbon Capture and Storage* - Sequestro e Captura de Carbono
CEPEMA	Centro de Pesquisas em Meio Ambiente da USP
C_i	Carbono inorgânico
Cl.a	Clorofila-a
Cl.b	Clorofila-b
Cl.c	Clorofila-c
C/N	Razão entre carbono e nitrogênio
C_{O_2}	Concentração de O_2 na saturação
CoA	Coenzima A
COP21	*Conference of the Parties 21* - Conferência das Partes 21
Da	Dalton
DAG	Diacilglicerídeo
DGAT	Diacilglicerol aciltransferase
DHA	Ácido docosahexanoico
DNA	*Deoxyribonucleic acid* - Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
EL	Excesso de luz
ENR	Enoil-ACP redutase
EPA	Ácido Eicosapentanoico
ER	*Endoplasmic Reticulum* - Retículo Endoplasmático
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ESI	Ionização por *electrospray*
EUA	Estados Unidos da América
EVA	Espuma polivinílica acetinada

FA	*Fatty acids* - Ácidos graxos
FAME	*Fatty acid methyl esters* - Metil ésteres de ácidos graxos
FAT	Acil-AC graxo tioesterase
FTIR	*Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*- Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
GC	*Gas chromatography* – Cromatografia em fase gasosa
GEE	Gases do efeito estufa
G3P	*Glicerol-3-Phosphate* - Glicerol-3-fosfato
GPAT	Glicerol-3-fosfato aciltransferase
Gt	Gigatoneladas
H	Consante de Henry
HC	Hidrocarbonetos
HCCA	Ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico
HD	3-hidroxiacil-ACP desidratase
HPLC	*High Performance Liquid Chromatography* - Cromatografia líquida de alta eficiência
IPCC	*Intergovernamental Panel on Climate Change* - Painel intergovernamental sobre mudanças climáticas
IT	*Ion trap* – armadilha de íons
KAR	3-cetoacil-ACP redutase
KAS	3-cetoacil-ACP sintase
K_m	Constante de Michaelis
LC-MS	*Liquid Chromatograpgy coupled to Mass Spectrometry* - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LC-PUFA	*Long chain polyunsaturated fatty acids* - Ácidos graxos de cadeia longa
LD	*Lipid droplets* - Gotículas de lipídeos
LED	*Light Emitting diodes* - Diodo emissor de luz
LPA	Ácido lisofostatídico
LPAT	Lisofosfolipídeo aciltransferase
MALDI	*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* - Ionização e dessorção a laser assistida por matriz
MAT	Malonil-CoA:ACP trancilase
MC	Massa molar do carbono
MCO_2	Massa molar do CO_2
MS	*Mass spectrometer* - Espectrômetro de massas
MUFA	*Monounsaturated Fatty Acids* - Ácidos graxos monoinsaturados
m/z	Razão massa/carga
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NCBI	*National Center for Biotechnology and Information* - Centro nacional para biotecnologia e informação
P	Produtividade
PA	Ácido fosfatídico
PAP	Ácido fosfatídico fosfatase

PCO_2	Taxa de fixação de CO_2
PCR	*Polimerase Chain Reaction* - Reação em cadeia da polimerase
PCRC	*Photosynthetic Carbon Reduction Cycle* - Ciclo de redução fotossintética do carbono
PDA	*Photodiode Array* – Arranjo de fotodiodos
PDAT	Fosfolipídeo: diacilglicerol aciltransferase
PDH	Complexo piruvato desidrogenase
p_g	Pressão parcial na fase gasosa
pH	Potencial hidrogeniônico
PHB	Polihidroxibutirato
PUFA	*Poly-unsaturated Fatty Acids* - Ácidos graxos poli-insaturados
RCGI	*Research Centre for Gas Innovation* - Centro de pesquisas para inovação em gases
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RuBisCO	Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase
RuBP	Ribulose 1,5-bifosfato
SFA	*Saturated Fatty Acids* - ácidos graxos saturados
TAG	Triacilglicerídeo
TCD	Detector por condutividade térmica
TEAC	*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* - Capacidade antioxidante equivalente de Trolox
TLC	*Thin Layer Chromatography* - Cromatografia em camada fina
TFA	Ácido trifluoroacético
TOF	*Time of flight* - tempo de voo
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
u.a.	Unidade arbitrária
u.m.	Unidades de massa
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
v/v	Volume/volume
X	Concentração de células

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO 21
1.1.1 Contextualização e justificativa 21
1.1.2 Contextualização do projeto onde esta tese está inserida 26
1.2 OBJETIVO 28
1.3 ETAPAS E APRESENTAÇÃO DO TRABALHO 29

CAPÍTULO 2

2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 31
2.1.1 Microalgas – Principais características 31
2.1.2 Composicão química 32
2.1.3 Metabolismo e aspectos mecanísticos 34
2.1.4 Aplicações industriais 44
2.1.5 Cultivo de microalgas 48

CAPÍTULO 3

3.1 INTRODUÇÃO 54
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS 55
3.2.1 Bioprospecção e amostragem 55
3.2.2 Enriquecimento e pré-seleção sob 30% de CO_2 56
3.2.3 Isolamento das microalgas 59
3.2.4 Análise do perfil proteico das microalgas isoladas 60
3.2.5 Extração de DNA, sequenciamento e identificação das microalgas 61
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 62
3.3.1 Pré-seleção e isolamento de microalgas tolerantes a CO_2 62
3.3.2 Análise do perfil proteico 64
3.3.3 Identificação das microalgas isoladas por biologia molecular 66
3.4 CONCLUSÃO 69

CAPÍTULO 4

4.1 INTRODUÇÃO 70
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS 72
4.2.1 Avaliação das intensidades luminosas na incubadora 72
4.2.2 Cinéticas de crescimento sob diferentes concentrações de CO_2 73
4.2.3 Cálculo dos parâmetros cinéticos de crescimento 75
4.2.4 Extração dos lipídeos 76
4.2.5 Análise dos ácidos graxos 76
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 78
4.3.1 Avaliação das intensidades luminosas na incubadora 78
4.3.2 Comparação entre os métodos de medidas de crescimento 79
4.3.3 Avaliação das cinéticas de crescimento das microalgas sob diferentes concentrações de CO_2 81
4.3.4 Composição lipídica de microalgas cultivadas sob diferentes concentrações de CO_2 89
4.4 CONCLUSÃO 94

CAPÍTULO 5

5.1 INTRODUÇÃO 95
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS 96
5.2.1 Configuração dos fotobiorreatores 96
5.2.2 Determinação actinométrica das taxas de emissão de fótons 98
5.2.3 Validação do sistema de fotobiorreatores com *Scenedesmus* sp. 98
5.2.4 Cultivo da microalga *P. kessleri* em fotobiorreator sob diferentes concentrações de CO_2 100
5.2.5 Métodos analíticos e de análise dos dados 103
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 106
5.3.1 Determinação actinométrica das taxas de emissão de fótons 106
5.3.2 Validação do método de operação dos fotobiorreatores utilizando a microalga *Scenedesmus* sp. 108
5.3.3 Ensaios cinéticos com a microalga *P. kessleri* em fotobiorreator sob diferentes concentrações de CO_2 114
5.4 CONCLUSÃO 139

CAPÍTULO 6

6.1 INTRODUÇÃO 140
6.2 MATERIAIS E MÉTODOS 142
6.2.1 Pré-purificação dos pigmentos e avaliação da solubilidade em diferentes solventes orgânicos 143
6.2.2 Caracterização dos extratos metanólicos 145
6.2.3 Separação das frações de carotenoides por HPLC semi-preparativo 147
6.2.4 Caracterização das frações de carotenoides por espectrometria de massas sequencial 148
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 148
6.3.1 Caracterização dos extratos metanólicos 148
6.3.2 Caracterização das frações de carotenoides por espectrometria de massas sequencial 156
6.4 CONCLUSÃO 161

CAPÍTULO 7

7.1 DISCUSSÕES GERAIS 162
7.2 CONCLUSÕES GERAIS 167
7.3 PERSPECTIVAS FUTURAS 168
7.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 169
APÊNDICE A 188
APÊNDICE B 189
APÊNDICE C 190
APÊNDICE D 193
APÊNDICE E 194
APÊNDICE F 197
APÊNDICE G 200

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Contextualização e justificativa

Mudanças climáticas recentes têm provocado uma comoção global para o desenvolvimento de pesquisas no intuito de observar, entender, predizer e, se possível, mitigar os impactos dessas alterações. Emissões de gases do efeito estufa (GEE) antropogênicas, ou seja, pela ação humana, e sem precedentes, são provavelmente as causas das recentes mudanças climáticas. Em 1996, o Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC - *Intergovernmental Panel on Climate Change*,) deu início a uma importante iniciativa para estudar o efeito de futuras emissões de GEE, através de modelos. Os modelos consideraram diferentes cenários até o ano de 2100, incluindo na ausência de qualquer política específica para mitigar as mudanças climáticas. Para 2100, a concentração de CO_2 atmosférico mais baixa considerada foi 450 ppm, a qual é 80 ppm maior do que a do ano 2000, que por sua vez é um valor que muito provavelmente não foi excedido nos últimos 20 milhões de anos (HUNTLEY; REDALJE, 2007).

Em setembro de 2015, a COP21 (*Conference of the Parties*) em Paris alcançou um acordo universal no âmbito das mudanças climáticas com a ambição de limitar o aquecimento global entre 1,5 e 2°C acima dos níveis pré-industriais. A fim de cumprir este acordo, a quantidade total de CO_2 emitida, ou "orçamento de carbono", deveria ser menor do que 1000 gigatoneladas (Gt). Em 2016, as emissões de CO_2 por fontes fósseis foram de aproximadamente 36 Gt. Seguindo essa taxa de emissão média de 36 $GtCO_2$/ano, esse orçamento seria ultrapassado nos próximos 30 anos (BUDINIS et al., 2016).

Algumas das propostas de ações diretas para reduzir as emissões de CO_2 incluem conservação e uso eficiente de energia, adoção de tecnologias para o uso mais eficiente do carvão e substituição do carvão por gás natural (KENARSARI et al., 2013; LEUNG; CARAMANNA; MAROTO-VALER, 2014). O gás natural pode ter um papel importante nos futuros sistemas energéticos com baixas emissões de carbono, porém ainda há um debate e muitas incertezas sobre a sua contribuição. Enquanto gás natural pode representar uma

melhora nas emissões de carbono, quando comparado ao carvão, estas podem não ser suficientemente baixas para atender às exigências globais. Adicionalmente, metano (principal componente do gás natural) é um gás com potencial de no mínimo 20 vezes o do CO_2 para o efeito estufa. Portanto, se as emissões de metano aumentarem, ele deverá ser considerado em escala semelhante à do CO_2 (BALCOMBE et al., 2015; SCHADEL et al., 2016).

O cenário atual de emissões de CO_2 e os acordos globais levaram ao conceito de "emissões negativas", ou seja, além da necessidade de ações rápidas e efetivas, principalmente de políticas públicas e novas tecnologias para atingir "emissões zero", é preciso também utilizar tecnologias para capturar, utilizar e estocar carbono (CCUS - *Carbon capture, usage and storage*) (HERZOG; GOLOMB, 2004; KURAMOCHI et al., 2012). Tecnologias de CCUS são necessárias e podem contribuir positivamente para se atingir soluções de descarbonização dos sistemas energéticos. A injeção direta em formações geológicas, por exemplo, é uma das estratégias consideradas (YANG et al., 2008). No entanto, é difícil garantir que o CO_2 estocado nessas formações estará seguro em longo prazo, sabendo que o seu escape pode ser catastrófico. No ambiente marinho, o vazamento de CO_2 de poços para armazenamento de carbono pode causar acidificação da água e afetar bactérias e, consequentemente, todas as outras formas de vida desse habitat (BORRERO-SANTIAGO; DELVALLS; RIBA, 2016). Por outro lado, em diversos estudos, assume-se que aproximadamente de 85 a 90% das emissões de CO_2 possam ser capturadas por tecnologias do tipo CCUS, sendo que os 10 a 15% restantes podem ser determinantes para definir os próximos cenários globais (BUDINIS et al., 2016).

Uma estratégia potencialmente com menor risco para o sequestro de CO_2 é a sua conversão química em líquidos ou sólidos estáveis. A produção de sais de carbonato é uma das abordagens, podendo estes sais serem utilizados em materiais de construção (BUESSELER et al., 2004). A utilização de determinados solventes para a captura de CO_2 tem sido o método mais empregado, inclusive com demonstrações em larga escala, utilizando solventes aquosos de amina. Paralelamente, recentes estudos têm considerado outros solventes alternativos, os quais incluem os líquidos iônicos e materiais híbridos orgânicos de nanopartículas (PARK et al., 2015).

Algumas das ações indiretas para mitigação das mudanças climáticas incluem o desenvolvimento de mercado para energias renováveis, florestação e reflorestamento (KENARSARI et al., 2013; LEUNG; CARAMANNA; MAROTO-VALER, 2014). Os biocombustíveis, quando comparados com outras formas de energia renováveis, são mais

compatíveis com a atual infraestrutura energética, além de possuírem maior densidade energética, o que fornece uma base para o seu uso prolongado. A primeira geração de sistemas de produção de biocombustíveis (etanol derivado do açúcar) demonstrou a viabilidade de se gerar combustíveis líquidos a partir de fontes renováveis. Porém, em termos de emissões de carbono, dois terços do carbono do açúcar convertido em etanol já são emitidos como CO_2 durante a etapa de fermentação. Além disso, emissões adicionais de CO_2 associadas ao uso de fertilizantes, pesticidas, herbicidas, bem como na irrigação, desmatamento, erosão e transporte de matéria-prima, reduzem ainda mais a eficiência de captura de CO_2 na produção de combustíveis a partir de biomassa vegetal (HILL et al., 2006).

O último relatório da IPCC (2019) enfatizou que a agricultura, a silvicultura e outros usos da terra são fontes significativas de emissões de GEE, contribuindo com aproximadamente 22% das emissões antropogênicas desses gases. A implementação de medidas de mitigação de carbono em termos de uso da terra, em larga escala e em curto período de tempo, requereria a conversão de grandes áreas de terra para florestação e reflorestamento. Os benefícios dessas ações, em curto período de tempo, seriam melhores do que o uso da terra para cultivos voltados à bioenergia a partir de biomassa vegetal, por exemplo, o que poderia levar diversos ciclos de colheitas para "pagar" o carbono emitido devido às práticas agrícolas (IPCC, 2019).

Uma alternativa interessante seria obter biocombustíveis pela conversão direta de CO_2 por microrganismos fototróficos, como as microalgas eucarióticas e cianobactérias. Dessa forma, além da captura de CO_2 seria também produzido um combustível, como o biodiesel, por uma fonte renovável. O desenvolvimento de pesquisas e tecnologias para essa finalidade começou intensivamente nos anos 1980 e continua nos dias atuais (HUNTLEY; REDALJE, 2007; SASSO et al., 2012). Dentre as vantagens de se produzir biodiesel a partir de microalgas, comparado com o de plantas terrestres, é que os sistemas podem ser altamente controlados e otimizados, elas produzem de duas a dez vezes mais biomassa por unidade de terra do que plantas terrestres, a biomassa pode ser recuperada em qualquer época do ano, e não sazonal, as células podem acumular até 70% de massa seca em lipídeos, o que as tornam os sistemas mais eficientes, e os reatores podem ser de diversos tipos e formatos para obter maior área superficial em pequeno espaço de terra (SAYRE, 2010).

Considerando o uso de microalgas para a fixação de CO_2, uma estratégia hipotética seria a fertilização dos oceanos com nutrientes, tais como ferro, nitrogênio e fósforo, que normalmente são limitantes para o crescimento de algas, aumentando assim o seu crescimento

e consequentemente a captura de carbono (BUESSELER et al., 2004). No entanto, os impactos ambientais dessa abordagem ainda são desconhecidos, podendo ser catastróficos. Uma alternativa viável, e o que normalmente se faz, é controlar essa fertilização em espaços menores, como nas lagoas abertas, as quais podem ser implantadas próximas a instalações industriais. Por exemplo, para uma típica termoelétrica com produção de 200 MWh, estima-se que uma lagoa aberta de aproximadamente 15 km^2 seja suficiente para capturar 80% de suas emissões de CO_2 durante os períodos de luz, assumindo uma produção de biomassa de alga de 20 g m^{-2} dia^{-1} (massa seca) (HERZOG; GOLOMB, 2004).

Um possível destino da biomassa algal numa forma geologicamente estável é através da sua conversão em *biochar* (HEILMANN et al., 2010). *Biochar* refere-se ao produto obtido a partir da pirólise controlada de material orgânico sob altas temperaturas na presença de um catalisador sob condições anaeróbicas, sendo uma forma estável de carbono que pode persistir no solo por milhares de anos. O uso do *biochar* está ligado às descobertas em áreas de solo fértil na Amazônia, conhecidas por “Terras Pretas de Índio”, com altas concentrações de nutrientes, matéria orgânica e carvão pirogênico (BROSSI et al., 2014). Entender as características dos solos pretos da Amazônia tem importância ecológica, porque essas terras representam um modelo para agricultura sustentável baseada em resíduos, além de capturarem cerca de 70 vezes mais carbono do que os solos em torno delas (PAGANO et al., 2016).

Há ainda abordagens para a inclusão da tecnologia de produção de biomassa microalgal em cidades, na arquitetura de prédios industriais ou empresariais. Em muitos deles, atualmente, já se encontram implementadas outras fontes alternativas de energia, como a eólica e os painéis fotovoltaicos. Uma das vantagens dessa nova abordagem é que, como as microalgas podem ser cultivadas em reatores de diferentes formatos, como os tubulares e os painéis, estes podem ser instalados na fachada dos prédios, como ilustra a Figura 1.1. No entanto, para ser considerada como fonte de energia, é preciso que cada prédio possua uma biorrefinaria para produzir metano por digestão anaeróbica da biomassa de microalgas, e o próprio CO_2 gerado seria alimentado nos fotobiorreatores para o crescimento das microalgas (ELRAYIES, 2018). Os exemplos citados aqui são somente algumas das diversas abordagens para a utilização de microalgas como fonte renovável de energia. No entanto, é preciso destacar que diante do cenário atual global de emissões de CO_2, as soluções mais criativas podem ser muito bem-vindas.

Figura 1.1 Exemplos de edifícios com cultivo de microalgas como fonte de energia: a) prédio BIQ, Hamburgo, Alemanha; b) Process zero, Los Angeles, EUA; c) Green Loop Tower, Chicago, EUA

a)

b)

c)

Fonte: Adaptado de ELRAYIES (2018)

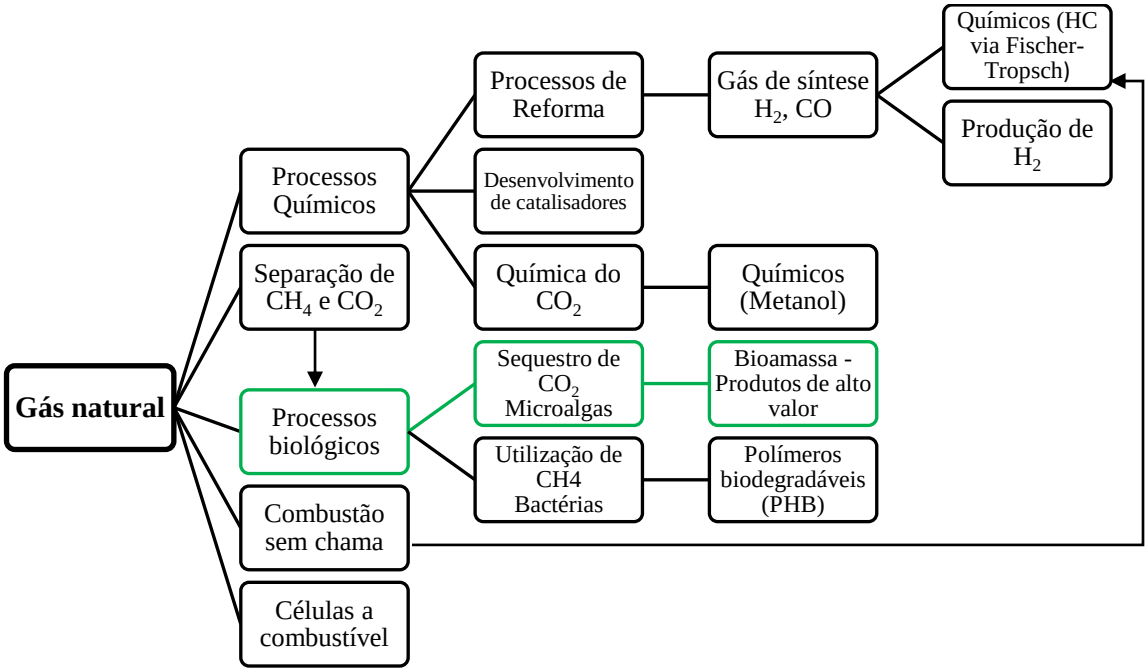
Muito além de novas tecnologias, o novo cenário atual exige também uma mudança de comportamento da sociedade. Ailton Krenak, ambientalista e sociólogo brasileiro, apresenta uma visão muito interessante sobre o assunto em seu livro "Ideias para adiar o fim do mundo" (KRENAK, 2019). Ele salienta: "[...] fomos nos alienando desse organismo de que somos parte, a Terra, e passamos a pensar que ele é uma coisa e nós outra: a Terra e a humanidade. Eu não percebo onde tem alguma coisa que não seja natureza. Tudo é natureza. O cosmo é natureza. Tudo em que eu consigo pensar é natureza". Sobre o "fim do mundo", ele lembra que os povos indígenas há muito tempo já estiveram ameaçados de ruptura, já tiveram os seus "fins de mundo" e hoje estamos todos diante da iminência de a Terra não suportar a nossa demanda. "O fim do mundo talvez seja uma breve interrupção de um estado de prazer extasiante que a gente não quer perder.[...] Já caímos em diferentes escalas e em diferentes lugares do mundo, mas temos muito medo do que vai acontecer quando a gente cair.[...] Então (diante da iminente queda), talvez o que a gente tenha de fazer é descobrir um paraquedas".

1.1.2 Contextualização do projeto onde esta tese está inserida

Este trabalho está inserido em um projeto mais abrangente intitulado "Conversão de CO_2 e CH_4 em bioprodutos", que é o projeto 17 do programa de Físico-Química do grupo do RCGI (*Research Centre for Gas Innovation*). Esse grupo se iniciou em 2016 como um centro mundial de estudos avançados sobre transição energética para o uso sustentável de gás natural, biogás, hidrogênio e gerenciamento, transporte, armazenamento e uso de CO_2. O centro, sediado no Departamento de Engenharia Mecânica da Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, é o resultado de parcerias entre a FAPESP e o grupo Shell (https://www.rcgi.poli.usp.br/pt-br/).

Os projetos do programa de Físico-Química estão focados em rotas de síntese química e bioquímica, provas de conceito, desenvolvimento de catalisadores, modelagem e otimização de processos, bem como aplicações tecnológicas como desenvolvimento de células a combustível, energia solar e membranas cerâmicas. O fluxograma da Figura 1.2 apresenta os principais projetos do programa de Físico-Química e onde este trabalho está inserido.

Figura.1.2 Fluxograma das principais rotas de conversão química e biológica para utilização do gás natural estudadas nos projetos do programa de Físico-Química do RCGI, com destaque para o trabalho em questão



Neste contexto, este trabalho está inserido como uma proposta de rota biológica para a conversão seletiva de CO_2 presente no gás natural por microrganismos fotossintetizantes (ou

seja, que utilizam CO_2, água e luz para realizar a fotossíntese), como as microalgas, em bioprodutos de alto valor, para tornar o processo economicamente viável.

A composição do gás natural de diferentes reservas pode variar muito, podendo apresentar um teor de CO_2 de 0 a 50% (BALCOMBE et al., 2015). Dessa forma, para ser considerado como fonte de CO_2 para o cultivo de microalgas, estas devem lidar com concentrações elevadas de CO_2, o que não é uma condição usual. Existe uma classificação das microalgas segundo a tolerância a CO_2, as quais podem ser sensíveis (< 2 a 5% de CO_2) ou tolerantes (de 5 a 20% de CO_2) (KASSIM; MENG, 2017). Assim, concentrações de CO_2 acima de 20% já são consideradas elevadas.

A maioria dos estudos envolvendo o estímulo para a produção de lipídeos por microalgas tem sido focados nos efeitos da composição do meio de cultura, iluminação, ou diferentes configurações de fotobiorreatores (CHEN et al., 2011). Porém, o suprimento de CO_2 extra pode ser uma estratégia promissora para estimular a produção de lipídeos por microalgas em larga escala, pois as microalgas podem assimilar o CO_2 do gás de combustão das fábricas, ou de outras fontes gasosas como o gás natural. Apesar disso, os mecanismos do acúmulo de lipídeos sob altas doses de CO_2 ainda não foram completamente elucidados. Estudos indicaram altas eficiências de conversão de carbono a lipídeos em culturas sob altas doses de CO_2 comparado com culturas crescidas sob condições de CO_2 atmosférico (SUN; CHEN; DU, 2016).

1.2 OBJETIVO

O objetivo principal deste trabalho foi a bioprospecção de microalgas tolerantes a CO_2 para a conversão de CO_2, a partir de correntes gasosas contendo altas concentrações desse gás, em produtos de interesse biotecnológico e de alto valor. Partiu-se da hipótese de se utilizar altos níveis de CO_2 como estratégia para induzir a produção de lipídeos em microalgas e, possivelmente, outros bioprodutos.

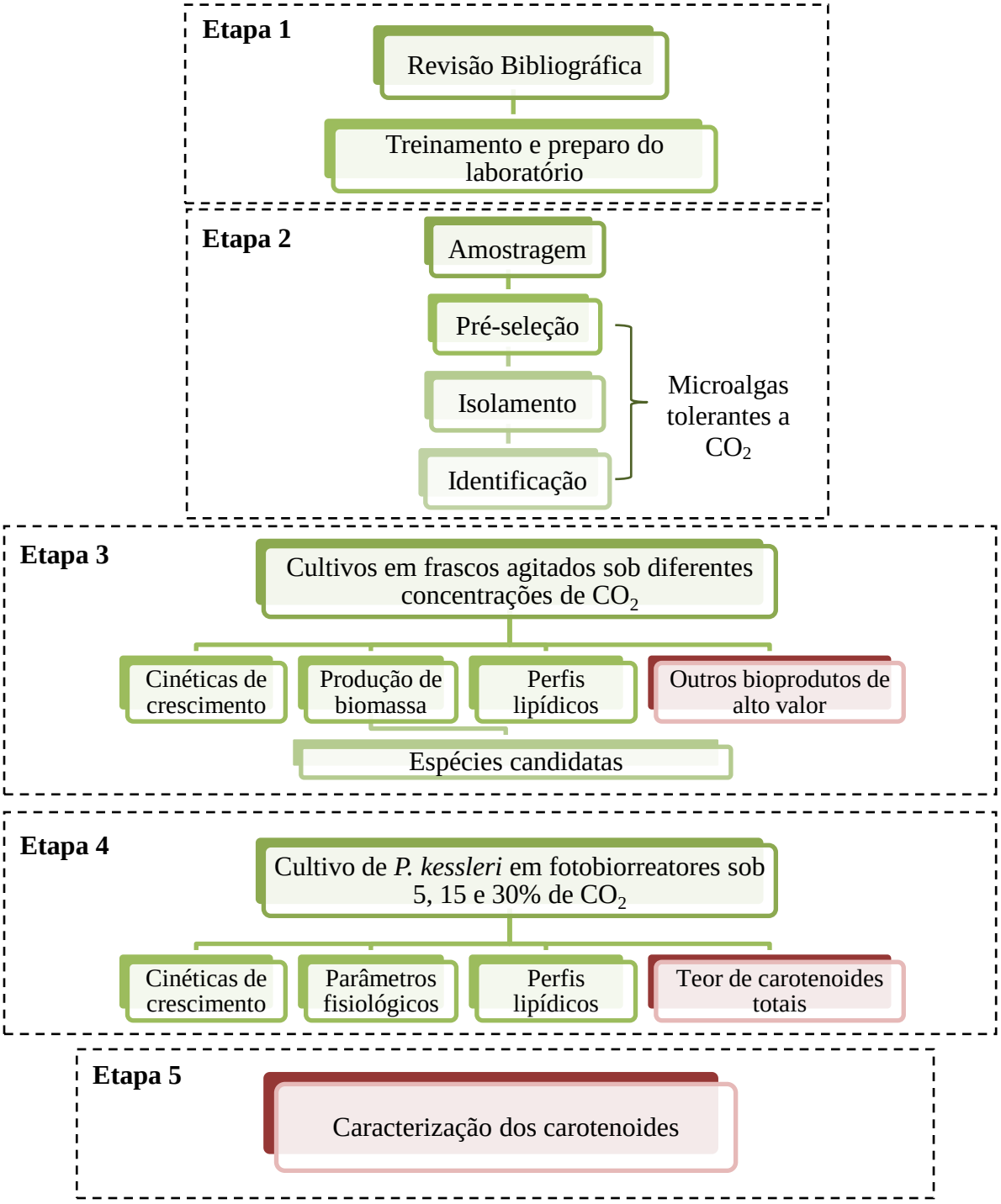
Para tanto, os seguintes objetivos específicos foram necessários:

- Isolar e identificar microalgas tolerantes a altas concentrações de CO_2;
- Avaliar as cinéticas de crescimento e produção de biomassa das microalgas sob diferentes concentrações de CO_2;
- Determinar os perfis lipídicos a fim de identificar potenciais aplicações biotecnológicas para a biomassa obtida;
- Verificar outros possíveis bioprodutos de interesse comercial;
- Cultivar as linhagens mais promissoras em fotobiorreator a fim de monitorar e controlar os parâmetros de processo, além de verificar as respostas das diferentes concentrações de CO_2 nos parâmetros fisiológicos e na produção de bioprodutos.

1.3 ETAPAS E APRESENTAÇÃO DO TRABALHO

Este trabalho foi constituído pelas etapas resumidamente descritas na Figura 1.3.

Figura 1.3 Fluxograma representativo das principais etapas do trabalho



Etapa 1: Elaboração da revisão bibliográfica sobre o tema, paralelamente à obtenção dos materiais, equipamentos específicos (como o controlador de fluxo mássico) e adaptação da estrutura do laboratório para o cultivo de microalgas com instalação de um painel luminoso na incubadora rotacional e outro em sala refrigerada para manter o estoque das microalgas.

Etapa 2: Pré-seleção, isolamento e identificação de microalgas tolerantes a altas concentrações de CO_2: as amostras de água e sedimento recebidas foram enriquecidas em condições favoráveis ao crescimento de microalgas e sob 30% de CO_2, a fim de selecionar aquelas tolerantes a essa condição, as quais foram isoladas utilizando diferentes técnicas e identificadas via biologia molecular.

Etapa 3: Estudo cinético e produção de lipídeos de microalgas sob diferentes concentrações de CO_2: as microalgas isoladas na etapa anterior foram avaliadas segundo os parâmetros cinéticos, sob diferentes concentrações de CO_2, e o perfil de lipídeos. *Parachlorella kessleri* foi a que apresentou melhor crescimento, produção de biomassa e produziu carotenoides, que são os produtos de maior interesse comercial dentre os avaliados.

Etapa 4: Estudo cinético da microalga *P. kessleri* em fotobiorreator sob diferentes concentrações de CO_2: foi verificado o cultivo da microalga *P. kessleri* em fotobiorreator sob concentrações de 5, 15 e 30% de CO_2, podendo-se monitorar mais parâmetros durante os cultivos, como pH e oxigênio dissolvido, além de obter biomassa e carotenoides suficientes para a etapa de caracterização.

Etapa 5: Avaliação e caracterização dos carotenoides produzidos pela microalga *P. kessleri*: foram elaborados métodos de purificação do produto e caracterização dos carotenoides segundo as propriedades químicas, espectroscópicas e segundo a atividade antioxidante.

Assim, a apresentação da tese foi dividida em capítulos de acordo com cada etapa. Além do Capítulo 2, que contém uma revisão bibliográfica detalhada, os demais contêm cada um uma introdução, a descrição dos materiais e métodos, os resultados, a discussão e as conclusões referentes àquele grupo de resultados, de forma a facilitar a organização, a fluência de leitura e o entendimento do trabalho. A tese se encerra com um capítulo de discussões e conclusões gerais referentes ao trabalho como um todo, contendo também as referências bibliográficas e os anexos.

CAPÍTULO 2

2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.1 Microalgas – Principais características

Microalgas representam um vasto grupo composto por cianobactérias procarióticas e algas microscópicas eucarióticas, ainda não totalmente explorado, com cerca de 40.000 espécies conhecidas. Microalgas eucarióticas constituem nove filos: *Glaucophyta*, *Chlorophyta*, *Chlorarachniophyta*, *Euglenophyta*, *Rhodophyta*, *Cryptophyta*, *Heterokontophyta*, *Haptophyta* e *Dinophyta* (BECKER, 2007; DUONG et al., 2012). O caminho evolucionário das algas se iniciou com um ancestral eucariótico que adquiriu uma cianobactéria fotossintética em um único evento endossimbiótico, resultando em algas verdes, vermelhas e glaucofitas. Outros eventos endossimbióticos podem ter ocorrido originando outras modificações (SASSO et al., 2012).

O grupo das microalgas pode ser dividido em sub-grupos de acordo com a organização celular, como unicelular, colonial e filamentosa, diferindo principalmente na forma e motilidade. As espécies procarióticas possuem parede celular com quatro camadas, sendo composta por peptidoglicanos e lipopolissacarídeos, o que evidencia a ausência de celulose, presente nas espécies eucarióticas (TOMASELLI, 2004).

Microalgas são conhecidas pela habilidade de produzir biomassa e oxigênio convertendo água, CO_2 e micronutrientes, utilizando luz como fonte de energia. Esse processo é comumente conhecido por fotossíntese e, assim, microalgas com esse perfil metabólico são classificadas como fotoautotróficas (TOMASELLI, 2004). No entanto, algumas espécies como *Spirulina* sp. e *Chlorella vulgaris* também são capazes de crescer por assimilação heterotrófica de compostos orgânicos, ou mesmo combinada com fotossíntese, conhecido por mixotrofia (LIANG; SARKANY; CUI, 2009).

Os lugares onde se pode encontrar microalgas são diversos, a maioria em sistemas aquáticos, tais como rios, lagos e outros ecossistemas marinhos, mas também em pedras e superfície de solos (TOMASELLI, 2004). Dessa forma, elas podem ser cultivadas em áreas não designadas para agricultura e sua produção não compete com a produção de alimentos (VAN DER HA et al., 2012). Curiosamente, apesar de terem vida livre, um certo número de

microalgas vive em associação simbiótica com uma variedade de organismos, como fungos, bactérias e esponjas do mar (TOMASELLI, 2004). Além disso, elas podem ser encontradas em ambientes extremos como águas próximas a vulcões ou águas muito salobras. Espécies isoladas de lugares com intensas alterações climáticas ou condições adversas demonstraram ter maiores chances de sobreviver quando cultivadas em laboratório ou outro ambiente diferente do original. Do mesmo modo, espécies locais tendem a se adaptar melhor, após isoladas, quando cultivadas em condições ambientais locais (DUONG et al., 2012).

A faixa de tamanho das microalgas varia de 1 µm a 2 mm (SUBASHCHANDRABOSE et al., 2011) e sua observação pode ocorrer por microscopia óptica do líquido ou do material fresco centrifugado, examinando características como estrutura e cor (TOMASELLI, 2004).

2.1.2 Composicão química

Assim como outros microrganismos, microalgas possuem um perfil de composição química específico que, além de possibilitar sua identificação, sugere possíveis aplicações tecnológicas dependendo do seu conteúdo. A maior parte do conteúdo de microalgas é composta por água, variando de 80 a 90%, mas também de carboidratos, proteínas e lipídeos. Carboidratos compreendem perto de 64% da massa seca das microalgas, mas essa média varia se expostas a altas intensidades de luz ou outras condições de cultivo. A Tabela 2.1 apresenta a composição química de diferentes microalgas. Considerando a composição química, a razão C/N é importante para algumas aplicações, tais como produção de biogás. A biomassa algal normalmente apresenta razão C/N de 10, a qual é considerada baixa para digestão anaeróbica, apesar das condições de crescimento poderem ser manipuladas para atingir uma razão adequada (MONTINGELLI; TEDESCO; OLABI, 2015).

Microalgas são potencial fonte de lipídeos. A produção lipídica de microalgas varia de 1 a 70%, dependendo das condições de crescimento e da espécie. Por exemplo, a adição de glicose no meio de cultivo pode favorecer a produção de lipídeos totais. Condições de estresse induzido, como limitação por nitrogênio, também podem estimular a produção de lipídeos, pois nessas situações as células param de se proliferar e produzem carboidratos e lipídeos de reserva (CHISTI, 2007). A Tabela 2.2 fornece o teor de óleo de algumas espécies de microalgas reportadas na literatura (CHISTI, 2007), algumas não descritas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 Composições de diferentes microalgas com base na massa seca

Microalga	**Proteínas (%)**	**Carboidratos (%)**	**Lipídeos (%)**
Anabaena cylindrical	43 - 56	25 - 30	4 - 7
Aphanizomenon flos-aquae	62	23	3
Arthospira maxima	60 - 71	13 - 16	6 - 7
Botryococus braunii	8 - 17	8 - 20	21
Chlamydomonas rheinhardii	48	17	21
Chlorella pyrenodoisa	57	26	2
Chlorella vulgaris	51 - 58	12 - 17	14 - 22
Dunaliella bioculata	49	4	8
Dunaliella salina	57	32	6
Euglena gracilis	39 - 61	14 - 18	14 - 20
Isochrysis sp.	31 - 51	11 - 14	20 - 22
Neochloris oleoabundans	20 - 60	20 - 60	35 - 54
Porphyridium parvum	28 - 39	40 - 57	9 - 14
Prymnesium parvum	28 - 45	25 - 33	22 - 38
Scenedesmus obliquus	50 - 56	10 - 17	12 - 14
Spirogyra sp.	6 - 20	33 - 64	11 - 21
Spirulina maxima	60 - 71	13 - 16	6 - 7
Spirulina platensis	46 - 63	8 - 14	4 - 9
Synechococcus sp.	63	15	11
Tetraselmis maculata	52	15	3

Fonte: KLINTHONG et al. (2015)

Tabela 2.2 Teor de lipídeos de algumas espécies de microalgas reportadas na literatura

Microalga	Teor de lipídeos (% massa seca)
Botryococcus braunii	25 - 75
Chlorella sp.	28 - 32
Crypthecodinium cohnii	20
Cylindrotheca sp.	16 – 37
Dunaliella primolecta	23
Isochrysis sp.	25 – 33
Monallanthus salina	> 20
Nannochloris sp.	20 – 35
Nannochloropsis sp.	31 – 68
Neochloris oleoabundans	35 – 54
Nitzschia sp.	45 – 47
Phaeodactylum tricornutum	20 – 30
Schizochytrium sp.	50 – 77
Tetraselmis sueica	15 – 23

Fonte: CHISTI (2007)

2.1.3 Metabolismo e aspectos mecanísticos

Estudar o metabolismo de microalgas é crucial para entender os potenciais produtos deste metabolismo. Esse estudo pode fornecer parâmetros para melhorar o cultivo de microalgas e aumentar a formação de biomassa, avaliar os gargalos para diminuir os custos do processo, bem como sugerir alterações nas vias metabólicas para favorecer a produção de um determinado metabólito de interesse. Dessa forma, é importante conhecer também os mecanismos das reações do metabolismo para propor processos de cultivo diferenciados.

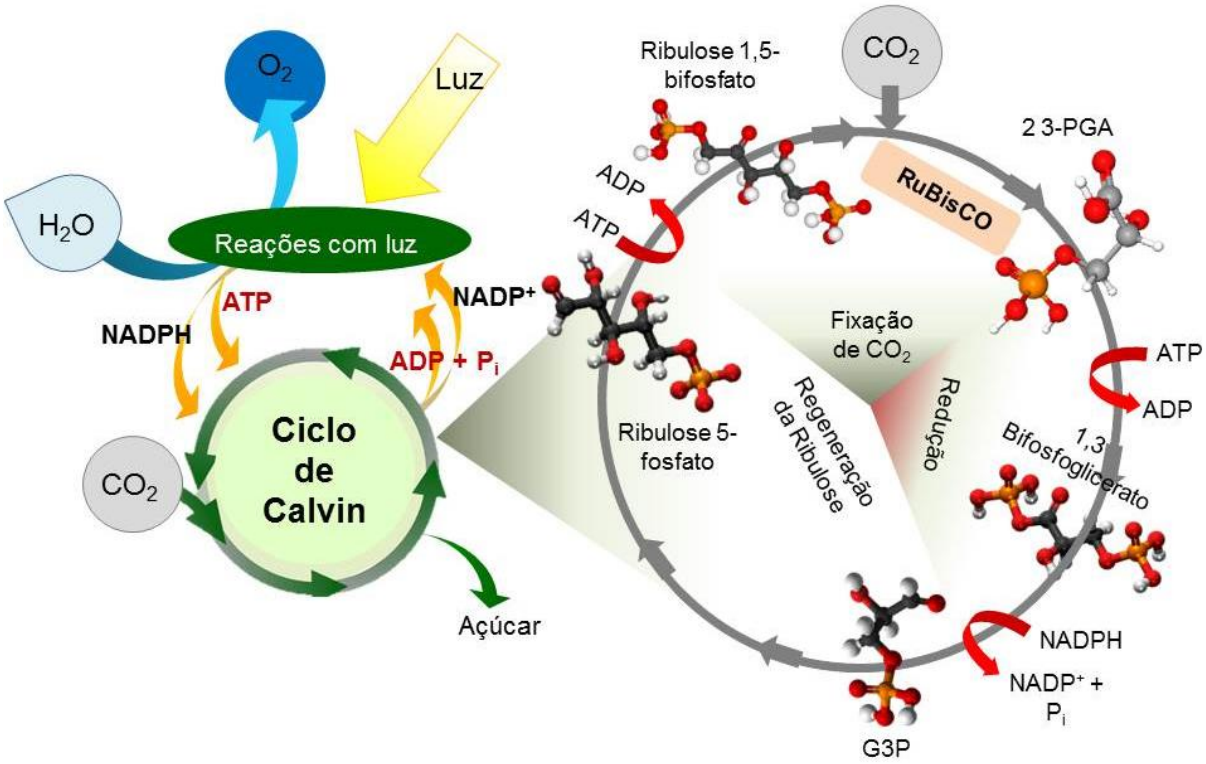
2.1.3.1 Assimilação de carbono

Microalgas eucarióticas adquirem carbono inorgânico (C_i) dissolvido no meio aquoso para realizarem a fotossíntese. A maioria dessas espécies cresce em meio alcalino, tanto em água doce com pH maior do que 7,0 quanto em água do mar com pH na faixa de 8,0 a 8,3. Nessas faixas de pH, C_i se apresenta na forma de HCO_3^-, e CO_2 constitui menos do que 1% do

total de C_i quando o meio está em equilíbrio com a atmosfera. Além disso, a taxa de difusão de CO_2 na água é 10^4 mais lenta do que na atmosfera, e a taxa de conversão não catalisada de HCO_3^- para CO_2 é muito lenta em pH alcalino. Esses vários fatores limitam o fornecimento de CO_2 para as microalgas e podem restringir a fotossíntese em meio aquático (COLMAN et al., 2002).

Organismos provenientes de diversos grupos taxonômicos de algas incorporam C_i pela via metabólica C_3, ou ciclo de Calvin, na qual CO_2 é o substrato para a principal enzima carboxiladora, RuBisCO (Ribulose-1,5-bifosfato-carboxilase/oxigenase), que tanto catalisa a carboxilação quanto a oxigenação da ribulose-1,5-bifosfato (RAVEN, 1997). A assimilação de CO_2 em moléculas orgânicas se inicia quando a RuBisCO catalisa a carboxilação da ribulose 1,5-bifosfato para produzir 2 moléculas de 3-fosfoglicerato (3-PGA), as quais são depois processadas pelo ciclo de Calvin (Figura 2.1).

Figura 2.1 Principais reações do ciclo de Calvin



Fonte: Adaptado de VIDAL (2016)

As afinidades por CO_2 ($K_m(CO_2)$) de RuBisCOs de algas são relativamente baixas, em torno de 30 a 80 µmol L^{-1} (BADGER et al., 1998). Células de microalgas, no entanto, possuem uma alta afinidade aparente por CO_2. Além disso, constatou-se que um grande

número de microalgas pode acumular intracelularmente concentrações de C_i de 5 a 75 vezes maiores do que a presente no meio aquoso, apesar do gradiente de pH entre o citosol da alga e o meio externo ser desfavorável para o acúmulo de C_i por difusão de CO_2. A habilidade de consumir e acumular C_i internamente parece ter se desenvolvido de forma evolucionária para suprir as deficiências na principal carboxilase dessas microalgas, pela atividade competitiva intrínseca da oxigenase causada pela limitação do suprimento de CO_2 do meio externo. Esses processos são chamados de mecanismos de concentração de CO_2 (CCM - *CO_2 concentrating mechanism*) (BADGER et al., 1998).

Apesar da maioria das microalgas estudadas apresentarem algum tipo de CCM, um número limitado não possui alta afinidade por CO_2. As algas verdes unicelulares *Coccomyxa* sp. em simbiose com líquen assimilam CO_2 por difusão e tem desenvolvido RuBisCOs com baixo $K_m(CO_2)$ (12 µmol L^{-1}) e alta especificidade por CO_2 (PALMQVIST et al., 1995). Similarmente, as algas *Cyanidium caldarium* e *Galdieria* sp., as quais crescem em águas com pH menor que 4,0 mas conseguem manter o pH no citosol em 7,0, podem assimilar CO_2 por difusão e tem desenvolvido RuBisCOs com $K_m(CO_2)$ de 6 a 7 µmol L^{-1} (UEMURA et al., 1997). CCM envolvem inúmeras mudanças na expressão dos genes que regulam a estrutura da célula, bem como vias alternativas para a assimilação inicial de carbono e transporte (WANG; STESSMAN; SPALDING, 2015).

A aquisição de C_i pode ocorrer com a entrada de CO_2 tanto por difusão, sendo esta por assimilação ativa e direta de HCO_3^-, quanto por CCM baseados no transporte ativo de uma ou mais espécies (HCO_3^- e CO_2), ou ainda pela ação da anidrase carbônica externa. A localização dos transportadores nas células de microalgas não é clara, podendo tanto ser na membrana plasmática quanto no envelope dos cloroplastos (AMOROSO et al., 1998; MORONEY; YNALVEZ, 2007). Existe provavelmente alguma variação na capacidade de cloroplastos de algas de diferentes grupos taxonômicos em assimilar C_i por transporte ativo. A ocorrência desses 3 componentes dos CCM varia entre as espécies de algas e fornecem uma diversidade de mecanismos de aquisição de C_i (MORONEY; YNALVEZ, 2007).

Tem sido demonstrado que algumas proteínas podem agir como transportadores de HCO_3^- e canais de CO_2 na membrana plasmática e na membrana externa dos cloroplastos. Essas proteínas podem mediar o aumento da concentração de C_i, aumentando assim a disponibilidade de CO_2 próximo ao sítio ativo da RuBisCO (MORONEY; YNALVEZ, 2007). Além disso, estudos com a cianobactéria *Synechocystis* sp. PCC6803 e *Chlamydomonas acidophila* mostraram que células que cresceram em condições com luz e pouco CO_2, ou com

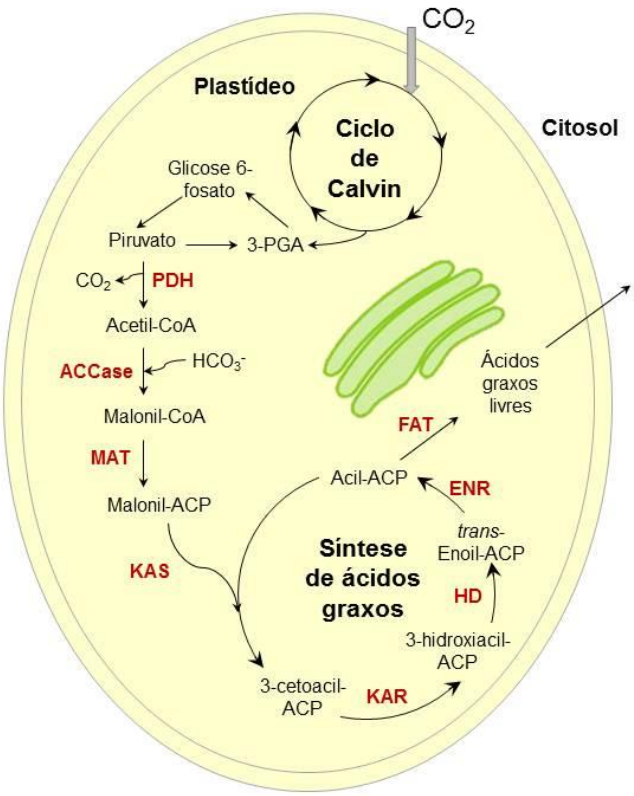
ausência de CO_2, foram capazes de metabolizar C_i mais rapidamente do que células crescidas no escuro nas mesmas condições de disponibilidade de CO_2. Isso sugere a existência de um efeito cooperativo entre luz e sinalização de carbono na modulação da expressão dos genes relacionados aos CCM (MCGINN et al., 2003; SPIJKERMAN, 2011). Resultados similares foram reportados para *C. reinhardtii*, revelando que o decaimento da concentração de C_i não é suficiente para ativar os CCM, e que uma melhora na expressão de genes relacionados aos CCM é alcançada em diferentes intensidades de luz (YAMANO; MIURA; FUKUZAWA, 2008).

A economia de energia (e de possivelmente também nitrogênio e fósforo) para a célula em mecanismos de aquisição de C_i, que necessitam menos RuBisCO por unidade de biomassa para alcançar uma dada taxa de fixação de carbono, pode ser explicada pela economia na síntese de RuBisCO. A eficiência da transferência de energia de excitação do cromóforo que absorveu o fóton para o centro da reação é muito alta. Com a entrada de CO_2 por difusão em concentrações de saturação, o ciclo de redução do carbono fotossintético (PCRC - *photosynthetic carbon reduction cycle*) não geraria fosfoglicolato a partir da atividade da RuBisCO; consequentemente, somente 3 ATPs e 2 NADPH são necessários por CO_2 convertido a carboidrato (RAVEN; BEARDALL; GIORDANO, 2014). No entanto, ainda não há um entendimento completo da rede regulatória total para os CCM.

2.1.3.2 Biossíntese de lipídeos

Os ácidos graxos (FA - *fatty acids*), como parte de moléculas ou agindo individualmente, possuem diversas funções nas células que variam de "blocos de construção" estruturais das membranas celulares a fornecedores de energia e sinalização de moléculas. Os FA nas células derivam de fontes exógenas ou da síntese *de novo*. Em geral, a reação de biossíntese de FA é bem conservada entre os organismos dos diferentes reinos, começando com a formação de malonil-CoA por carboxilação de acetil-CoA e posterior condensação de malonil-CoA com acetil-CoA com liberação de CO_2. Diferentes enzimas, no entanto, evoluíram para alcançar essas semelhanças na via geral entre os diferentes organismos (DE CARVALHO; CARAMUJO, 2018). A Figura 2.2 apresenta a via geral da biossíntese de ácidos graxos em microalgas.

Figura 2.2 Vias metabólicas simplificadas para a biossíntese de ácidos graxos em microalgas. Os metabólitos estão mostrados em preto e as enzimas em vermelho: PDH – complexo piruvato desidrogenase, ACCase – acetil-CoA carboxilase, MAT – malonil-CoA:ACP transacilase, KAS – 3-cetoacil-ACP sintase, KAR – 3-cetoacil-ACP redutase, HD – 3-hidroxiacil-ACP desidratase, ENR – enoil-ACP redutase, FAT – acil-ACP graxo tioesterase

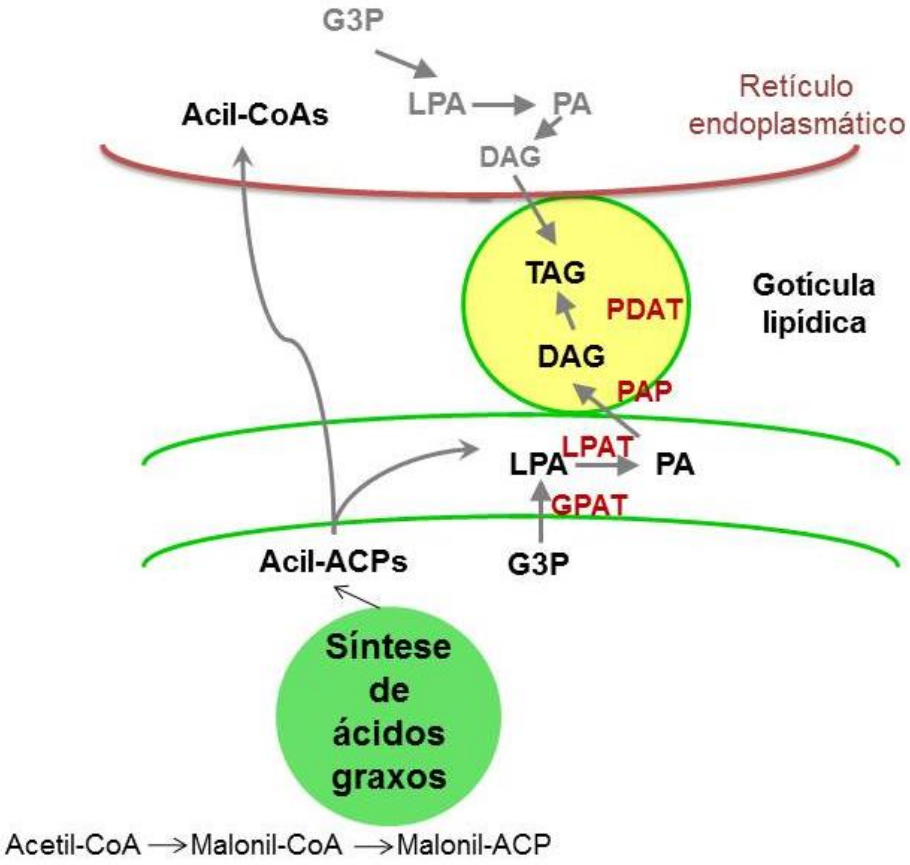


Fonte: Adaptado de RADAKOVITS et al. (2010)

Microalgas fotossintetizantes, heterotróficas e bactérias são consideradas produtores naturais de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA – *poly-unsaturated fatty acids*), ω-3 de cadeia longa (> 20 carbonos), por possuírem as enzimas chave, incluindo dessaturases com terminal metil, necessárias para a sua síntese *de novo*. As plantas são conhecidas por terem capacidades limitadas de elongação para produzir PUFA de cadeia longa, com habilidade para a síntese *de novo* de PUFA com até 18 carbonos (DE CARVALHO; CARAMUJO, 2018). Alguns aspectos da dessaturação e elongação de ácidos graxos são diferentes em microalgas, quando comparadas às plantas. Por exemplo, *Nannochloropsis* spp. contém uma quantidade considerável de ácido eicosapentanóico (EPA, 20:5). Em *Chlamydomonas* spp., diversas dessaturases tem sido caracterizadas por abordagens genéticas avançadas e incluem um gene que codifica uma Δ4-dessaturase associada aos envelopes de plastídeos, o qual está envolvido na síntese de ácido hexadeca-4,7,10,13-tetraenóico (16:4)(LIU; BENNING, 2013).

Muito do conhecimento atual sobre genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo lipídico em organismos fotossintetizantes se baseia nos trabalhos com a planta *Arabidopsis* spp.. No entanto, os modelos com microalgas do gênero *Chlamydomonas* spp. sugeriram uma rede mais simplificada de metabolismo lipídico do que de plantas (LIU; BENNING, 2013). A Figura 2.3 apresenta um esquema simplificado com as principais vias descritas para a síntese de triacilglicerídeos (TAG), lipídeos neutros de armazenamento, na alga verde *Chlamydomonas reinhardtii.*

Figura 2.3 Hipótese simplificada para a biossíntese de TAG na alga verde *C. reinhardtii*. Abreviações: ACP, proteína transportadora de acila; CoA, coenzima A; G3P, glicerol-3-fosfato; GPAT, glicerol-3-fosfato aciltransferase; LPA, ácido lisofostatídico; LPAT, lisofosfolipídeo aciltransferase; PA, ácido fosfatídico; PAP, ácido fosfatídico fosfatase; DAG, diacilglicerol; PDAT, fosfolipídeo:diacilglicerol aciltransferase; TAG, triacilglicerol



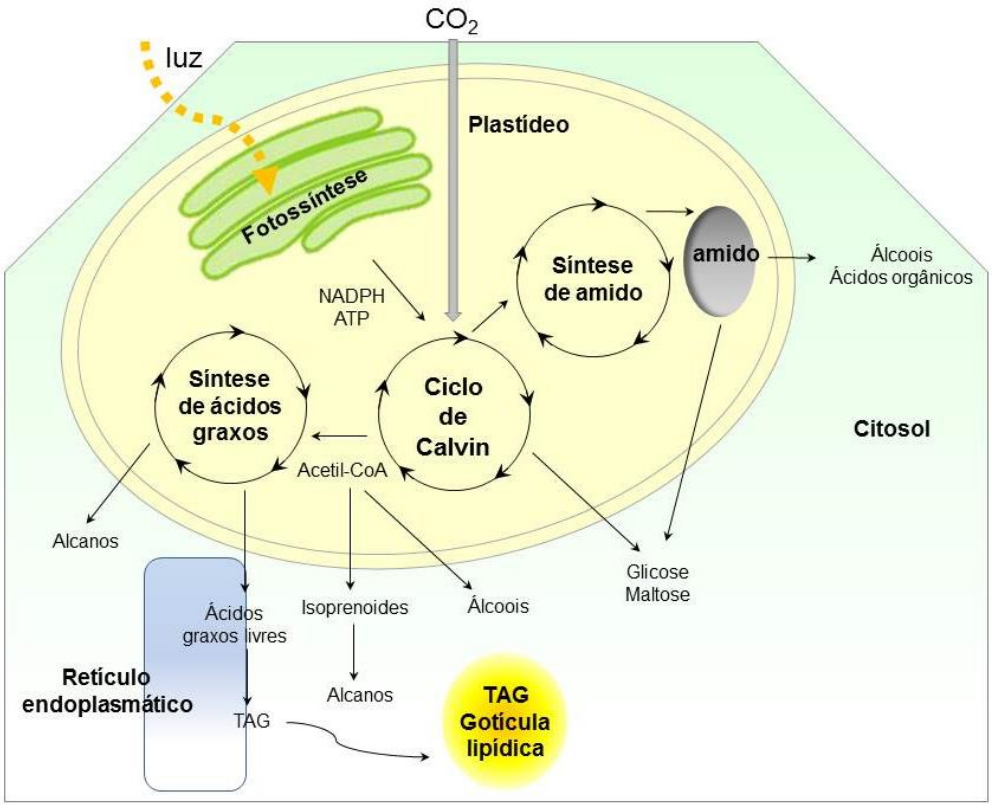
Fonte: adaptado de LIU; BENNING (2013)

Em *Arabidopsis* spp., as enzimas diacilglicerol aciltransferase (DGAT) e fosfolipídeo:diacilglicerol aciltransferase (PDAT) são as principais envolvidas na etapa final da síntese de TAG, e o mesmo provavelmente ocorre também em *Chlamydomonas* spp. (LIU; BENNING, 2013). A formação de TAG geralmente compartilha vias comuns com a síntese

de lipídeos de membrana até a formação de diacil glicerídeos (DAG), conhecida por via Kennedy. Nas plantas superiores, duas vias paralelas que levam à acilação sequencial de um glicerol-3-fosfato (G3P) até a formação de DAG ocorrem no plastídeo e também no retículo endoplasmático (ER). Esses dois conjuntos de reações são acionados pelas enzimas glicerol-3-fosfato aciltransferase (GPAT), lisofosfolipídeo aciltransferase (LPAT) e uma fosfatase do ácido fosfatídico (PAP). A reação de acilação pode ser realizada por duas vias, isto é, reações dependentes de acil-CoA e independentes de acil-CoA. A primeira é catalisada pela diacilglicerol aciltransferase (DGAT), enquanto a segunda é catalisada pela fosfolipídeo:diacilglicerol aciltransferase (PDAT) (GOOLD et al., 2015).

A Figura 2.4 apresenta um esquema resumindo as principais vias metabólicas na formação de reservas de carbono em microalgas.

Figura 2.4 Principais vias metabólicas de microalgas relacionadas à formação de reservas de carbono



Fonte: Adaptado de RADAKOVITS et al. (2010)

A síntese de TAG em microalgas ocorre dentro da célula fotossinteticamente ativa e o acúmulo de TAG é geralmente desencadeado pela exposição a uma situação de estresse para a célula (KHOZIN-GOLDBERG; COHEN, 2011). Nas microalgas existem as gotículas

lipídicas (LD - *lipid droplets*), normalmente presentes em quantidades não maiores do que duas por célula em condições repletas de nutrientes. Tanto o número quanto o tamanho de LD aumentam com a exposição a uma condição de estresse, e os LD podem continuar a aumentar de tamanho à medida que o estresse se prolonga. Um grande acúmulo de LD pode ser desencadeado por falta de nutrientes (N, Fe, S ou P), excesso de luz, hipóxia, aumento da salinidade do meio ou também por tratamento químico (GOOLD et al., 2015).

Dentre os vários gatilhos, o mais estudado foi a resposta à depleção de nitrogênio. Estudos transcriptômicos e metabólicos realizados em células na ausência de nitrogênio (GOOLD et al., 2015) mostraram que a reorientação do metabolismo celular em direção à formação de reservas de carbono (amido e óleos) ocorreu no início da falta de nitrogênio, sendo este efeito acompanhado pela infra-regulação dos genes envolvidos na síntese de proteínas e na fotossíntese. Além da supra-regulação dos genes que codificam enzimas essenciais para a conversão de acetato em ácidos graxos, diversas lipases com maior transcrição também foram observadas, o que sustenta a ideia de que os TAG recém-formados são parcialmente provenientes da síntese *de novo* e parcialmente do remodelamento lipídico da membrana (GOOLD et al., 2015).

Como já foi relatado, sabe-se que TAG e amido podem se acumular após a privação de nitrogênio nas algas, como reservas de carbono. Assim, em termos de engenharia metabólica, foi levantada a hipótese de que a partição de carbono poderia ser afetada pelo bloqueio da via de síntese de amido, levando ao desvio de carbono para a formação de TAG. De fato, foi observado aumento no acúmulo de óleo em mutantes sem amido de *Chlamydomonas* spp. e *Chlorella* spp.. Assim, o fotossintato, o produto final da fotossíntese, pode ser canalizado diretamente para a biossíntese de TAG em algas verdes, como talvez já seja o caso da *Nannochloropsis* spp., que parece não acumular amido. Assim, uma abordagem viável para a engenharia de cepas de algas com alto rendimento de TAG é a eliminação de vias concorrentes de utilização de carbono para maximizar a canalização do fotossintato para a biossíntese de lipídeos (LIU; BENNING, 2013).

2.1.3.3 Biossíntese de carotenoides

Além do acúmulo de TAG, estudos sugerem que a limitação por nitrogênio poderia ser uma condição de estresse capaz de desencadear também o acúmulo carotenoides. A limitação por nitrogênio em *Chlorella zofingiensis* provocou um aumento na produtividade de

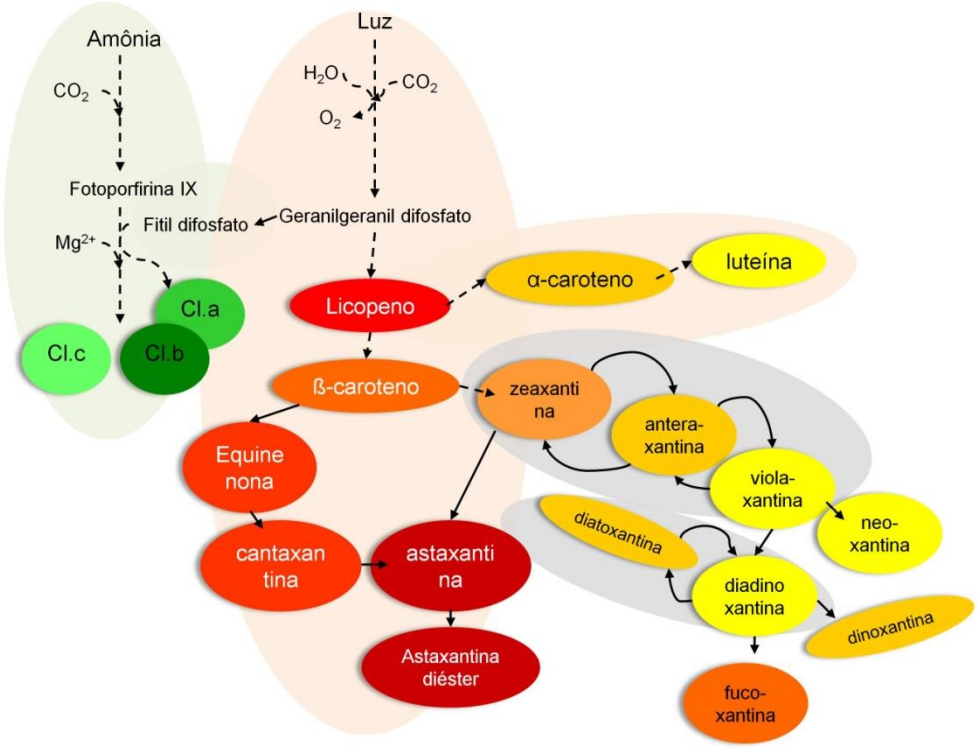
astaxantina maior do que com limitação de outros nutrientes presentes no meio, como fósforo e enxofre (MAO et al., 2018). Outro tipo de condição de estresse é por excesso de luz (EL), a qual está associada à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e à alteração do estado redox, o que poderia induzir a produção de carotenoides e lipídeos. Sun e colaboradores (SUN et al., 2018) estudaram as respostas de diferentes condições de estresse (por ausência de nitrogênio ou EL), na formação de EROs e produtos (carotenoides e lipídeos) em microalgas.

O piruvato é um metabólito central nas vias alternativas de carbono, pois ocupa o local de cruzamento para direcionar o carbono para glicose-6-fosfato, oxaloacetato, malonil-CoA ou geranilgeranil difosfato, que são os precursores de amido, proteína, ácidos graxos e carotenoides, respectivamente. No estudo mencionado (SUN et al., 2018), primeiramente, sob efeitos separados de ausência de nitrogênio ou EL, o teor de amido nas duas condições foi significativamente maior que o de lipídeos. Portanto, o fluxo de carbono foi principalmente direcionado ao amido nessas condições. Após tratamento para eliminar EROs, este preveniu a degradação de proteínas. Portanto, as proteínas podem ser a principal fonte de carbono para a biossíntese de amido sob condições de estresse. Além disso, os efeitos combinados de EL e ausência de nitrogênio aumentaram ainda mais o piruvato, mostrando que a disponibilidade de carbono foi melhorada possivelmente pelo alto nível de EROs, e o fluxo de carbono foi redirecionado para carotenoides e lipídeos a partir de amido, uma vez que as condições de estresse se intensificaram (SUN et al., 2018).

O efeito de EL tem o potencial de promover a biossíntese de carotenoides, sugerindo que o aumento de EROs nessa condição favorece a conversão do precursor de pigmentos em carotenoides em detrimento de clorofila (SUN et al., 2018). Isso pode ser explicado pelo fato de que tanto os carotenoides quanto a clorofila possuem um precursor comum, o geranilgeranil difosato.

Os carotenoides são moléculas com aproximadamente de 40 a 50 carbonos, altamente insaturadas, e compostas tanto inteiramente de carbono e hidrogênio (carotenos) ou de carbono, hidrogênio e oxigênio (xantofilas) (KOPEC et al., 2012). A Figura 2.5 apresenta um esquema simplificado das vias de biossíntese de pigmentos em microalgas

Figura 2.5 Esquema simplificado das vias de biossíntese de pigmentos em microalgas e cianobactérias. As setas sólidas representam conversões únicas, enquanto as setas tracejadas representam reações que foram aglutinadas e simplificadas



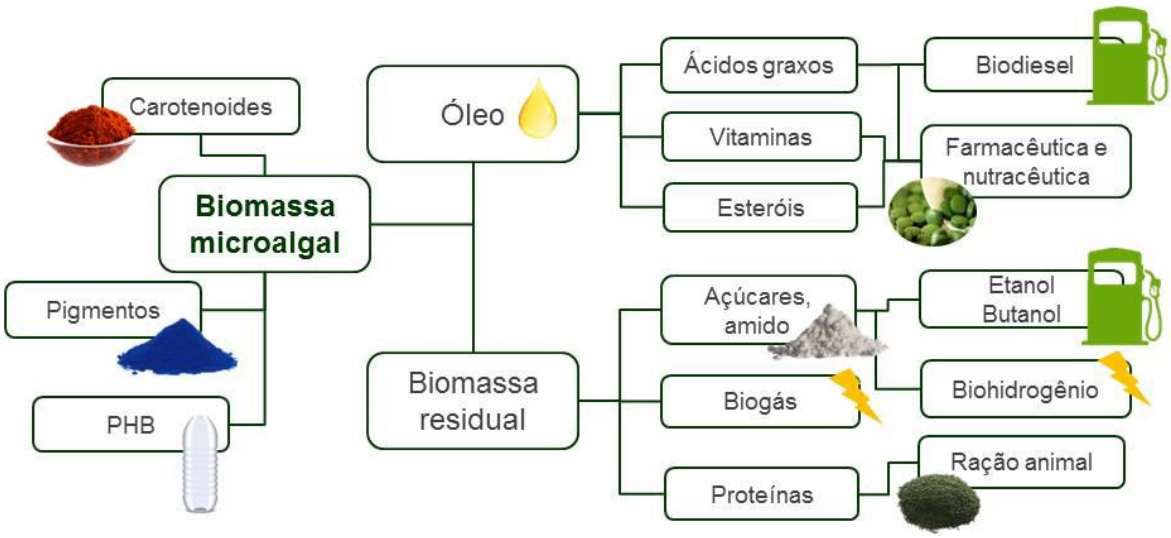
Fonte: Adaptado de MULDERS et al. (2014)

A condensação de duas moléculas de geranilgeranil difosfato seguida de uma reação de isomerização e a introdução de 4 ligações duplas formam o carotenoide licopeno. Após a formação do licopeno, as vias sintéticas se separam em duas ramificações. Uma ramificação leva à produção da luteína, a qual em algumas espécies de microalgas, incluindo a *Chlamydomonas reinhardti*, pode ainda ser convertida a loroxantina. A outra ramificação leva à produção de β-caroteno, o qual também representa um ponto de ramificação. A partir do β-caroteno, uma ramificação leva à geração da astaxantina via duas reações de oxidação e duas de hidroxilação. Este carotenoide hidrofóbico pode ser uma ou duas vezes esterificado com um ácido graxo, levando à formação de mono- ou diéster astaxantina. A outra ramificação do β-caroteno leva à geração de zeaxantina, sendo que alguns autores também propuseram a conversão de zeaxantina a astaxantina na microalga *Chlorella zofingiensis*. Zeaxantina é parte do ciclo da violaxantina, também referido como o ciclo das xantofilas. Zeaxantina é transformada em anteraxantina e subsequentemente em violaxantina, seguindo duas reações de epoxidação. Violaxantina também pode ser isomerizada, transformando-se em neoxantina (MULDERS et al., 2014).

2.1.4 Aplicações industriais

Os primeiros estudos com microalgas provavelmente datam do estabelecimento de uma cultura de *Chlorella* sp., por Beijerinck em 1890 (BEIJERINCK, 1890), que tem sido o gênero com aplicação comercial mais antiga desses microrganismos e, ainda hoje, o mais disponível (TOMASELLI, 2004). As primeiras tentativas de se desenvolver produtos comerciais a partir de microalgas foram reportadas na década de 40 (HARDER; VON WITSCH, 1942) e consistiram de lipídeos, posteriormente na década de 60 de carotenoides (KATHREIN, 1964), e proteínas na década de 70 (SOEDER; PABST, 1970); (VENKATARAMAN; BECKER; SHAMALA, 1977). As primeiras microalgas comercializadas foram *Chlorella* spp. e *Spirulina* spp. como "comida saudável" no Japão (no final da década de 50), Twaian e México (ambos na década de 80) (BOROWITZKA, 2013). O interesse nesta classe de microrganismos provém do seu potencial uso para produzir produtos de alto valor, fazendo a fixação de carbono utilizando luz solar. Isso une três aspectos de interesse: o ambiental, o biotecnológico e o econômico. A Figura 2.6 apresenta resumidamente os principais produtos produzidos a partir da biomassa microalgal.

Figura 2.6 Principais produtos produzidos a partir da biomassa microalgal



Fonte: O autor (baseado em MACHADO; ATSUMI, (2012), BOROWITZKA (2013) e HERRMANN et al. (2016))

2.1.4.1 Produtos de alto valor produzidos por microalgas

Microalgas têm sido utilizadas para transformar CO_2 em uma grande variedade de metabólitos industrialmente interessantes, tais como carotenoides, vitaminas, ficobilinas,

ácidos graxos, esteróis, poli-hidroxialcanoatos, polissacarídeos e outros compostos biologicamente ativos para aplicações farmacêuticas e nutracêuticas (BOROWITZKA, 2013).

Dentre os carotenoides, β-caroteno foi primeiramente produzido por *Dunaliella salina*, já que esta cresce em altas concentrações salinas, reduzindo o risco de contaminação, além de possuir o maior teor de β-caroteno do que qualquer outro organismo. Outro tipo de carotenoide, produzido pela alga verde *Haematococcus pluvialis* proveniente de água doce, é a astaxantina, principalmente para o uso como aditivo alimentar para pigmentação da carne nos cultivos de salmão e truta. Ficobilinas são pigmentos naturais hidrossolúveis somente produzidos por algas e incluem ficocianina, ficoeritrina e aloficocianina. Estes pigmentos podem ser utilizados na indústria alimentícia, cosmética, como marcadores fluorescentes em citometria de fluxo e imunologia, além de outros usos terapêuticos como compostos fotossensíveis em terapia fotodinâmica para tratamento de câncer (BOROWITZKA, 2013).

Os lipídeos de microalgas constituem uma fonte rica em ácidos graxos, tais como ácido linoleico, ácido araquidônico, ácido eicosapentanóico (EPA) e ácido docosahexanóico (DHA). Estes possuem importantes aplicações biotecnológicas, especialmente na alimentação de animais, considerando que o óleo de algas é comparável com o proveniente de peixes. Ainda, microalgas produzem uma variedade de fitoesteróis, dependendo da espécie e condições de crescimento, os quais apresentam aplicações tanto na indústria farmacêutica quanto na alimentícia. Cianobactérias, tais como *Spirulina* sp. e *Synechocystis* sp., também têm sido testadas para produzir poli-3-hidroxibutirato (P3HB) sob condições de crescimento mixotróficas, apesar de que em quantidades menores do que já reportado para bactérias (BOROWITZKA, 2013). Todas essas potenciais aplicações biotecnológicas demonstram um cenário favorável para produzir produtos de alto valor a partir de microalgas, ainda não completamente explorado.

2.1.4.2 Biocombustíveis

A produção de biocombustíveis a partir da biomassa de microalgas tem sido amplamente estudada (LIAO et al., 2016), particularmente a produção de biodiesel (CHISTI, 2007). O artigo de CHISTI (2007) representou um marco nas pesquisas com microalgas e cultivos em larga escala. O autor afirmou que “o biodiesel microalgal é o único biodiesel renovável com o potencial de substituir completamente os combustíveis líquidos derivados do petróleo para transporte”. Apesar de ser ambientalmente favorável, considerando que o

biodiesel é um combustível obtido por fontes renováveis, a produção de biodiesel por microalgas é somente economicamente viável quando associada com a co-produção de produtos de alto valor utilizando outros constituintes da biomassa microalgal (Figura 2.6) (BOROWITZKA, 2013). Isto se dá devido aos custos relativamente altos do cultivo de microalgas e dos processos de separação, como secagem e extração de lipídeos (ZHEN et al., 2016).

Somente para fins comparativos, o preço do diesel de petróleo em 2006, livre de impostos, foi $0,49/L. Biodiesel de óleo de palma custou aproximamente $0,66/L, enquanto o menor valor projetado para o custo do biodiesel de microalgas foi $2,80/L (CHISTI, 2007). Apesar dos números parecerem desatualizados, eles ainda fornecem uma boa estimativa. Estudos mais recentes mostraram que o preço por litro de biocombustíveis de microalgas ainda é maior do que os combustíveis convencionais provenientes do petróleo (CHOWDHURY; LOGANATHAN, 2019). Ainda não foi reportada produção industrial de biodiesel por microrganismos, isso inclui outros microrganismos oleoginosos além de microalgas, como as leveduras. Uma estimativa para a produção de óleos por leveduras forneceu um valor de US$3.000 por tonelada, ou US$ 3/kg (SITEPU et al., 2014).

Considerando os processos após o cultivo de microalgas para utilização do conteúdo lipídico, a cultura deve ser desidratada, depois os lipídeos são extraídos e purificados. O processo de desidratação demanda alta energia e compreende floculação, centrifugação e filtração. Os processos de separação para recuperação dos lipídeos são basicamente extração do óleo, o que é normalmente considerado simples, apesar de ser crítico na produtividade de lipídeos de microalgas. Métodos tradicionais consistem no uso de solventes orgânicos tais como hexano, etanol, clorofórmio/metanol (2/1 v/v) e hexano/isopropanol (3/2 v/v), diretamente sobre a massa seca, apesar de terem sido reportados métodos de extração com solvente úmido. Após a extração, três fases são geradas e devem ser separadas: células de microalgas, fase aquosa e fase orgânica (que contém os lipídeos). Outros métodos envolvem a utilização de enzimas para melhorar a extração ou extração da biomassa seca por CO_2 supercrítico. O último passo após a extração é o fracionamento para separar ácidos graxos de alto valor e futuras reações para produzir biocombustíveis (POSADA et al., 2016).

A biomassa de microalgas após extração dos lipídeos ainda é rica em carboidratos e proteínas, que podem servir de matéria-prima para cultivos de microrganismos e produção de outros biocombustíveis. Os carboidratos de microalgas apresentam vantagens frente a matérias-primas lignocelulósicas, pois não estão associados à lignina, estando prontamente

disponíveis para produção de etanol ou butanol (GAO; ORR; REHMANN, 2016); (MACHADO; ATSUMI, 2012). Outra abordagem para produção de combustíveis renováveis é a produção de biogás (O_2, N_2, CH_4, H_2 e CO_2) com alto teor de metano, através da digestão anaeróbica da torta contendo carboidratos e proteínas, ou co-digestão com outras matérias-primas, como resíduos de alimentos. De fato, a mono-digestão é difícil devido à liberação de quantidades substanciais de amônia, formada através do nitrogênio das proteínas, o que basifica o pH e prejudica a ação das bactérias acidogênicas e metanogênicas. Dessa forma, microalgas cuja composição química apresente a razão C/N entre 20 e 30 possuem maior potencial metanogênico (HERRMANN et al., 2016). Biohidrogênio também pode ser produzido por fermentação dos carboidratos de microalgas em condições anaeróbicas pelas enzimas hidrogenases (KUMAR et al., 2016).

2.1.4.3 Microalgas na separação e melhoramento de gás natural e biogás

Outra importante aplicação de microalgas é na separação e melhoramento de gás natural e biogás, devido à capacidade delas de consumir seletivamente CO_2. A concentração de CO_2 no gás natural, o qual é majoritariamente composto por metano, é em torno de 8%, porém pode alcançar níveis muito maiores, de 40 a 50% (BALCOMBE et al., 2015); no biogás, este valor é em torno de 30 a 40% (MEIER et al., 2015). No entanto, para ser considerado um combustível potencial, o gás deve conter no mínimo 90% de metano, o que requer métodos de separação de CO_2. Métodos convencionais consistem em absorção, adsorção, filtração por membranas, separação criogênica, entre outros (KURAMOCHI et al., 2012; MEIER et al., 2015). Pode ser interessante uma ação combinada desses processos com a utilização de microalgas, a fim de alcançar a maior remoção de CO_2 possível.

Para separação de gases, é importante estudar a toxicidade dos gases e o quanto microalgas são suscetíveis a crescerem em atmosfera rica em metano. Estudos focados nesta abordagem não reportaram nenhum sinal de toxicidade ou inibição por esse gás, embora a taxa de crescimento das microalgas tenha sido reduzida (MEIER et al., 2015). Outros gases nocivos que podem eventualmente estar presentes, dependendo da composição, são SO_x e NO_x, os quais normalmente inibem o crescimento das microalgas (NEGORO et al., 1991), porém podem ser removidos com equipamentos adequados (WILSON et al., 2016).

2.1.5 Cultivo de microalgas

2.1.5.1 Aspectos gerais

O crescimento de microalgas depende de uma série de fatores, como luz, pH e temperatura adequados, macronutrientes (C, N, P, O, H, Ca, Mg, S e K) e micronutrientes (Mn, Mo, Fe, Cu e Zn). O carbono é considerado o mais importante macronutriente, já que contribui com 50% da biomassa das microalgas (constituinte de proteínas, carboidratos, vitaminas e lipídeos). A principal fonte de C_i é o CO_2, porém outras fontes de carbono, tais como glicose, acetato e glicerol, podem ser utilizadas por microalgas heterotróficas e/ou mixotróficas, como previamente relatado (TOMASELLI, 2004).

Exceto pela fonte de carbono, a luz é o principal fator que influencia o crescimento de organismos fotossintetizantes, representando a principal fonte de energia. A mais abundante e sustentável fonte de energia na Terra é o Sol. Mais de 3.800 zettajoules (1 zettajoule = $1x10^{21}$ Joules) de luz solar são absorvidos pela superfície e atmosfera da Terra anualmente. Cerca de 0,05% dessa energia são capturados em biomassa, a cada ano, pelo processo de fotossíntese (SAYRE, 2010). Porém, a alta exposição à luz pode aumentar a produção de EROs, podendo causar danos estruturais ou originar fotoinibição, que consiste na redução da capacidade fotossintética das microalgas, levando ao branqueamento e à morte celular (SOLETTO et al., 2005).

O uso eficiente da luz é um dos aspectos que pode melhorar ou reduzir a produção de biomassa de microalgas e, portanto, pode ser uma limitação do processo. Luz artificial é comumente utilizada nos experimentos de pesquisa em microalgas, apesar de nem todos os comprimentos de onda serem realmente absorvidos pela clorofila. Os LEDs (*light emitting diodes*) têm sido considerados a mais apropriada fonte de luz para o crescimento de microalgas devido ao baixo consumo de energia, faixa estreita de comprimentos de onda e controle dos comprimentos de ondas emitidos e da intensidade da luz. Dos comprimentos de onda avaliados, a luz vermelha apresentou os melhores resultados. Considerando as intensidades, somente a faixa moderada (entre 400 e 1.000 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$) é considerada apropriada para o crescimento de microalgas, porém esse parâmetro pode variar de acordo com a espécie. A sugestão é de se aumentar a intensidade da luz progressivamente de acordo com as diferentes fases de crescimento (YAN et al., 2016).

A temperatura ótima é uma importante variável no cultivo de microalgas. A elevação da temperatura pode aumentar a produção de biomassa até certo nível no qual o crescimento

começa a ser inibido pela inativação de proteínas (MAHBOOB et al., 2012). Uma faixa adequada de temperatura varia de 20 a 32°C, dependendo da espécie.

A agitação deve ser considerada para promover uma exposição homogênea das células à luz, aumentando a disponibilidade de nutrientes por mantê-las em suspensão e evitando, assim, a sedimentação das microalgas. A não agitação resultaria na exposição somente das primeiras camadas, sendo as camadas subsequentes sub-expostas (MONTEIRO; LUCHESE; ABSHER, 2010).

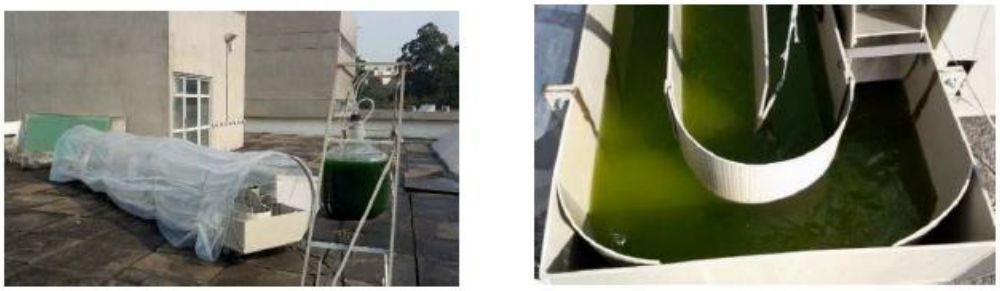
O pH ideal para a maioria das espécies varia de 5 a 9. No entanto, muitas crescem em condições alcalinas, variando de 7 para as microalgas de água doce a 8 em água salgada. Nessas condições de pH, quase todo carbono disponível está na forma de HCO_3^-, e a porcentagem de CO_2 é muito baixa (menor que 1%) quando em equilíbrio com a atmosfera (COLMAN et al., 2002). A elevação gradual do pH no meio de cultura indica o crescimento das microalgas, pois a disponibilidade de C_i diminui devido ao seu consumo para promover o crescimento celular (BERENGUEL et al., 2004).

2.1.5.2 Cultivo de microalgas em fotobiorreatores

A ideia de se cultivar algas em grande quantidade foi concebida em 1952, no Instituto Carnegie em Washington (EUA). Na década de 1960, pesquisadores japoneses experimentaram um cultivo aberto com sistema de circulação, utilizando uma lagoa aberta na qual uma suspensão de algas circulou através de uma série de tubos móveis para a injeção de meio de cultura fresco (BOROWITZKA, 2013). A tecnologia mais empregada para cultivo de microalgas em larga escala, ainda, é o uso de lagoas abertas (Figuras 2.7 e 2.8). Apesar de serem relativamente baratos e fáceis de colocar em operação, estes biorreatores oferecem maior risco de contaminação, problemas como menor taxa de transferência de massa gás-líquido, evaporação da água, difícil agitação e pouco controle da temperatura, além de serem necessárias grandes áreas para sua implementação. Esses fatores fazem desse reator um sistema de cultivo não apropriado para produção de fármacos e ingredientes para a indústria alimentícia (GUPTA; LEE; CHOI, 2015; AMINI et al., 2016). Além disso, a concentração de biomassa nesses sistemas é normalmente baixa (0,5 a 1,0 kg m^{-3}) (HUESEMANN et al., 2016), o que requer que um grande volume de água seja removido na recuperação da biomassa, encarecendo o processo.

Trabalhos realizados no nosso grupo de pesquisa (DA SILVEIRA, 2015) consideraram o cultivo de microalgas em diferentes abordagens. Foi desenvolvido um modelo matemático de crescimento de uma espécie conhecida de microalga (*Chlorella vulgaris*), e a sua validação com dados experimentais obtidos na operação em condições realistas de reator piloto tipo lagoa aberta com capacidade máxima de 1.000 L (Figura 2.7). Considerou-se condições não-axênicas, isto é, na presença de outras espécies de microalgas e de bactérias, pois esta seria a condição de um reator real em escala industrial. O sistema foi deixado em equilíbrio, sendo eventualmente evoluído para um tipo de ecossistema, e considerou-se a pirólise como processo final para transformação da biomassa. Utilizou-se processos simples objetivando os menores custos de operação e capital possíveis.

Figura 2.7 Reator piloto tipo lagoa aberta com capacidade de 1.000 L para cultivo de *Chlorella vulgaris*

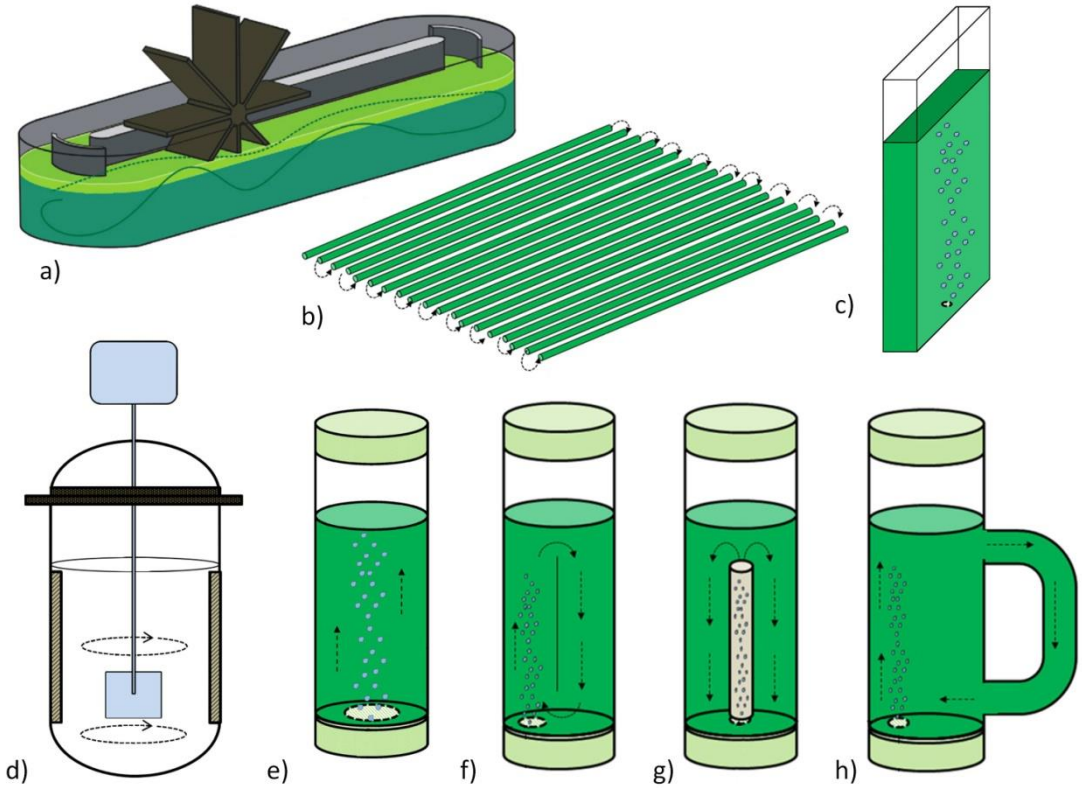


Fonte: DA SILVEIRA (2015)

A simulação utilizando um modelo matemático que levou em consideração os fatores intensidade luminosa e temperatura, em reator aberto, produziu um modelo que representou de forma satisfatória o processo de crescimento. Entretanto, verificou-se que a evaporação da água ao longo do processo provoca uma significativa redução de volume, causando por si só um aumento na concentração. Isto levou a introduzir no modelo o efeito da evaporação da água como um fator importante no processo. Os dados experimentais quando comparados com a simulação apresentaram dispersão, o que era esperado nas condições reais de processo. Entretanto, as simulações realizadas mostraram coerência entre os fatores ambientais (intensidade luminosa e temperatura), podendo-se empregar o modelo a reator de raias em condições ambientais variadas.

Na tentativa de superar as desvantagens do cultivo aberto, existem diversos fotobiorreatores fechados de variadas formas e volumes. A Figura 2.8 ilustra os principais tipos de fotobiorreatores para cultivo de microalgas.

Figura 2.8 Fotobiorreatores para cultivo de microalgas: a) lagoa aberta; b) tubular horizontal; c) painel; d) tanque agitado; e) coluna de bolhas; f) *airlift* com loop interno; g) *airlift* com loop interno concêntrico; h) *airlift* com loop externo



Fonte: Adaptado de CHEN et al. (2016) e GUPTA; LEE; CHOI (2015)

Apesar dos reatores fechados reduzirem o risco de contaminação e possibilitarem a produção de produtos para fins farmacêuticos e alimentícios, algumas desvantagens ainda fazem esse tipo de biorreator economicamente inviável para produtos finais de baixo custo. Para volumes maiores que 100 L, há limitação da difusão de luz, agravada também pela formação de biofilme na superfície (GUPTA; LEE; CHOI, 2015).

Com base na superfície iluminada, os fotobiorreatores são categorizados em planos, tubulares ou em coluna. Com base no modo de fluxo de líquido, eles podem ser agrupados em tipo agitado, coluna de bolhas ou *airlift* (Figura 2.8). Idealmente, os fotobiorreatores devem ter grande superfície transparente, mínimo de partes não iluminadas, altas taxas de transferência de massa e deve atingir elevado crescimento de biomassa (GUPTA; LEE; CHOI, 2015).

Os tanques agitados são os reatores convencionais, nos quais a agitação é feita por um impelidor, cujas funções são homogeneizar a mistura e garantir a transferência de calor e massa, incluindo a aeração. Dessa forma, a dispersão da luz é alta, já que há pouca incidência

de zonas escuras no interior do reator, consequentemente a produção de biomassa também é alta. No entanto, a agitação mecânica gera muito mais calor do que o borbulhamento de gases, além dos custos de operação serem mais elevados (GUPTA; LEE; CHOI, 2015). Uma das vantagens deste reator é a possibilidade de variar o tipo de operação do processo, podendo ser em batelada, batelada alimentada ou em modo contínuo. O modo de operação contínuo é particularmente interessante devido ao constante suprimento de nutrientes. No entanto, a configuração deve ser apropriada para garantir a condição de estado contínuo e evitar a lavagem das células ou contaminação. Um dos estudos nesta área propôs o uso de membranas de troca iônica para o contínuo suprimento de nutrientes, o que proporcionou aumento na produção de biomassa (FU et al., 2016).

Dentre os fotobiorreatores propostos, o tubular é um dos mais apropriados para o cultivo em ambientes externos, principalmente pela elevada área de superfície de iluminação. Dos reatores tubulares, a coluna de bolhas é uma alternativa ao tanque agitado, sendo a agitação e a mistura promovidas pelo borbulhamento de gás. O desenho é simples, com a altura maior do que duas vezes o diâmetro. Como a luz é provida externamente, a eficiência fotossintética depende principalmente da vazão do gás, a qual depende do ciclo claro/escuro, com o líquido sendo circulado regularmente da zona central escura para a zona mais externa de acordo com a vazão do gás (GUPTA; LEE; CHOI, 2015).

O reator *airlift* se difere da coluna de bolhas pela separação física das duas zonas interconectadas (correntes que sobem e descem). O gás é borbulhado na corrente ascendente, resultando na elevação das bolhas, que pela diminuição da densidade do fluido faz com que este se mova para cima. Como as bolhas se desprendem do líquido no topo da coluna, o líquido mais pesado é naturalmente recirculado para baixo, promovendo sempre um fluxo de líquido baseado nas diferenças de densidade. Isso faz com que a eficiência de mistura seja melhor do que na coluna de bolhas (GUPTA; LEE; CHOI, 2015).

Dos reatores tubulares, o mais popular e relativamente fácil de escalonar em ambientes abertos é o tubular horizontal. Estes reatores são constituídos por tubos transparentes, de vidro ou plástico, arranjados de diversas maneiras de modo a maximizar a captura da luz solar, sendo a circulação das algas promovida por bombas ou por sistema de bolhas (ILUZ; ABU-GHOSH, 2016). Normalmente, esses tubos possuem diâmetros de 10 a 60 mm e comprimentos de até 100 m (GUPTA; LEE; CHOI, 2015). Apesar das diversas vantagens, o fenômeno de fotoinibição é muito comum, e tubos muito longos são caracterizados por gradientes de O_2 e CO_2 ao longo dos mesmos. Uma nova adaptação ao tradicional

fotobiorreator tubular foi empregada com simples ajustes para gerar ciclos de alta/baixa iluminação (efeito de luz combinada/flutuante) para aumentar significativamente, acima de 55%, o crescimento de microalgas (ILUZ; ABU-GHOSH, 2016). Ainda, a produção em larga escala requer um sistema de refrigeração eficiente devido a alta relação área superficial e volume, que tende a superaquecer o sistema (GUPTA; LEE; CHOI, 2015).

Outra configuração são os reatores em painel, os quais possuem geometria simples e reduzem a profundidade do caminho da luz na superfície. A principal característica é a alta razão entre área superficial e volume e ausência de meios mecânicos para a circulação das células. Contudo, este sistema é mais utilizado para cultivos em pequena escala ou em pesquisa, pela necessidade de diversos compartimentos e materiais de suporte, dificuldade no controle da temperatura e alguns problemas associados ao estresse hidrodinâmico resultante da aeração (GUPTA; LEE; CHOI, 2015).

DA CRUZ e DO NASCIMENTO (2012) estudaram os aspectos de engenharia e viabilidade técnica, viabilidade econômica e os índices de sustentabilidade do processo de cultivo empregando microalgas e cianobactérias para a produção de biomassa e captura de CO_2. A metodologia de análise baseou-se em modelo matemático para o crescimento de microalgas e cianobactérias, acoplado com balanços de massa e energia e obtendo-se a avaliação econômica e análise emergética. Considerou-se no estudo o cultivo da microalga *Spirulina platensis* em tanque aberto de 500 hectares, e a venda do óleo extraído, por extração com hexano, visando a produção de biodiesel, e a biomassa separada. Foram identificados e discutidos alguns pontos que merecem destaque para o cultivo de microalgas em larga escala. Um deles é o principal custo de operação, a aquisição de matérias-primas, nutrientes, para o meio de cultura, o que corresponde a 30% dos custos totais de operação. A exploração de fontes alternativas de nutrientes (como água do mar ou salina, efluentes agroindustriais), a utilização de microrganismos com menor demanda de nutrientes inorgânicos ou ainda a utilização de cianobactérias fixadoras de nitrogênio deve ser uma prioridade de pesquisa para aumento da viabilidade econômica do processo. A análise emergética mostrou que a elevada demanda de energia (eletricidade e gás natural), os custos de operação (compras externas, serviços, manutenção) e as perdas do solvente utilizado na extração são os maiores obstáculos para a sustentabilidade do sistema.

CAPÍTULO 3

PRÉ-SELEÇÃO, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MICROALGAS TOLERANTES A CO_2

3.1 INTRODUÇÃO

O processo de isolamento é necessário para se obter culturas puras e constitui a primeira etapa na seleção de linhagens de microalgas (PACHIAPPAN et al., 2015). O isolamento baseado nas técnicas tradicionais, tais como o plaqueamento e a diluição seriada a partir da amostra original, é laborioso, consome um tempo considerável, porém o resultado normalmente leva a uma cultura pura. Outra abordagem em laboratório inclui o enriquecimento de algumas linhagens de microalgas a partir da adição de nutrientes específicos para o seu crescimento, favorecendo o crescimento de uma linhagem particular (DUONG et al., 2012). Por exemplo, linhagens flageladas podem ser cultivadas com meio Walne (THI; SIVALOGANATHAN; OBBARD, 2011). A própria textura do meio também pode ser um fator de seleção. Fitoflagelados não crescem em meio sólido devido à impossibilidade de mobilidade, necessitando de meio líquido ou semi-sólido (LUBIANA, 2013).

Algumas linhagens podem ser selecionadas por apresentarem propriedades particulares, o que pode ocorrer, por exemplo, com adição de antibiótico e fungicida, selecionando as espécies resistentes (PARK et al., 2015). Culturas contendo espécies sensíveis a antibióticos podem ser descontaminadas, além dos métodos já citados, por filtração a vácuo, utilizando-se uma membrana permeável a microrganismos menores do que o tamanho das microalgas, passando as bactérias para o filtrado e retendo as microalgas no filtro (KATIVU et al., 2012). Métodos de lavagem e centrifugação da amostra original podem ser utilizados para o isolamento de organismos maiores (PERUMAL et al., 2012).

Além das técnicas tradicionais, existem também métodos automatizados, tais como a citometria de fluxo “cell sorting”. Esta técnica é uma ferramenta útil para facilitar o rápido e eficiente isolamento de linhagens de microalgas para obtenção de cultura axênica. Microalgas possuem diferentes pigmentos fotossintéticos, os quais emitem autofluorescência (THI;

SIVALOGANATHAN; OBBARD, 2011). Esta técnica se baseia nas propriedades de autofluorescência da clorofila para distinguir espécies de microalgas, tais como diatomáceas, dinoflagelados e fitoplânctons procariotos. Apesar de vantajosa, principalmente considerando grandes quantidades de amostras, os métodos tradicionais, para a maioria dos casos, ainda são igualmente efetivos e menos custosos (DUONG et al., 2012). É importante ressaltar, e é o que normalmente ocorre, que mais de uma técnica, ou a maioria delas, pode ser utilizada a fim de se obter o isolamento das espécies.

Neste trabalho, microalgas tolerantes a CO_2 foram isoladas de mangues, e esse processo foi essencial para o desenvolvimento de todo o trabalho. Este capítulo irá abordar a escolha dos locais de amostragem para bioprospecção de microalgas, os materiais e técnicas utilizados para isolamento e identificação das espécies e os resultados e conclusões desse estudo.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Bioprospecção e amostragem

Para a bioprospecção de microalgas tolerantes a altas concentrações de CO_2, amostras de solo, sedimentos e líquido da superfície foram coletadas de três locais diferentes (L1, L2 e L3), em mangues nas regiões de Guarujá e Cubatão, municípios da Baixada Santista (Figura 3.1). A escolha dos locais de amostragem decorreu da hipótese de altos níveis de CO_2 e CH_4 nesses locais, devido à decomposição de árvores caídas, folhas e matéria orgânica. As amostras foram coletadas no mês de novembro de 2016, pelo pesquisador Dr. Bruno Karolski do Centro de Pesquisas em Meio Ambiente (CEPEMA), diretamente em tubos Falcon de 50 mL ou com auxílio de uma colher de metal, e foram mantidas à temperatura ambiente até a chegada ao laboratório. O processamento das amostras foi feito assim que possível, a fim de preservar as espécies ali presentes e aumentar as chances de encontrar diferentes microrganismos.

Figura.3.1 Imagem de satélite dos locais de amostragem próximos às costas de Santos e Guarujá

Fonte: Google Earth

3.2.2 Enriquecimento e pré-seleção sob 30% de CO_2

Volumes de 1 mL de cada amostra, ou uma alçada para as de sedimentos, foram adicionados em tubos de ensaio estéreis contendo 9 mL de meio de cultura sintético WC (Tabela 3.1) (ANDERSEN et al., 2004). Os tubos com as amostras de cada local receberam a seguinte denominação: L para amostras coletadas do líquido na superfície, SL para amostras do líquido submerso com sedimentos e Sed para as amostras de sedimentos. A numeração refere-se aos diferentes locais (1 e 2 para as amostras coletadas próximas a Guarujá, e 3 para as amostras coletadas na região de Cubatão) e as letras (A, B e C) às triplicatas da mesma amostra inicial (Tabela 3.2). Os 15 tubos inoculados foram alocados em incubadora com temperatura controlada a 28°C e sistema com iluminação por LED na faixa 25 µmol fótons $s^{-1}m^{-2}$, com controle de fotoperíodo 14h/10h claro/escuro. As microalgas crescidas nos tubos foram repicadas a cada 30 dias, transferindo 1 mL para outro tubo contendo meio fresco. Esta etapa consistiu no enriquecimento, até a observação qualitativa de rápido crescimento nos tubos.

Tabela 3.1 Composição do meio de cultura sintético WC

Meio sintético WC			
Componente	**Solução Estoque ($g\ L^{-1}$ de H_2O)**	**Volume (mL)**	**Concentração final no meio ($mol\ L^{-1}$)**
$NaNO_3$	85,01	1	$1{,}00x10^{-3}$
$CaCl_2.2H_2O$	36,76	1	$2{,}50x10^{-4}$
$MgSO_4.7\ H_2O$	36,97	1	$1{,}50x10^{-4}$
$NaHCO_3$	12,60	1	$1{,}50x10^{-4}$
$Na_2SiO_3.9\ H_2O$	28,42	1	$1{,}00x10^{-4}$
K_2HPO_2	8,71	1	$5{,}00x10^{-5}$
Traços de Metais	-	1	$5{,}00x10^{-5}$
Solução de metais traços			
Componente	**1ª Solução Estoque ($g\ L^{-1}$ de H_2O)**	**Quantidade usada**	**Concentração final no meio ($mol\ L^{-1}$)**
$NaEDTA.2H_2O$	-	4,36 g	$1{,}17x10^{-5}$
$FeCl_3.6\ H_2O$	-	3,15 g	$1{,}17x10^{-5}$
$CuSO_4.5\ H_2O$	10,0	1 mL	$4{,}01x10^{-8}$
$ZnSO_4.7\ H_2O$	22,0	1 mL	$7{,}65x10^{-8}$
$CoCl_2.6\ H_2O$	10,0	1 mL	$4{,}20x10^{-8}$
$MnCl_2.4\ H_2O$	180,0	1 mL	$9{,}10x10^{-7}$
$Na_2MoO_4.2\ H_2O$	6,0	1 mL	$2{,}48x10^{-8}$
H_3BO_3	-	1,0 g	$1{,}62x10^{-5}$

Fonte: ANDERSEN et al. (2004)

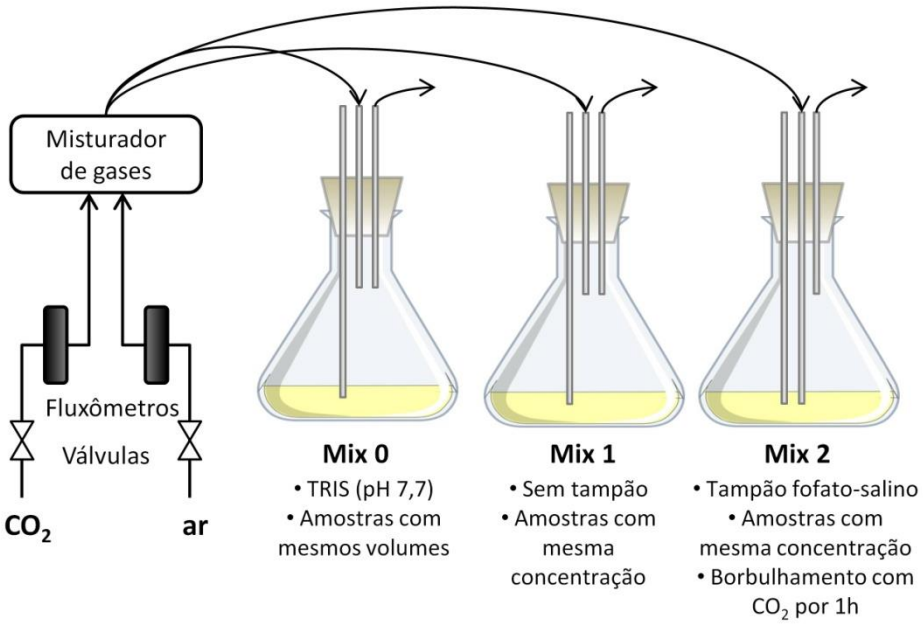
Tabela 3.2 Nomenclatura das amostras coletadas para crescimento de microalgas

Local 1	Líquido	**L1A**	Local 2	Líquido	**L2A**
		L1B			**L2B**
		L1C			**L2C**
	Sedimento	**SL1A**		Sedimento	**SL1A**
		SL1B			**SL1B**
		SL1C			**SL2C**
			Local 3	Líquido	**L3**
				Líquido submerso	**SL3**
				Sedimento	**Sed3**

A etapa de pré-seleção consistiu em pré-selecionar consórcios de microalgas que cresceram em atmosfera sob 30% de CO_2, controlada utilizando um fluxômetro mássico de gases (Brooks Instruments, modelo 5850E). Numa tentativa de se obter diferentes consórcios,

três abordagens foram utilizadas, viariando algum parâmetro em cada uma (Figura 3.2). Em todas elas, frascos de 1.150 mL com vedação para gás foram preenchidos com 200 mL de meio WC líquido.

Figura 3.2 Esquema de pré-seleção de consórcios de microalgas sob atmosfera a 30% de CO_2



Ao primeiro frasco (**mix 0**), contendo tampão Tris (pH 7,7), foram colocados 2 mL do conteúdo de cada tubo contendo as microalgas. Ao segundo (**mix 1**), sem tampão, foram colocados volumes diferentes de cada tubo, de modo que as concentrações finais no frasco (medidas de DO_{680nm}) fossem iguais, para não favorecer o crescimento de nenhuma espécie possivelmente presente em maior quantidade. O terceiro frasco (**mix 2**) foi semelhante ao segundo, exceto pela presença de tampão fosfato-salino pH 7,4 (KH_2PO_4 0,008 mM e K_2HPO_4 0,042 mM). As culturas foram crescidas em incubadora com temperatura controlada a 28°C e sistema com iluminação por LED na faixa de 25 µmol fótons $s^{-1}m^{-2}$, controle de fotoperíodo 14h/10h claro/escuro e agitação a 120 rpm. A atmosfera no interior dos frascos foi trocada a cada 24 horas, passando ar enriquecido com 30% de $CO_{2,}$ por 3 min, no espaço livre de líquido no frasco, exceto pelo mix 2, ao qual o ar enriquecido com CO_2 era borbulhado por 1 h diariamente. Essa troca de atmosfera foi realizada para manter a concentração de CO_2 nos frascos aproximadamente constante durante todo o processo.

Foram realizados 4 repiques em cada frasco, em média a cada 10 dias, adicionando 20 mL de inóculo (repique anterior) em 200 mL de meio de cultura novo estéril, obtendo-se ao

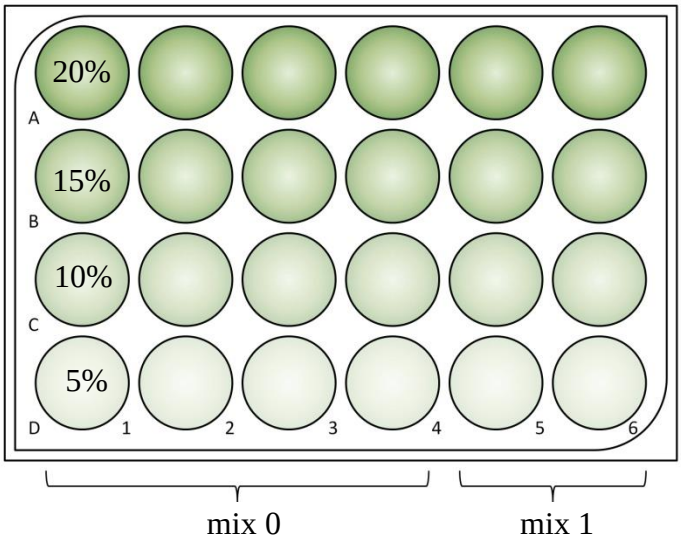
final de 4 repiques um consórcio de microalgas, o qual resistiu às condições de CO_2 impostas. Os consórcios finais, mix 0, mix 1 e mix 2, foram utilizados na seguinte etapa de isolamento.

3.2.3 Isolamento das microalgas

O processo de isolamento foi uma combinação de técnicas seguindo as metodologias em ANDERSEN e KAWACHI (2005). Alíquotas de 200 µL de cada amostra líquida, ou uma alçada para as de sedimentos, foram espalhadas em placas de Petri contendo meio de cultura WC sólido com 1,5% de ágar. Plaqueamentos sucessivos a partir de uma única colônia, e até que colônias bacterianas não se desenvolvessem, resultaram no isolamento de diferentes cepas. As colônias que cresceram foram transferidas para tubos com meio líquido e posteriormente para frascos de 125 mL. Em todas as etapas do isolamento, incluindo o enriquecimento em tubos, as amostras foram monitoradas por microscopia óptica (Axio Scope A1, Carl Zeiss) para verificar a morfologia das microalgas.

Considerando que em algumas placas o isolamento não foi efetivo, principalmente pela presença de fungos, optou-se por realizar também o método com uso de antibióticos (estreptomicina e ampicilina) e antifúngico (anfotericina-b), na tentativa de eliminar bactérias e fungos que crescem com muita rapidez em meio sólido, dificultando o isolamento. A fim de se verificar a porcentagem de inóculo (consórcios) que a presença de antibiótico e antifúngico não causa a morte das células, realizou-se o seguinte experimento. Em placa estéril de 24 poços, colocou-se em cada poço quantidades suficientes para um volume final de 2 mL de meio de cultura, inóculo (variando a porcentagem de 5 a 20%) e antibiótico (estreptomicina 100 µg mL^{-1} e ampicilina 100 µg mL^{-1}) ou antibiótico/antifúngico (anfotericina-b 2,5 µg mL^{-1}). Foram testados como inóculo os consórcios mix 0 e mix 1. O esquema do experimento está ilustrado na Figura 3.3. Após 24 h do inóculo, as amostras de cada poço foram plaqueadas em placas de Petri e, após crescimento, transferidas para tubos e posteriormente para frascos de 125 mL.

Figura 3.3 Esquema do experimento de crescimento de microalgas em placa de 24 poços com diferentes porcentagens de inóculo na presença de antibiótico e/ou antifúngico.



Legenda:

Coluna 1	Controle mix 0 - sem antibiótico e antifúngico
Coluna 2	Mix 0 com antibiótico e antifúngico
Coluna 3	Mix 0 com antifúngico
Coluna 4	Mix 0 com antibiótico
Coluna 5	Controle mix 1 - sem antibiótico e antifúngico
Coluna 6	Mix 1 com antibiótico e antifúngico

3.2.4 Análise do perfil proteico das microalgas isoladas

As amostras dos isolados e do consórcio mix 1 (após cultivo com antibiótico para eliminar bactérias) foram secas em concentrador a vácuo (CentriVap, Labconco) e re-suspensas com uma solução 50% acetonitrila e 0,1% (v/v) de ácido trifluoracético (TFA). Cerca de 1 µL de cada amostra foi colocado em cada *spot* da placa de amostragem de aço polido (modelo MTP 384, Bruker Daltonics). Após completa secagem à temperatura ambiente, adicionou-se sobre a amostra 1 µL da matriz solução saturada de ácido α-Ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA). Foram feitos três *spots* para cada amostra. Novamente, após completa secagem, a placa foi inserida no equipamento para a análise do perfil proteico. O equipamento utilizado foi um espectrômetro de massas Ultraflextreme (Bruker) com fonte de ionização do tipo MALDI (laser *smartbeam* gerando íons positivos ou negativos) e analisador do tipo TOF (tempo de voo). As análises foram conduzidas em modo linear com frequência de 2000 Hz, voltagem de aceleração de 25 kV para a segunda fonte de íons no eletrodo. Antes da aquisição dos espectros, o equipamento foi calibrado com uma mistura de proteínas (*Protein Standard I*) com massas na faixa de 2 a 20 kDa. Cada espectro foi coletado manualmente em modo íon positivo com uma média de 10.000 *shots*, e o intervalo de massas analisado foi de m/z 2 a 20 kDa (razão massa/carga). Os espectros obtidos de cada *spot* foram avaliados utilizando o software *Flex Analysis* de acordo com os seguintes parâmetros: limite

de sinal a ruído (S/N) como 2, limite de intensidade do sinal mínimo como 600 e resolução de pico superior a 400.

3.2.5 Extração de DNA, sequenciamento e identificação das microalgas

A extração de DNA dos isolados de microalgas foi feita com a biomassa concentrada, previamente cultivada por 48 h, e utilizando-se o kit de extração de DNA *GenElute Plant Genomic DNA Miniprep kit* (Sigma-Aldrich) seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, as células foram primeiramente rompidas por congelamento em nitrogênio líquido e maceração, seguido de lise celular com solução digestora a 65°C, precipitação dos debris celulares, filtração do lisado, purificação e concentração do DNA em coluna de separação e, por último, eluição do DNA (50 µL), o qual foi mantido a -20°C até a etapa seguinte. Cada amostra de DNA foi analisada em NanoDrop (DeNovix) para verificar a concentração e a pureza.

Em seguida, o DNA de cada amostra foi amplificado por reação de polimerase em cadeia (PCR). Toda esta etapa foi realizada pela pesquisadora Dra. Louise Hase Gracioso no laboratório do CEPEMA. Utilizou-se um termociclador (Master Cycler, Eppendorf), seguindo o procedimento: 95 ^{o}C por 5 min , 35 ciclos de 95°C por 1 min, 64°C por 1 min, 72°C por 1 min. As misturas de reações consistiram de 1µL do DNA genômico (aproximadamente 50 ng), 25 µL da mistura de reação contendo a enzima Taq polimerase para reação de PCR com $MgCl_2$, 1 µL do *Foward Primer* (10 µM), 1 µL do *Reverse Primer* (10 µM) e água Milli-q autoclavada para completar um volune final de 50 µL . Foram utilizados os *primers* ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) e ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG).

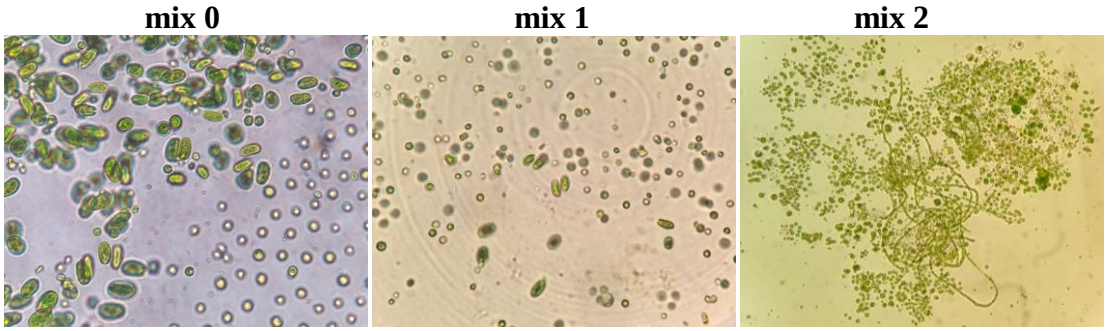
A eficiência da amplificação foi verificada através de eletroforese em gel contendo 0,8% de agarose. A etapa de sequenciamento das regiões amplificadas foi realizada no laboratório GaTE Lab (*Genomics and Transposable Elements Lab*) do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da USP. A sequência obtida do gene ITS foi analisada pelo sequenciador de DNA ABI modelo 3130 (*Applied Biosystems*, Califórnia, EUA) e o kit de sequenciamento ABI Prism (*Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit V3.1*, Perkin-Elmer). Os resultados das sequências (APÊNDICE A) foram alinhados e comparados com sequências conhecidas do banco de dados BLAST utilizando o servidor *National Center for Biotechnology and Information* (NCBI) (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Pré-seleção e isolamento de microalgas tolerantes a CO_2

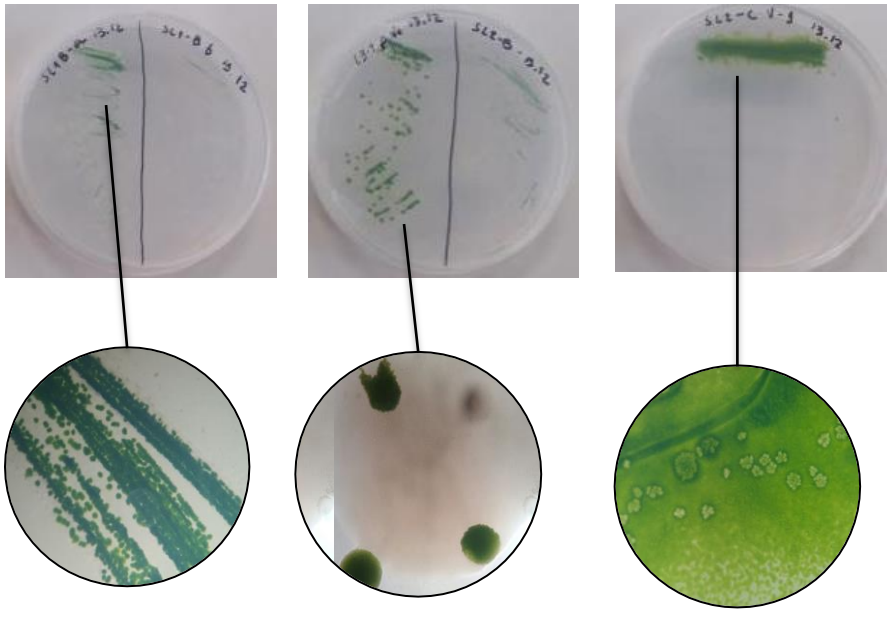
A pré-seleção a 30% de CO_2 resultou em três consórcios, mix 0, mix 1 e mix 2, cujas imagens estão na Figura 3.4.

Figura 3.4 Imagens de microscopia óptica, em diferentes aumentos, dos consórcios de microalgas (mix 0 - aumento 400X, mix 1 - aumento 200X e mix 2 - aumento 100X

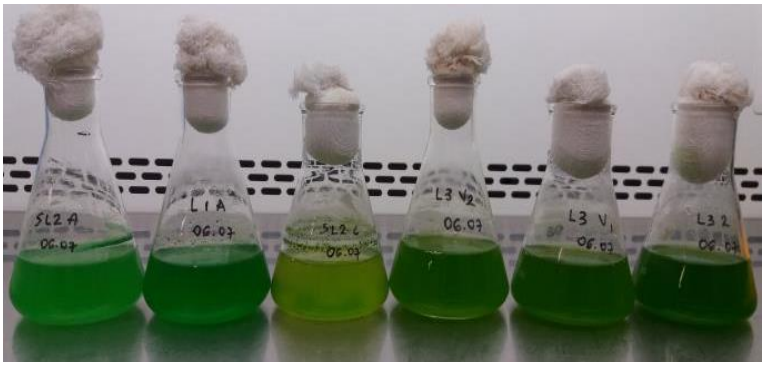


A Figura 3.5 apresenta imagens de três placas de Petri contendo colônias de microalgas e dos frascos com microalgas em meio líquido.

Figura 3.5 Microalgas cultivadas em meio sólido em placas de Petri (a) e líquido em frascos agitados (b)



a)

b) 

A etapa de isolamento resultou nos isolados SL2C, SL1B, L3 e C4 (o último resultante do experimento ilustrado na Figura 3.3), os quais, após cultivo em frascos agitados, apresentaram visualmente melhor crescimento frente aos outros, sem contaminações por bactérias e/ou fungos, tanto em meio líquido quanto em meio sólido.

O local de amostragem das microalgas (mangues na região de Cubatão) e as etapas de enriquecimento, pré-seleção e isolamento foram essenciais para a obtenção de cepas tolerantes a CO_2. Mangue é um conjunto de vegetação costeira, normalmente ocorrente na região de encontro de água de rio e marinha. Em mangues, a supersaturação de CO_2 com respeito ao equilíbrio atmosférico na superfície da água é normalmente observada, apesar de todo o ecossistema (sedimento, água e vegetação) ser fonte de CO_2 (BORGES et al., 2003). Além disso, a região de Cubatão é conhecida pelos altos índices de poluição devido à industrialização e ocupação humana desordenada, principalmente na década de 80, de forma a alterar ao longo dos anos as áreas de manguezais na região (CORDEIRO; COSTA, 2010). Assim, microalgas dessa região provavelmente já se encontram adaptadas a níveis mais elevados de CO_2 e, portanto, apresentam maior robustez frente às linhagens comerciais (KATIVU et al., 2012).

Um estudo (LI et al., 2015) utilizou uma abordagem semelhante à utilizada neste trabalho de evolução adaptativa em laboratório, total de 97 dias, com *Chlorella* sp. sob 10 e 20% de CO_2. Os autores compararam as cepas evoluídas com a original e verificaram que ambas as cepas evoluídas cresceram rapidamente sob 30% de CO_2. A concentração máxima de biomassa da cepa evoluída sob 10% de CO_2 foi de 3,68 g L^{-1}, quase três vezes maior do que a obtida com a cepa original. O estudo das da composição bioquímica dessas células de *Chlorella* sp. provou que a técnica de evolução adaptativa forneceu uma abordagem eficaz para melhorar a tolerância a CO_2 dessas microalgas.

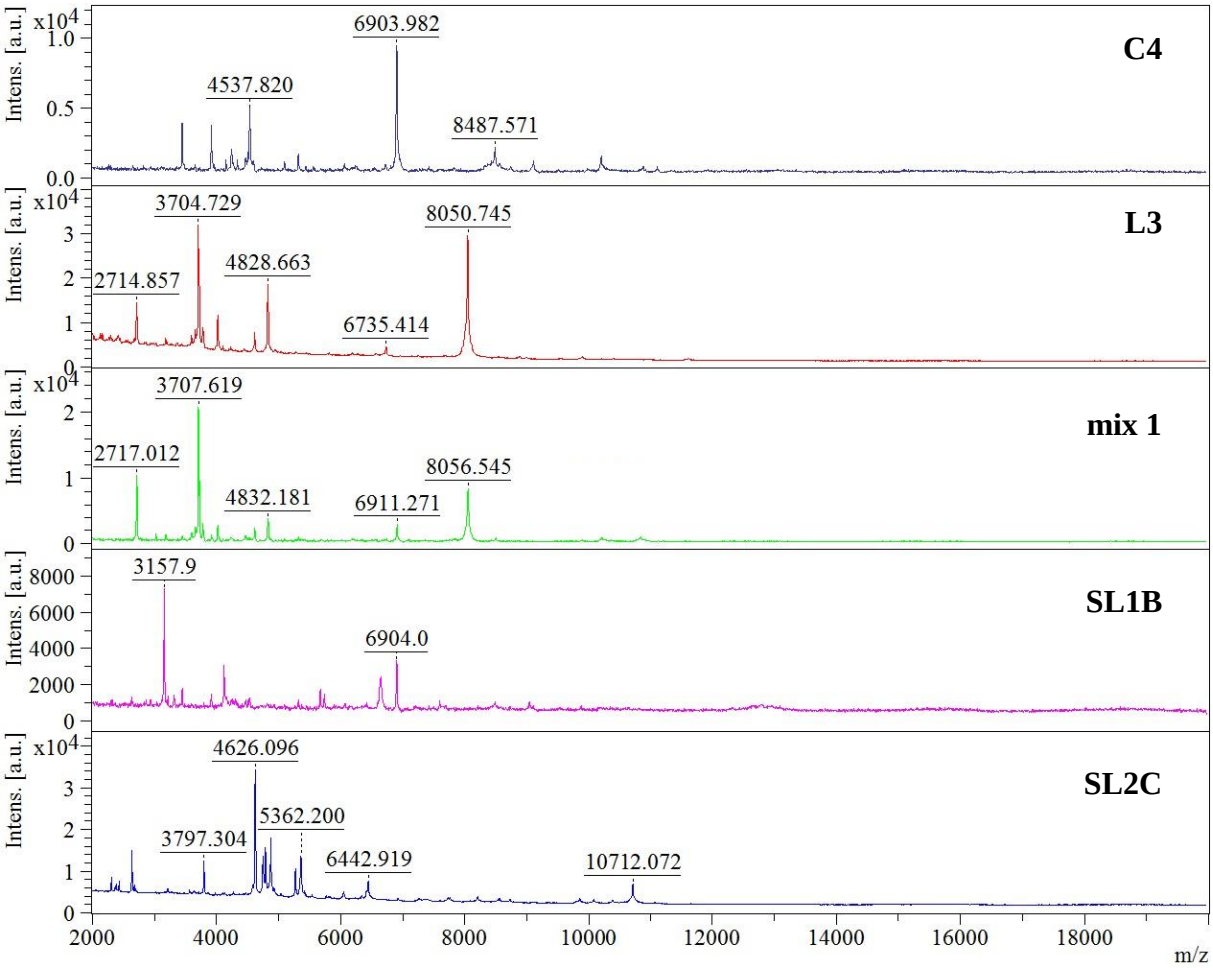
3.3.2 Análise do perfil proteico

As células intactas de microrganismos produzem um espectro de proteínas conservadas geneticamente que são como uma impressão digital. A espectrometria de massas das proteínas conservadas é uma forma de identificar o perfil proteico de cada amostra e verificar a compatibilidade entre elas (ANDRADE et al., 2015).

A espectrometria de massas com ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) é uma técnica utilizada para a rápida obtenção do perfil de proteínas geneticamente preservadas (MURUGAIYAN et al., 2012). Para microalgas, esta técnica ainda se encontra nos estágios iniciais, com poucos estudos reportados. MURUGAIYAN e colaboradores (2012) relataram o uso da técnica de MALDI com matriz de HCCA para analisar proteínas extraídas com ácido fórmico 70% e acetonitrila (50:50, v/v) a partir de microalgas dos gêneros *Phototheca* spp. e *Chlorella* spp.. Em outro estudo (ANDRADE et al., 2015), a eficiência de diferentes sistemas de matrizes e solventes foram testados para a identificação do perfil proteico de microalgas utilizando a técnica de MALDI-TOF, durante as diferentes fases de crescimento das espécies *Chlorella vulgaris*, *Chlorella* sp., *Desmodesmus* sp., *Monoraphidium* sp. e *Oocystis* sp. Os perfis obtidos para cada espécie em diferentes fases de crescimento foram similares entre si e, portanto, essas proteínas foram consideradas preservadas.

Neste trabalho, a mesma técnica foi aplicada utilizando-se a matriz HCCA após a extração das proteínas das microalgas com solução 50% acetonitrila e 0,1% (v/v) TFA. Comparou-se o perfil proteico das microalgas isoladas, ainda não identificadas por outras técnicas, SL1B, SL2C, L3 e C4, além do consórcio mix 1. Os perfis dos espectros de massas obtidos estão apresentados na Figura 3.6.

Figura 3.6 Espectros de massas do tipo MALDI-TOF das microalgas isoladas SL1B, SL2C, L3 e C4 e do consórcio de microalgas mix 1



Nos espectros das diferentes linhagens nota-se que nenhum dos picos mais pronunciados para cada uma coincidem entre si. Isso indica que cada amostra pode se tratar de uma microalga diferente, baseado na diferença entre os perfis proteicos (ANDRADE et al., 2015). Já no caso do consórcio, mix 1, observou-se maior semelhança do seu espectro de massas com o da microalga L3, com os principais picos coincidindo. Isso indica que, provavelmente, este consórcio é composto principalmente por essa microalga. Apesar dessa técnica ser relativamente rápida de ser realizada, após já implementadas as condições de análise, e de fornecer informações importantes quanto ao perfil proteico de microrganismos, a exata identificação das microalgas, e portanto a confirmação de espécies diferentes, só pode atualmente ser feita por procedimentos de biologia molecular.

3.3.3 Identificação das microalgas isoladas por biologia molecular

O DNA extraído de cada microalga isolada foi quantificado por medidas de absorbância a 260 nm pelo equipamento *NanoDrop* e avaliado segundo o parâmetro de pureza da relação entre absorbância a 260 nm e a 280 nm (A_{260}/A_{280}) (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 Concentração de DNA extraído, A_{260} e A_{260}/A_{280} das microalgas isoladas

Nome da amostra	A_{260}	A_{260}/A_{280}	Concentração de DNA [ng μL^{-1}]
SL2C	0,6089	1,71	30,446
SL1B	0,7156	1,50	35,779
L3	0,9048	1,77	45,240
C4	0,9766	1,38	48,832

A faixa de concentração de DNA entre 30 e 50 ng μL^{-1} é considerada adequada para o posterior uso dessas amostras. O parâmetro de qualidade A_{260}/A_{280} pode indicar a presença de contaminantes nas amostras. Resultados de A_{260}/A_{280} entre 1,6 e 2,0 indicam boa qualidade do DNA, apesar de valores um pouco abaixo de 1,6 não inviabilizarem o uso das amostras, dependendo da aplicação (ZIMMERMANN; LUTHY; PAULI, 1998). Neste quesito, somente as amostras SL1B e C4 estão um pouco abaixo da faixa de qualidade adequada. Apesar disso, todas as amostras foram utilizadas nas etapas seguintes de amplificação e sequenciamento.

Após a amplificação do DNA foi feito um gel de eletroforese em agarose 0,8% para verificar a presença das bandas (Figura 3.7), e para todos os isolados o resultado foi positivo, o que significa que todos foram corretamente amplificados. As regiões do DNA amplificadas foram sequenciadas e os resultados das sequências alinhados e comparados com sequências conhecidas utilizando o banco de dados BLAST. Os resultados estão na Tabela 3.4, bem como a imagem por microscopia óptica de cada uma.

Figura 3.7 Gel de eletroforese para verificação das bandas de DNA após amplificação por PCR

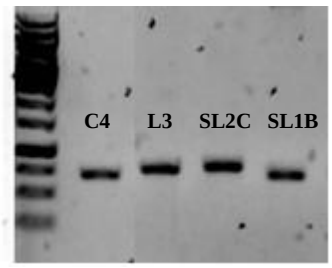
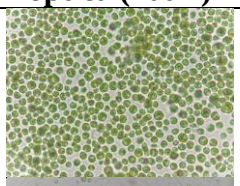
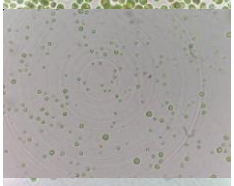
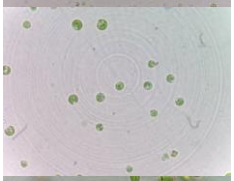
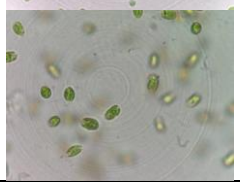


Tabela 3.4 Identificação por análise de sequências de DNA das microalgas isoladas. As imagens por microscopia óptica foram obtidas com aumento de 400X

Nome da amostra	**Imagem por microscopia óptica (400X)**	**Microrganismo com maior similaridade na base de dados BLAST**	**Similaridade (%)**
SL2C		*Chlorella vulgaris*	99
SL1B		-	-
L3		*Parachlorella kessleri*	100
C4		*Scenedesmus* sp.	99

Os tamanhos das sequências resultaram em cerca de 600 pares de bases e a cobertura variou de 94 a 100%. Os isolados foram atribuídos a diferentes espécies: *Chlorella vulgaris*, *Parachlorella kessleri* e *Scenedesmus* sp. com 99% ou 100% de similaridade. No entanto, não foi possível identificar a microalga SL1B utilizando o banco de dados da NCBI. Os resultados forneceram similaridade de 95% com o filo *Clorophyta* (cobertura de 93%), 93% com a ordem *Sphaeropleales* (cobertura de 100%) e 86% com o gênero *Scenedesmus* spp. (cobertura de 92%). Apesar disso, a sequência foi considerada adequada, podendo surgir algumas hipóteses: pode-se tratar de uma nova espécie de microalga, ou cuja sequência ainda não tenha sido depositada no banco de dados, ou ainda outros *primers* poderiam ser sugeridos para o sequenciamento de outras regiões do DNA.

Em geral, a identificação das espécies por sequenciamento de regiões do DNA conferiu com as respectivas morfologias observadas por microscopia óptica e com as descrições na literatura sobre cada espécie. Como o foco deste trabalho não era identificar as espécies percententes aos consórcios (mix 0, mix e mix 2), e sim as isoladas, estes permaneceram somente como um “estoque” para trabalhos futuros. A dificuldade dos consórcios é mantê-los com a mesma composição por longos períodos, então para os ensaios

cinéticos (descritos nos capítulos seguintes) essa variabilidade não é interessante. Apesar disso, consórcios de microalgas tolerantes a CO_2 já foram reportados. Em um estudo, um consórcio isolado de uma estação de tratamento de águas residuais composto por *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Sphaerocystis* sp. e *Spirulina* sp. mostrou crescer bem com até 50% de CO_2 (BHAKTA et al., 2015).

As microalgas dos gêneros *Chlorella* spp. e *Scenedesmus* spp. são conhecidas como tolerantes a CO_2, chegando a crescer sob concentrações máximas de CO_2 de 40% e 80%, respectivamente (SALIH, 2011).

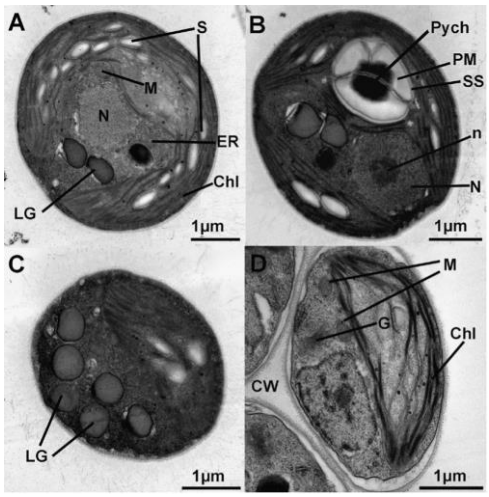
O gênero *Scenedesmus* spp. é comumente encontrado em diversos tipos de águas residuais, sendo um dos mais comuns dos gêneros de algas verdes, além de um dos primeiros a colonizar um ambiente (BICUDO; MENEZES, 2006). Elas são principalmente unicelulares ou múltiplos de dois e variam no fenótipo. Alterações morfológicas podem ocorrer por alterações na concentração de nutrientes, pH ou devido a substâncias químicas liberadas. Esse gênero também é considerado um dos mais importantes para a matéria-prima de biocombustível devido à capacidade das microalgas em crescer em vários tipos de águas residuais e pelo alto teor de biomassa, contendo principalmente lipídeos e carboidratos (PANCHA et al., 2014).

A microalga verde *C. vulgaris* foi descrita pela primeira vez em 1890 por Beijerinck como a clássica "bola verde", isolada de um lago raso perto de Delft, na Holanda (KRIENITZ et al., 2004). Ela é uma das que apresentam crescimento mais rápido e é amplamente cultivada e utilizada na produção de alimentos e rações, bem como no tratamento de águas residuais industriais e gases de combustão. O gênero *Chlorella* spp. é capaz de crescer em condições autotróficas, heterotróficas e mixotróficas e também tem potencial para produzir pigmentos comercialmente interessantes. Sua robustez, alta taxa de crescimento e alto teor de lipídeos neutros fazem deste gênero um promissor à produção de bioenergia (FU et al., 2019).

A microalga *P. kessleri* apresenta características morfológicas bem descritas e observadas por diferentes tipos de microscopia (GAO et al., 2017). Sob microscopia óptica, GAO e colaboradores observaram células unicelulares, verde-amarelas, esféricas e com 5 a 15 μm de diâmetro. O cloroplasto era único, laminado, irregular, e ocupava o espaço principal da célula com um grande pirenoide. Pirenoides são micro-compartimentos sub-celulares encontrados nos cloroplastos de muitas algas, associados ao mecanismo de concentração de carbono, tendo como principal função agir como centro de fixação de CO_2, mantendo um ambiente rico em CO_2 em torno da enzima RuBisCO. Sob microscopia eletrônica de

varredura, as paredes das células pareciam lisas ou com regiões irregulares. Sob microscopia eletrônica de transmissão, as paredes celulares eram transparentes. O núcleo em cada célula estava envolvido e continha um nucléolo evidente. As lamelas irregulares de cloroplasto estavam dispostas ao redor do interior das paredes das células com um pirenóide com invólucro de amido. O invólucro de amido consistia em vários grãos de amido elípticos e atravessava um ou dois tilacóides. Além disso, a mitocôndria, o aparato de Golgi e o retículo endoplasmático podiam ser vistos com clareza. A Figura 3.8 apresenta as imagens por microscopia eletrônica de transmissão do trabalho de (GAO et al., 2017).

Figura 3.8 Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão da *P. kessleri* (S - grãos de amido, M - mitocôndria, N - núcleo, ER - retículo endoplasmático, Chl - lamela de cloroplasto, LG - glóbulos lipídicos, Py - pirenoide, SS - invólucro de amido, n - nucléolo, CW - parede celular, G - aparato de Golgi)



Fonte: GAO et al. (2017)

3.4 CONCLUSÃO

Os processos de pré-seleção e isolamento de microalgas tolerantes a CO_2, coletadas em regiões de mangue, foram eficientes para a obtenção de culturas puras e robustas e constituiu a primeira e mais importante etapa de todo o trabalho, sem a qual não existiria material para as etapas seguintes. O processo, com duração de aproximadamente um ano, resultou no isolamento de quatro espécies diferentes de microalgas, das quais três foram identificadas como *C. vulgaris*, *P. kessleri* e *Scenedesmus* sp.. Além disso, foram obtidos três consórcios de microalgas tolerantes a CO_2, os quais podem ser utilizados em trabalhos futuros.

CAPÍTULO 4

ESTUDO CINÉTICO E PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS DE MICROALGAS SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CO_2

4.1 INTRODUÇÃO

Apesar das microalgas fototróficas utilizarem CO_2 durante a fotossíntese para crescimento e produção de biomassa, altas concentrações de CO_2 podem diminuir ou até inibir esse crescimento, provavelmente devido ao baixo pH e mudanças na saturação de oxigênio, o que serão discutidos posteriormente. No entanto, algumas microalgas podem tolerar mais CO_2 do que outras, e de acordo com essa capacidade elas podem ser agrupadas em sensíveis a CO_2 (< 2 a 5% de CO_2) ou tolerantes a CO_2 (de 5 a 20% de CO_2) (KASSIM; MENG, 2017). Dessa forma, diversos autores orientaram suas pesquisas na definição de concentrações ótimas de CO_2 no gás de alimentação do cultivo de microalgas (CHIU et al., 2008). O principal ponto considerado foi que de um lado CO_2 não deve alcançar a maior concentração que inibe o crescimento, e do outro a concentração não deve ser baixa a ponto de limitar o crescimento. Essas concentrações mínima e máxima variam de espécie para espécie (SALIH, 2011).

Uma busca na base de dados *Web of Science* da *Clarivate Analytics*, utilizando como palavras-chave *'high CO_2-tolerant microalgae'*, forneceu informações sobre o número de publicações por ano, com uma média de 3 a 4 publicações nos anos 2000 e 2001. Depois, esse número só começou a aumentar a partir de 2012 até uma média de 10 publicações por ano, e manteve-se relativamente constante até 2019.

Um relatório fornecido pela *Oilgae*, empresa do ramo de biocombustíveis a partir de algas, forneceu uma revisão a partir de estudos, anteriores ao ano de 2000, sobre a tolerância a CO_2 de várias espécies de algas para uso junto a plantas industriais, com o intuito de reduzir as emissões de CO_2 nesses locais (Tabela 4.1) (ONO; CUELLO, 2003). Este parece ser o primeiro e mais citado estudo de revisão relacionando diferentes espécies de microalgas com a tolerância máxima a CO_2 conhecida. Apesar de algumas espécies serem capazes de crescer

em concentrações de CO_2 muito elevadas (acima de 40%) ou mesmo em CO_2 puro, as maiores taxas de crescimento foram observadas, em geral, de 5 a 20% de CO_2 (ONO; CUELLO, 2003). Trabalhos mais recentes também indicaram microalgas capazes de crescer em concentrações elevadas de CO_2 (de 20 a 50%) (KASSIM; MENG, 2017; KATIVU et al., 2012; MEIER et al.., 2015; VAN DER HA et al., 2012), porém as maiores taxas de crescimento, em geral, também foram observadas de 5 a 20% de CO_2.

Tabela 4.1 Tolerância a CO_2 de diversas espécies de microalgas reportadas em estudos anteriores ao ano 2000

Microalga	**Concentração máxima de CO_2 conhecida (%)**	**Referência**
Cyanidium caldarium	100	SECKBACH et al. (1971)
Scenedesmus sp.	80	HANAGATA et al. (1992)
Chlorococcum littorale	60	PESHEVABONEVA et al. (1992)
Synechococcus elongates	60	MIYAIRI (1995)
Euglena gracilis	45	NAKANO et al. (1997)
Chlorella sp.	40	HANAGATA et al. (1992)
Eudorine spp.	20	HANAGATA et al. (1992)
Dunaliella tertiolecta	15	NAGASE et al. (1998)
Nannochloris sp.	15	NEGORO et al. (1991)
Chlamydomonas sp.	15	MIURA et al. (1993)
Tetraselmis sp.	14	MATSUMOTO et al. (1995)

Fonte: ONO; CUELLO (2003)

Além de avaliar a tolerância de microalgas a altas concentrações de CO_2, visando aplicações industriais, é importante também avaliar a composição química das microalgas, principalmente a lipídica, com potencial para produção de produtos de alto valor (BOROWITZKA, 2013). Sabe-se que a produção de lipídeos intracelularmente por microalgas aumenta quando cultivadas sob condições de estresse, como limitação de nutrientes ou alterações na intensidade luminosa (LI et al., 2014). Nesse sentido, altas concentrações de CO_2 também foram avaliadas como uma condição de estresse com potencial para induzir a produção de lipídeos intracelulares em microalgas (SUN; CHEN; DU, 2016).

Neste capítulo, será discutida a resposta das microalgas a condições de CO_2 limitado (0,04%) e a diferentes concentrações de CO_2 (5, 15 e 30%), através das cinéticas de crescimento, produção de biomassa e composição de ácidos graxos, sem limitação de

nutrientes. Nesse sentido, a única estratégia para induzir a formação de lipídeos a ser avaliada será a utilização de concentrações de CO_2 elevadas. Ao final deste estudo, pretende-se verificar quais espécies das microalgas isoladas conseguem crescer mais rápido, em que faixa de concentração de CO_2, quanto é a produção de biomassa nas diferentes condições e qual a composição de ácidos graxos. Assim, uma vez selecionadas as espécies mais promissoras, estas serão cultivadas em fotobiorreator nas condições de CO_2 ótimas, a fim de monitorar e controlar outros parâmetros importantes para o processo.

Como neste estudo o único parâmetro que varia entre os cultivos é a concentração de CO_2 no gás, os outros parâmetros como temperatura, luminosidade e agitação mantiveram-se constantes e foram baseados nos valores médios reportados para diferentes microalgas e dos locais de onde foram isoladas. Além disso, optou-se por utilizar um fotoperíodo de 14h/10h (claro/escuro) a fim de maximizar a fase clara sem alterar muito as condições "reais" dos locais onde as amostras foram coletadas.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Avaliação das intensidades luminosas na incubadora

Previamente aos ensaios cinéticos sob diferentes concentrações de CO_2 foi necessário avaliar a intensidade luminosa nas diferentes posições na incubadora rotacional (Infors HT), já que este parâmetro não deve se alterar entre os cultivos. Para isso, utilizou-se a microalga *Scenedesmus* sp., somente para fins de comparação. Oito frascos de 500 mL contendo 200 mL de meio WC líquido foram inoculados com a microalga a uma DO_{680} inicial de 0,1 e tampados com rodilhão de algodão, que permite troca gasosa constante. Utilizou-se um luxímetro (CEM DT-1301) para medir a intensidade luminosa em cada uma das oito posições da incubadora (Figuras 4.1 e 4.2). Os frascos foram incubados com agitação a 120 rpm, temperatura de 28°C e luminosidade controlada com fotoperíodo de 14h/10h (claro/escuro). O crescimento das microalgas foi monitorado a cada 24 h por 14 dias, através de coletas de 2 mL para quantificar a produção de biomassa por medidas de absorbância a 680 nm em espectrofotômetro (UV-2600, Shimadzu).

Figura 4.1 Esquema representativo da incubadora Infors HT, evidenciando as posições

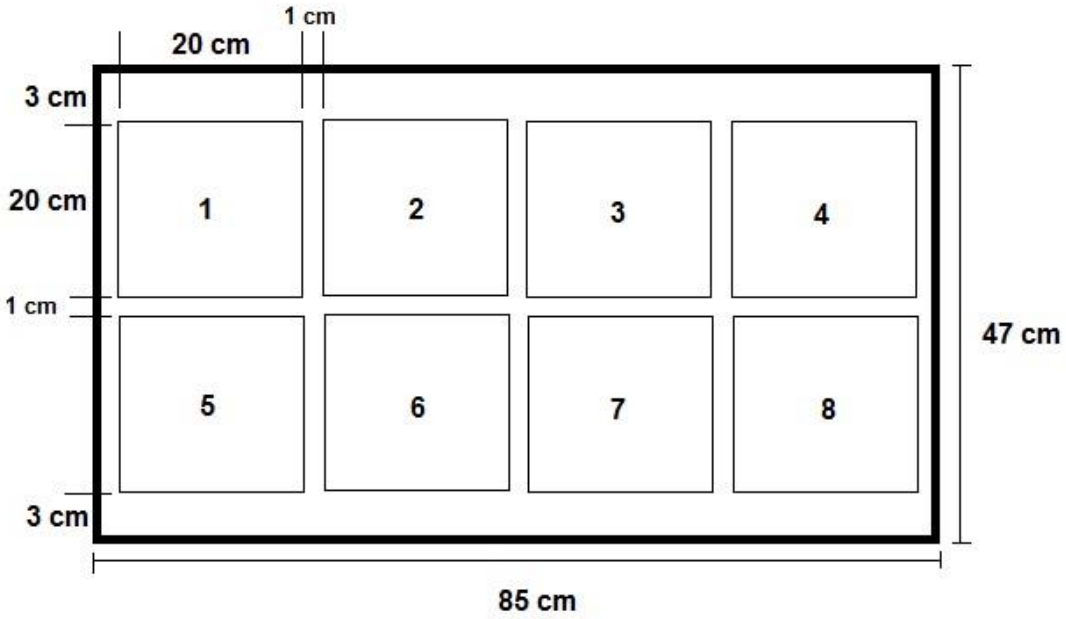
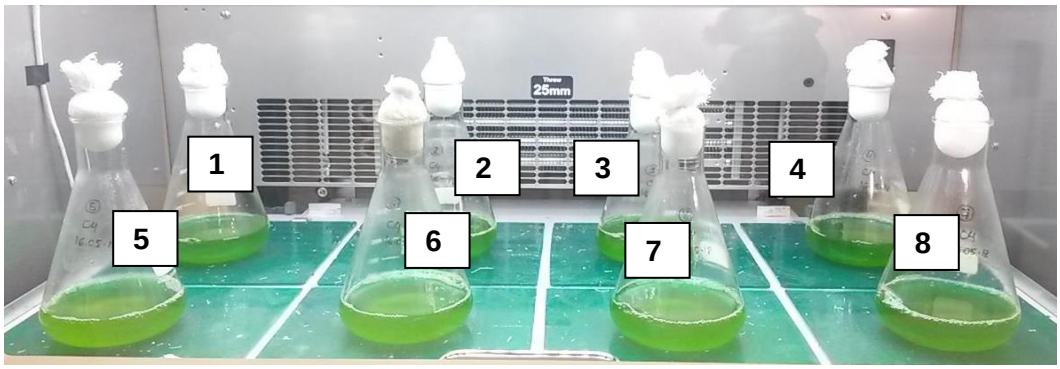


Figura 4.2 Frascos inoculados com a microalga *Scenedesmus* sp. para avaliar o efeito da intensidade luminosa na incubadora rotacional Infors HT



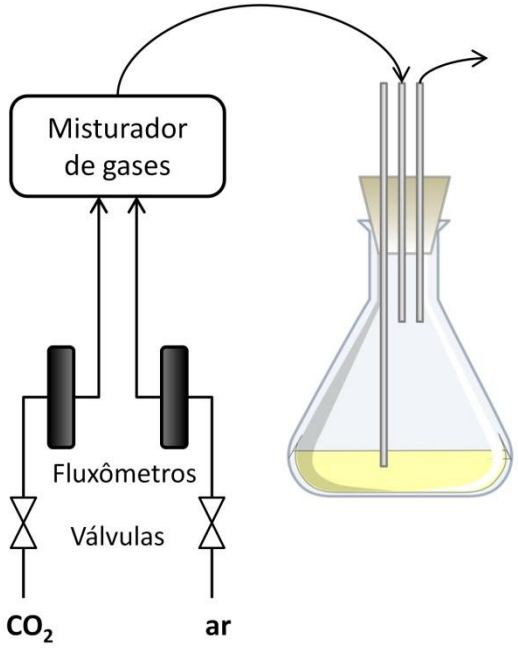
4.2.2 Cinéticas de crescimento sob diferentes concentrações de CO_2

Foram realizados os ensaios cinéticos, em duplicatas, com as microalgas isoladas *P. kessleri*, *C. vulgaris* e *Scenedesmus* sp. para a avaliação das cinéticas de crescimento em diferentes concentrações de CO_2 (0,04 (ar), 5, 15 e 30% de CO_2), conforme método adaptado de MEIER et al. (2015). Frascos de 1150 mL vedados e com entrada e saída para gases (Figura 4.3) foram abastecidos com 200 mL de meio WC líquido e 20 mL de inóculo, calculado para DO_{680nm} inicial de 0,1, suficientemente baixa para acompanhar a fase de crescimento exponencial (CHIU et al., 2008). Utilizou-se ar enriquecido com CO_2

(proveniente de cilindro com pureza de 99,998%) em diferentes proporções, obtido utilizando um fluxômetro mássico de gases (Brooks Instruments, modelo 5850E). Em cada frasco, a mistura de gases saturou a atmosfera em seu interior, passando com vazão total de 500 mL min^{-1} por aproximadamente 3 min. Essa troca de atmosfera foi realizada diariamente, garantindo que a concentração de CO_2 nos frascos fosse aproximadamente constante. Os ensaios com ar (0,04% CO_2) foram realizados com rodilhão, ao invés do sistema com vedação a gás, perimitindo troca gasosa constante. A Figura 4.4 esquematiza essa etapa. Os frascos foram alocados em incubadora rotacional (Infors HT) com agitação a 120 rpm, temperatura de 28°C e luminosidade de aproximadamente 25 µmol $s^{-1}m^{-2}$ (14h/10h claro/escuro). O crescimento das microalgas foi monitorado a cada 48 h por 14 dias, através de coletas de 2 mL de amostra para quantificar a produção de biomassa por medidas de absorbância a 680 nm, que podem ser relacionadas com a concentração em massa seca através de uma curva de calibração. Para a obtenção da concentração em massa seca, as amostras foram centrifugadas em microcentrífuga (Mini-Spin, Eppendorf) a 12.000*g*, separadas do sobrenadante, congeladas por 12 h a -80°C e então liofilizadas (LabConco, modelo FreeZone 4,5 L), para pesar a massa seca final, sendo posteriormente armazenadas em geladeira a 4°C para testes futuros.

Figura 4.3 Sistema experimental dos ensaios cinéticos a diferentes concentrações de CO_2

Figura 4.4 Esquema ilustrativo do abastecimento da atmosfera no interior do frasco com mistura de ar e CO_2 nas devidas proporções (tamanhos não correspondentes com os reais)



4.2.3 Cálculo dos parâmetros cinéticos de crescimento

A partir dos dados de massa seca de células e de volume de amostra coletados, foram calculadas as concentrações celulares (X) ao longo do cultivo: X (g L^{-1}) = massa seca de células (g) / volume coletado (L). Com esses dados, pode-se obter a produção máxima de biomassa para cada cultivo. A partir das cinéticas de crescimento é possível obter as velocidades específicas de crescimento (μ), dadas pela Equação 4.1.

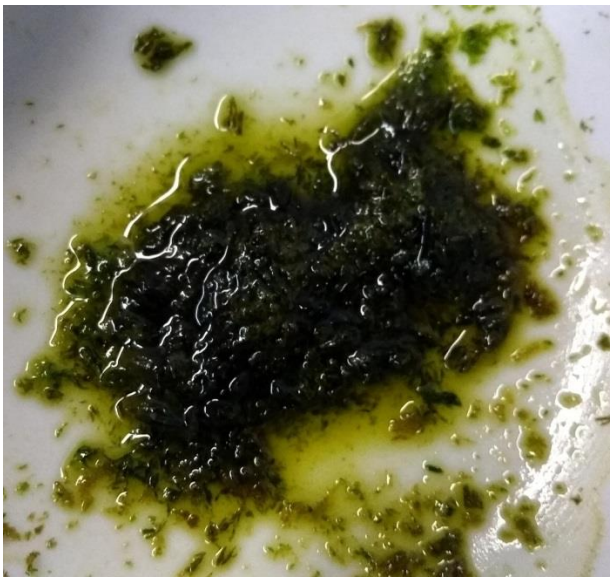
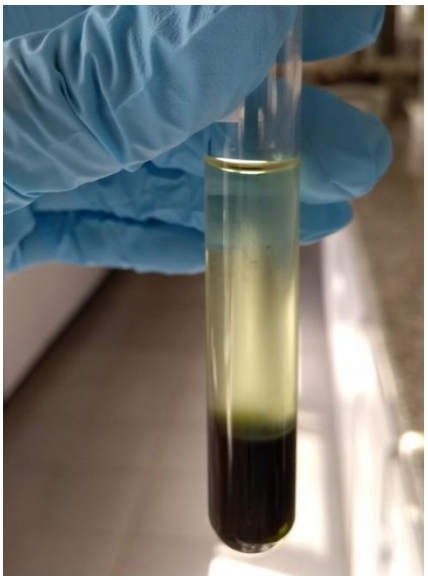
$$\mu = \frac{1}{X}\frac{dX}{dt} \tag{4.1}$$

Na fase exponencial, μ é máximo, constante e vale $(lnX - lnX_0)/\Delta t$. Dessa forma, a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) é obtida pelo coeficiente angular da reta traçada entre os pontos equivalentes à fase exponencial do gráfico de ln (X) em função do tempo para cada curva de crescimento. Como existe uma relação linear entre as medidas de absorbância (DO_{680nm}) e de concentração celular, uma simplificação para a obtenção de μ_{max} diretamente a partir das medidas de DO é traçar a reta entre os pontos referentes à fase exponencial no gráfico de ln(DO) em função do tempo. Tal relação linear foi comprovada traçando-se os gráficos de DO_{680nm} em função de X (g L^{-1}) (item 4.3.3). Assim, o método simplificado para obtenção de μ_{max} foi adotado.

4.2.4 Extração dos lipídeos

Existem diversos métodos de determinação de lipídeos. Neste estudo, optou-se pelo método clássico Bligh & Dyer adaptado (BLIGH; DYER, 1959), amplamente conhecido para a extração dos lipídeos totais, e posterior reação de esterificação para avaliar a composição dos ácidos graxos. As extrações foram feitas a partir de 100 mg de massa seca de microalga (liofilizada e macerada). Neste método, a biomassa em pó foi diluída com 2,5 mL de clorofórmio/metanol (1/2, v/v) (Figura 4.5.a) e passada para um tubo de vidro fechado colocado em banho ultrassônico (Eco-Sonics) à temperatura ambiente. Após 1 h, foram adicionados 1 mL de clorofórmio e 1,8 mL de água milli-q, seguido de agitação vigorosa em vórtex e centrifugação a 1.000*g* por 5 min para separação das fases (Figura 4.5.b). Repetiu-se o procedimento adicionando mais 1 mL de clorofórmio até a fase orgânica se tornar incolor. A fase orgânica de cada tubo foi então pipetada a um novo frasco e concentrada utilizando um concentrador a vácuo (CentriVap, LabConco) (Figura 4.6).

Figura 4.5 Fotos da biomassa de microalgas com metanol e clorofórmio (2/1 v/v) para extração dos lipídeos (a) e após adição de água e posterior centrifugação, separando as fases aquosa e orgânica (verde) (b)

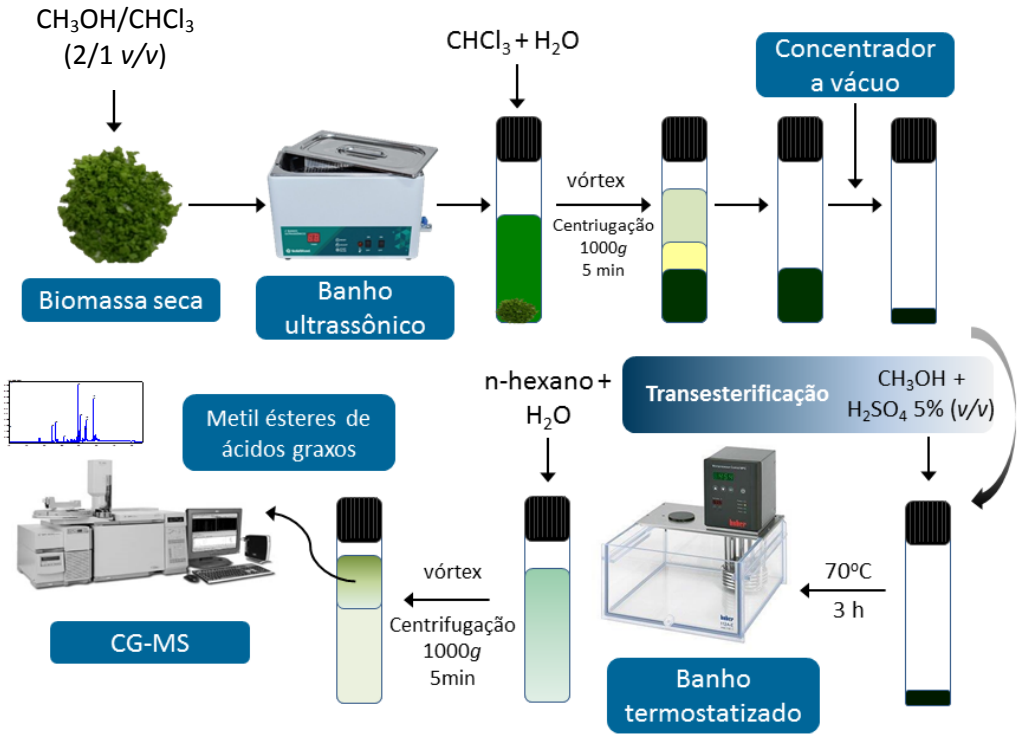
a)  **b)** 

4.2.5 Análise dos ácidos graxos

Os extratos lipídicos foram reagidos com 3 mL de metanol contendo 5% (v/v) de ácido sulfúrico por 3 h a 70°C para produzir os respectivos ésteres metílicos dos ácidos graxos

(FAME - *fatty acid methyl esters*). Após a reação de transesterificação, 3 mL de *n*-hexano e 3 mL de água milli-q foram adicionados, como descrito por (BREUER et al., 2013). Os tubos foram agitados e a fase contendo o hexano (superior) foi coletada em *vials* para análise por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). A Figura 4.6 apresenta o esquema das etapas de extração dos lipídeos e reação de transesterificação para análise dos ácidos graxos correspondentes.

Figura 4.6 Esquema das etapas de extração dos lipídeos de microalgas e reação de transesterificação para análise dos ácidos graxos correspondentes



Um volume de 1 µL de cada amostra foi injetado no GC-MS (QP2010 Plus, Shimadzu) com fonte de ionização do tipo ionização por elétrons (70 eV) e analisador quadruplo, em modo de injeção automático. A temperatura da fonte de ionização foi 300°C, bem como a temperatura da interface. As análises foram feitas utilizando a coluna capilar DB-5 (Agilent) 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm e o seguinte programa de temperatura: temperaturas inicial e final do forno da coluna de 40°C e 300°C, respectivamente; temperatura de injeção de 280°C e taxa de aquecimento de 3°C min^{-1}. Os espectros de massa foram adquiridos no modo varredura e foram detectados os íons provenientes da fragmentação das espécies químicas presentes nas amostras, com diferentes *m/z* (relação massa/carga), a partir de 35 a 700. A identificação dos compostos foi feita utilizando a base de dados NIST. Um padrão FAME C8-

C24 (Sigma) foi também injetado a fim de comparar os tempos de retenção com os das amostras.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Avaliação das intensidades luminosas na incubadora

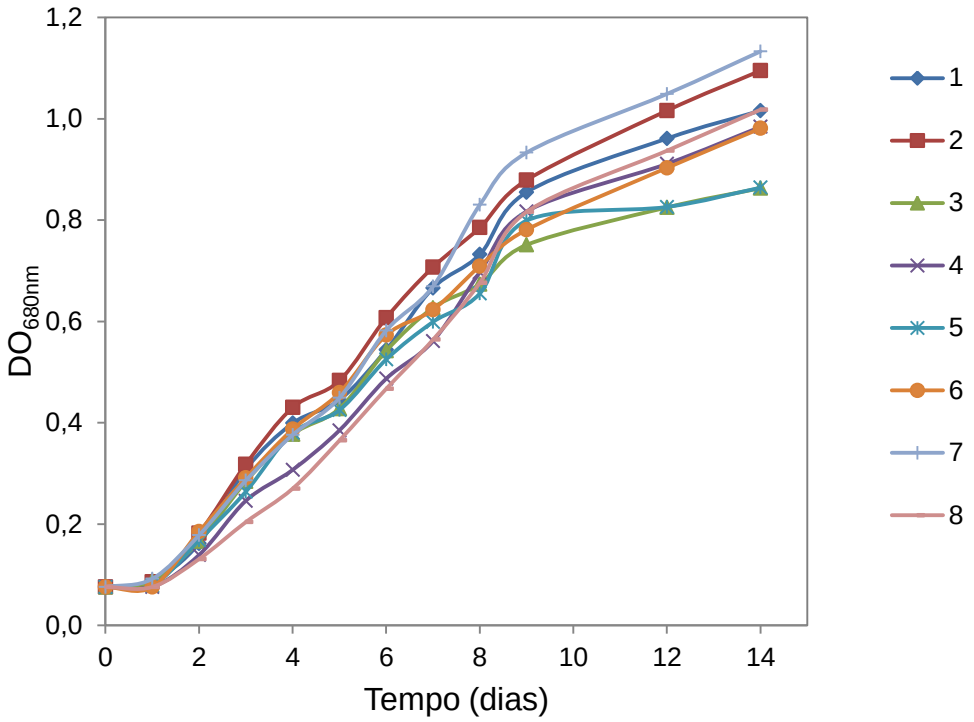
Foram feitas 5 medidas de intensidade luminosa em cada uma das posições na incubadora, conforme mostrado nas Figuras 4.1 e 4.2. A Tabela 4.2 apresenta os resultados obtidos e a média com os desvios padrões em cada uma das posições.

Tabela 4.2 Medidas de intensidade luminosa nas diferentes posições da incubadora Infors HT

	Intensidade luminosa (lux)					
	Medida 1	**Medida 2**	**Medida 3**	**Medida 4**	**Medida 5**	**Média**
Posição 1	1.080	1.120	1.140	1.066	1.076	1.096 ± 29
Posição 2	1.200	1.300	1.270	1.215	1.214	1.240 ± 38
Posição 3	1.150	1.250	1.170	1.173	1.139	1.176 ± 39
Posição 4	860	920	840	905	867	878 ± 30
Posição 5	1.020	950	960	949	950	966 ± 27
Posição 6	1.170	1.090	1.140	1.065	1.097	1.112 ± 38
Posição 7	1.140	1.100	1.105	1.131	1.098	1.115 ± 17
Posição 8	850	840	805	909	894	860 ± 38
					Média	1.055 ± 134

A intensidade luminosa média na incubadora, considerando todas as posições, foi 1.055 ± 134 lux, aproximadamente 25 µmol $s^{-1}m^{-2}$. As intensidades luminosas nas posições 4 e 8 foram 17 e 19%, respectivamente, menores em relação à média, enquanto na posição 2 foi 17% maior do que a média. Essa análise permitiria desconsiderar as posições 2, 4 e 8. Porém, é preciso avaliar as cinéticas de crescimento da microalga nas diferentes posições (Figura 4.7) para verificar a influência dessas discrepâncias no crescimento da microalga.

Figura 4.7 Cinéticas de crescimento de *Scenedesmus* sp. nas diferentes posições (de 1 a 8) da incubadoradora, com diferentes intensidades luminosas

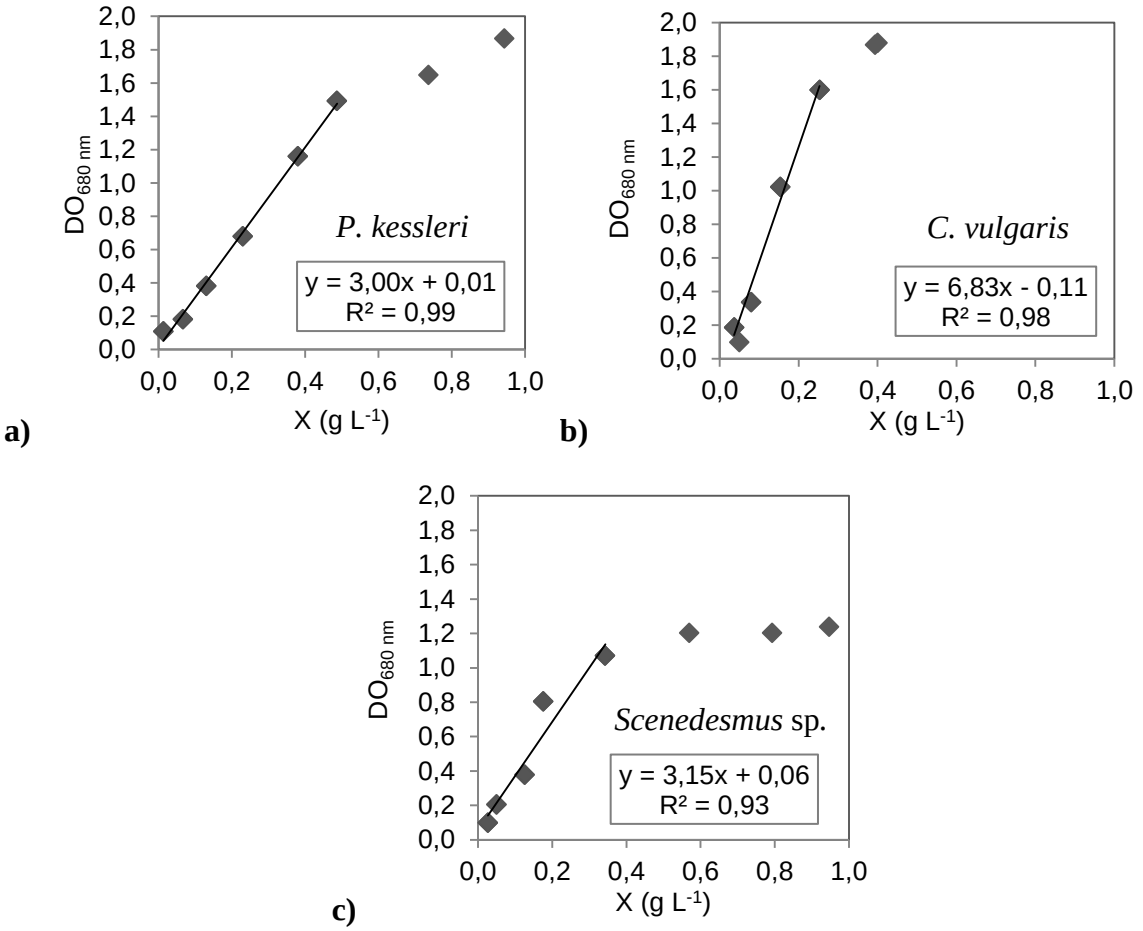


Durante a fase de crescimento exponencial (aproximadamente do dia 2 ao dia 8) o crescimento da microalga nas posições 4 e 8 foi, de fato, menor e mais discrepante do que nas outras posições. Portanto, nos ensaios cinéticos seguintes os frascos foram alocados somente nas posições 1, 2, 3, 5, 6, e 7.

4.3.2 Comparação entre os métodos de medidas de crescimento

Para monitorar o crescimento das microalgas foram feitas medidas de absorbância a 680 nm e de concentração celular em massa seca durante os cultivos. Dessa forma, pode-se avaliar, através dos gráficos de DO_{680nm} em função da concentração celular, a faixa em que a relação entre essas duas medidas é linear. Optou-se por apresentar somente os gráficos referentes aos cultivos sob 30% de CO_2, os quais estão apresentados na Figura 4.8.

Figura 4.8 Comparação entre as medidas de absorbância (DO_{680nm}) e massa seca (X (g L^{-1})) referentes às cinéticas de crescimento de microalgas cultivadas sob 30% de CO_2: a) *P. kessleri*, b) *C. vulgaris* e c) *Scenedesmus* sp.

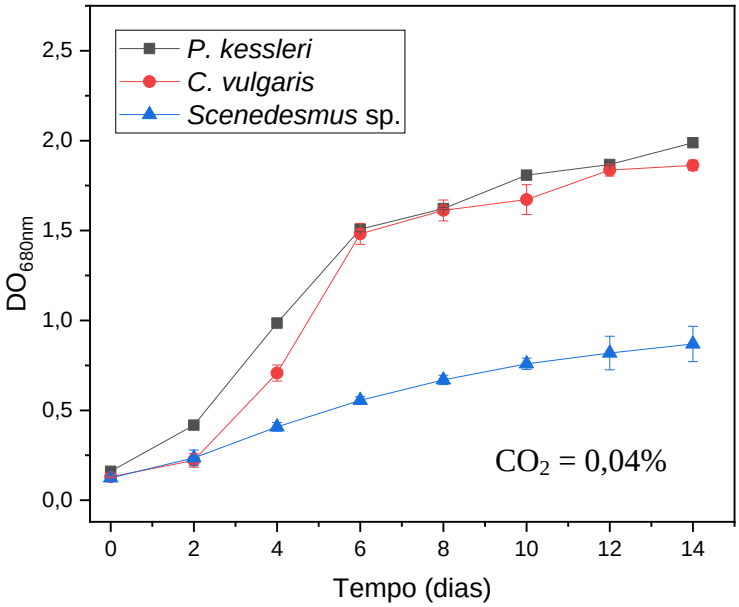


Observou-se uma relação linear entre os dois métodos de medidas até valores de DO de 1,6, para *P. kessleri* e *C. vulgaris*, e de até 1,1 para *Scenedesmus* sp.. A partir desses valores de DO, observou-se uma tendência a uma assíntota, mais evidenciado para a microalga *Scenedesmus* sp.. Dessa forma, as medidas de DO_{680nm} podem ser utilizadas para monitorar o crescimento das microalgas na faixa linear, sendo uma medida indireta da concentração celular, e utilizadas para o cálculo da velocidade específica máxima de crescimento, já que esta é obtida durante o período de crescimento exponencial.

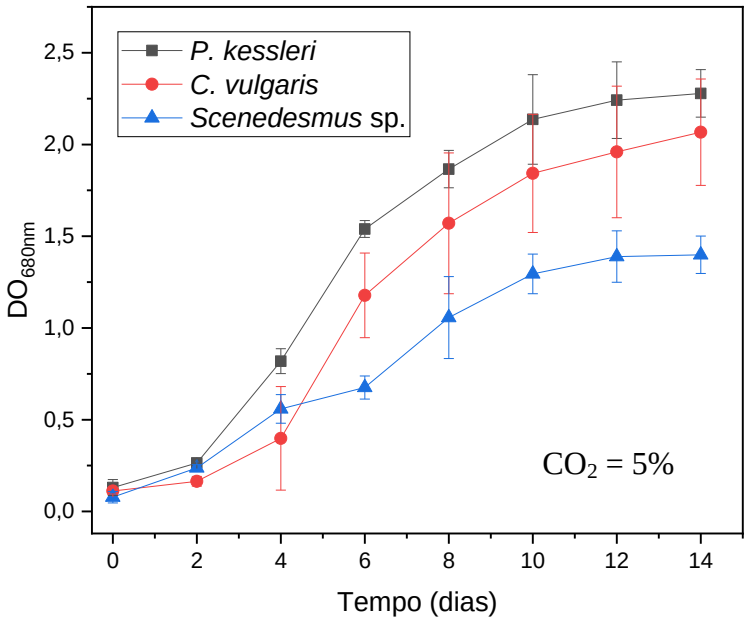
4.3.3 Avaliação das cinéticas de crescimento das microalgas sob diferentes concentrações de CO_2

Foram conduzidos ensaios cinéticos com as microalgas *P. kessleri*, *C. vulgaris* e *Scenedesmus* sp., nas condições de CO_2 atmosférico (0,04%), ou ar enriquecido com 5, 15 e 30% de CO_2, não variando as outras condições experimentais (temperatura de 28°C, luminosidade 25 µmol $s^{-1}m^{-2}$, agitação 120 rpm e vazão de alimentação do gás de 500 mL min^{-1}). Os resultados foram agrupados de duas formas diferentes: a primeira comparando-se as espécies, para a mesma concentração de CO_2, a fim de verificar os diferentes crescimentos (Figura 4.9); e a segunda comparando o efeito das concentrações de CO_2 no crescimento de cada uma (Figura 4.10).

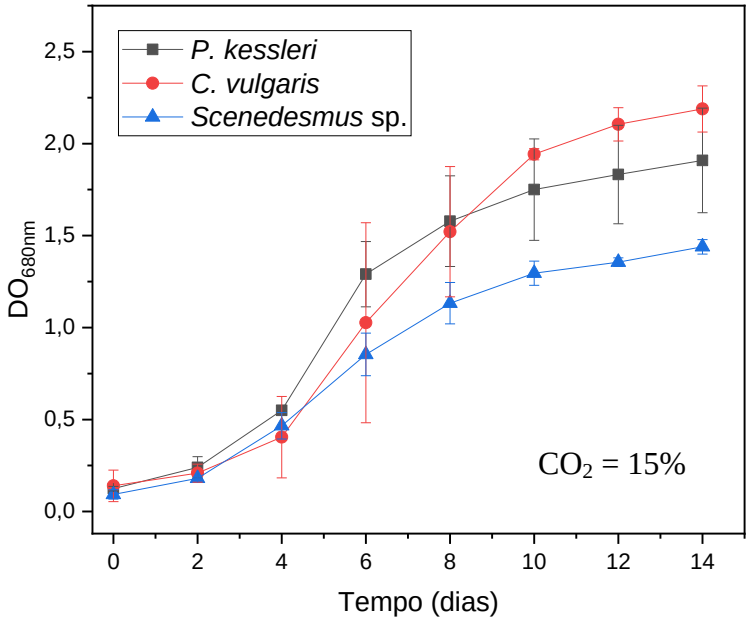
Figura 4.9 Cinéticas de crescimento das microalgas *P.kessleri*, *C. vulgaris* e *Scenedesmus* sp. sob 0,04% (a), 5% (b), 15% (c) e 30% de CO_2 (d)



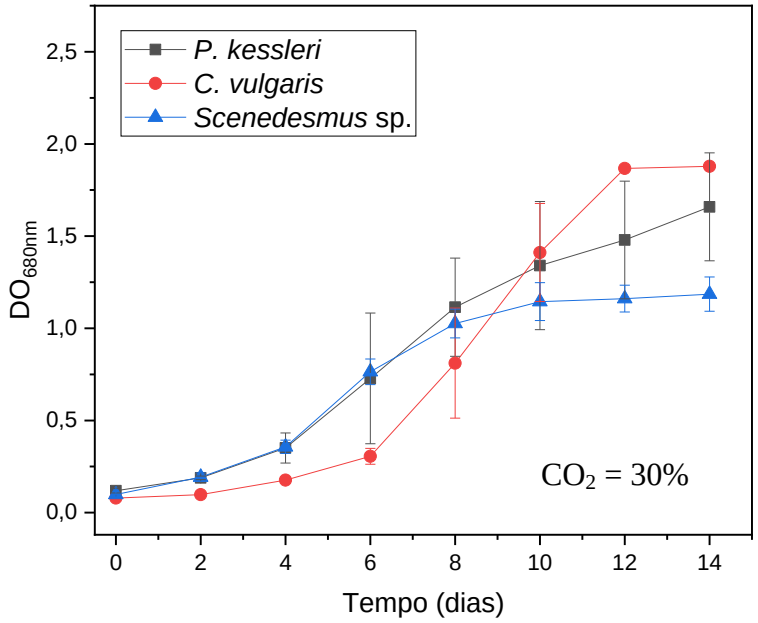
a)


P. kessleri
C. vulgaris
Scenedesmus sp.
DO680nm
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0
2
4
6
8
10
12
14
Tempo (dias)
CO2 = 5%

b)


P. kessleri
C. vulgaris
Scenedesmus sp.
DO680nm
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0
2
4
6
8
10
12
14
Tempo (dias)
CO2 = 15%

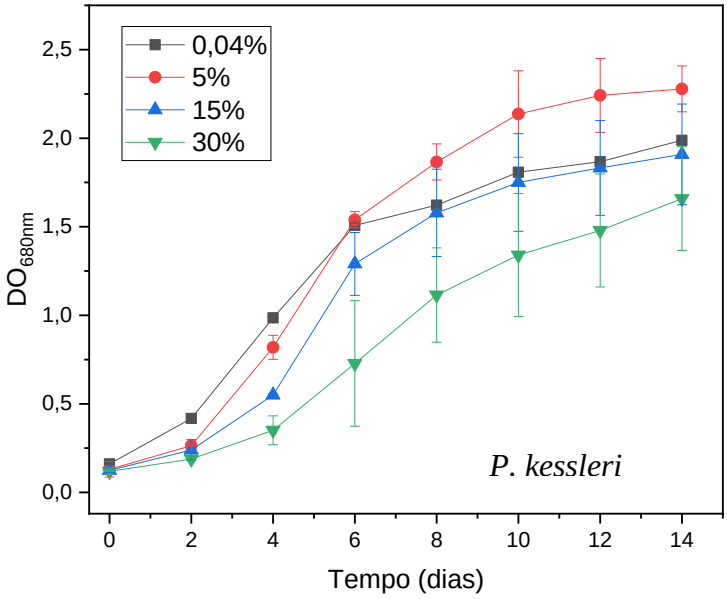
c)



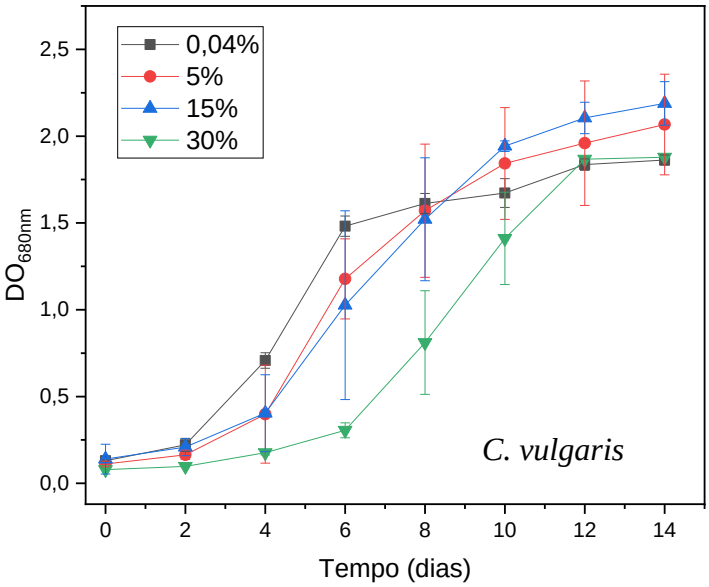
d)

Os gráficos na Figura 4.9 indicaram diferentes comportamentos de crescimento para as diferentes microalgas, como era esperado. O crescimento foi notavelmente maior para *P. kessleri* e *C. vulgaris* do que para *Scenedesmus* sp. em todas as condições de CO_2 testadas, com uma diferença menos discrepante entre as curvas na condição de 30% de CO_2. Sob 30% de CO_2, *C. vulgaris* apresentou uma fase lag de aproximadamente 5 dias (obtida pelo gráfico de $\ln(DO_{680nm})$ em função do tempo (APÊNDICE B)), sugerindo que, sob altas concentrações de CO_2, essa microalga requer mais tempo para adaptação do que as outras avaliadas, apesar de ter alcançado uma maior DO no final de 14 dias.

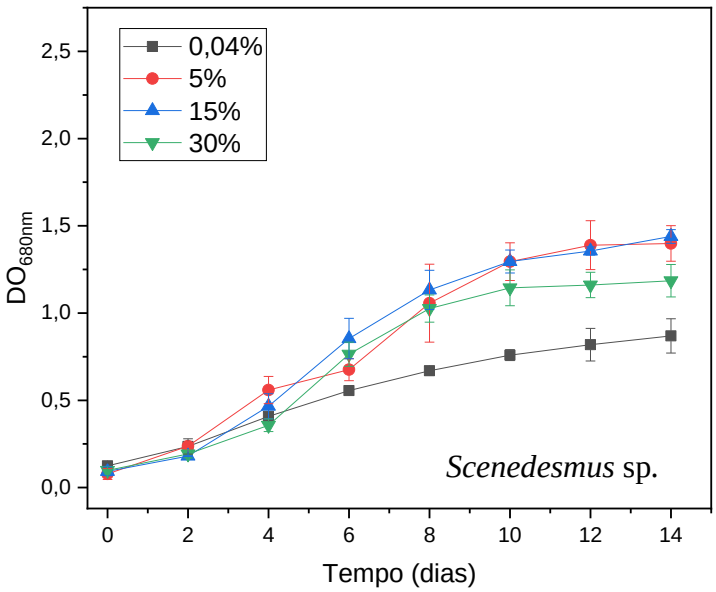
Figura 4.10 Cinéticas de crescimento das microalgas *P. kessleri* (a), *C. vulgaris* (b) e *Scenedesmus* sp.(c) cultivadas sob 0,04, 5, 15 e 30% de CO_2



a)



b)

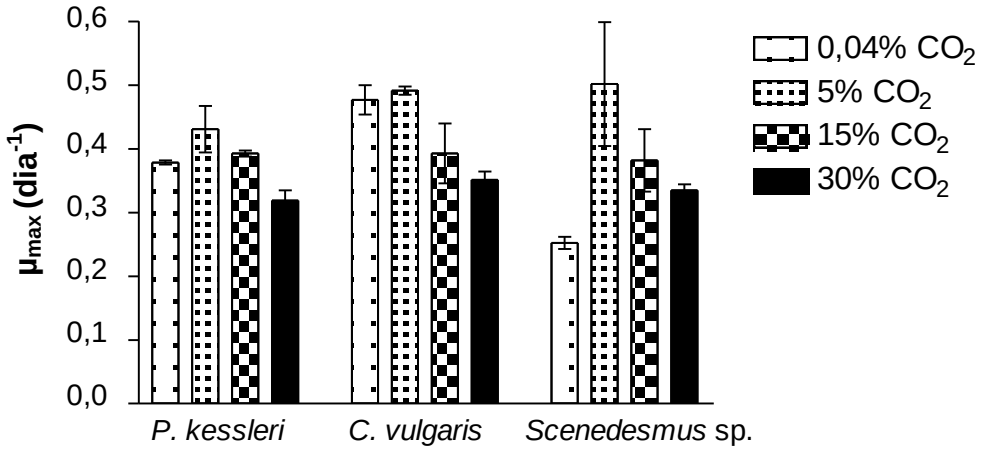


c)

Comparando-se as cinéticas de crescimento referentes às diferentes condições de CO_2 em cada gráfico, pode-se dizer que houve maior crescimento nas concentrações de 0,04 a 15% CO_2 do que 30% CO_2, com exceção da microalga *Scenedesmus* sp.. Esses resultados são corroborados por relatos da literatura apontando maiores taxas de crescimento para diferentes microalgas na faixa de concentração de CO_2 de 5 a 20% (KATIVU et al., 2012; KASSIM; MENG, 2017).

As velocidades específicas máximas de crescimento (μ_{max}) foram obtidas pelos coeficientes lineares das curvas de $\ln(DO_{680nm})$ em função do tempo durante a fase exponencial, que ocorreu aproximadamente entre o segundo e oitavo dias de cultivo (APÊNDICE B). A Figura 4.11 apresenta um gráfico de colunas comparando os valores obtidos de velocidade máxima de crescimento. Os valores absolutos estão apresentados na Tabela 4.3. Análises estatísticas foram realizadas no programa *Prism 3.0* através dos testes de análise de variância (*One-way ANOVA*), sendo *Tukey* o pós-teste aplicado.

Figura 4.11 Comparação entre as velocidades específicas máximas das microalgas *P. kessleri*, *C. vulgaris* e *Scenedesmus* sp. cultivadas sob 0,04, 5, 15 e 30% de CO_2



Para todas as microalgas avaliadas, as velocidades específicas máximas foram ligeiramente maiores sob 5% de CO_2 e diminuíram para 15 e 30% de CO_2, com valores médios de 0,43 ± 0,05, 0,39 ± 0,01 e 0,32 ± 0,02 dia^{-1}, respectivamente, para *P. kessleri*; 0,49 ± 0,01, 0,39 ± 0,07 e 0,35 ± 0,02 dia^{-1}, respectivamente, para *C. vulgaris*; e 0,49 ± 0,14, 0,38 ± 0,07 e 0,33 ± 0,01 dia^{-1}, respectivamente, para *Scenedesmus* sp.. As velocidades específicas máximas obtidas sob condições de CO_2 atmosféricas apresentaram comportamentos diferentes, com valores de 0,38 ± 0,01, 0,47 ± 0,03 e 0,25 ± 0,01 dia^{-1} para *P. kessleri*, *C. vulgaris* e *Scenedesmus* sp., respectivamente. Nenhuma das diferenças foi estatisticamente significativa ($p>0,05$).

A produção máxima de biomassa em todos os cultivos foi obtida no último dia (dia 14) e estão apresentadas no gráfico de colunas da Figura 4.12, e os valores na Tabela 4.3.

Figura 4.12 Comparação entre as concentrações máximas de biomassa das microalgas *P. kessleri*, *C. vulgaris* e *Scenedesmus* sp., cultivadas sob 0,04, 5, 15 e 30% de CO_2, após 14 dias de cultivo

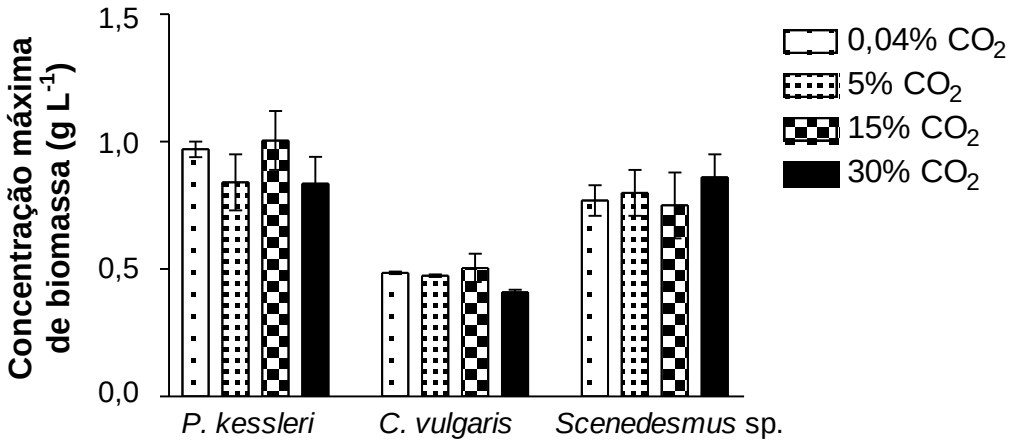


Tabela 4.3. Comparação entre os parâmetros velocidade específica máxima (μ_{max}), e concentração máxima de biomassa (X), após 14 dias de cultivo, das microalgas *P. kessleri*, *C. vulgaris* e *Scenedesmus* sp. cultivadas sob 0,04, 5, 15 e 30% de CO_2.

Microalga	**Concentração de CO_2 (%)**							
	0,04		**5**		**15**		**30**	
	μ_{max} (dia^{-1})	X ($g\ L^{-1}$)	μ_{max} (dia^{-1})	X ($g\ L^{-1}$)	μ_{max} (dia^{-1})	X ($g\ L^{-1}$)	μ_{max} (dia^{-1})	X ($g\ L^{-1}$)
P. kessleri	0,38 ± 0,01	0,97 ± 0,03	0,43± 0,05	0,84 ± 0,11	0,39 ± 0,01	1,00 ± 0,11	0,32 ± 0,02	0,83 ± 0,10
C. vulgaris	0,47 ± 0,03	0,48 ± 0,01	0,49 ± 0,01	0,47 ± 0,01	0,39 ± 0,07	0,50 ± 0,05	0,35 ± 0,02	0,41 ± 0,01
Scenedesmus sp.	0,25 ± 0,01	0,77 ± 0,05	0,49 ± 0,14	0,80 ± 0,09	0,38 ± 0,07	0,75 ± 0,13	0,33 ± 0,01	0,86 ± 0,09

Apesar de *C. vulgaris* ter apresentado os maiores valores de μ_{max}, juntamente com *P. kessleri*, as concentrações máximas de biomassa em todas as condições de CO_2 foram significativamente menores do que as outras microalgas, com valor médio de 0,47 ± 0,05 g L^{-1}. Por outro lado, *Scenedesmus* sp., que apresentou os menores valores de μ_{max}, apresentou maiores valores de produção de biomassa comparado com *C. vulgaris*, com valor médio de 0,79 ± 0,11 g L^{-1} após 14 dias de cultivo. *P. kessleri* foi a que produziu mais biomassa, com valor médio de 0,91 ± 0,13 g L^{-1} após 14 dias de cultivo. Considerando as diferentes concentrações de CO_2, para *P. kessleri* e *C. vulgaris* a produção de biomassa foi aproximadamente 20% maior sob 15% de CO_2 em comparação com 30% de CO_2, que apresentou os menores valores, porém as diferenças não foram estatisticamente significativas ($p>0,05$). Para *Scenedesmus* sp., sob 30% de CO_2 a produção de biomassa foi aproximadamente 15% maior em comparação com 15% de CO_2, que apresentou o menor valor, porém as diferenças também não foram estatisticamente significativas.

DE MORAIS e COSTA (2007) obtiveram resultados inferiores de velocidade específica máxima de crescimento, comparados com este estudo, com a microalga *Chlorella kessleri*: 0,257, 0,267, 0,267 e 0,199 dia^{-1} sob 0,04, 6, 12 e 18% de CO_2, respectivamente. Da mesma forma, a concentração máxima de biomassa também foi inferior, exceto em condições de CO_2 atmosféricas. Foram obtidos os seguintes valores: 1,45, 0,98, 0,80 e 0,88 g L^{-1} sob 0,04, 6, 12 e 18% de CO_2, respectivamente.

Resultados inferiores de crescimento também foram reportados por SYDNEY et al. (2010), que cultivaram a microalga *C. vulgaris* LEB-104 sob 5% de CO_2, a qual apresentou velocidade máxima específica de 0,29 dia^{-1} e fase lag de 4 dias. No entanto, a máxima concentração de células de 1,94 g L^{-1} foi obtida no 15º dia de cultivo, valor muito superior ao obtido no 14º dia de cultivo da mesma microalga neste trabalho. Essa diferença pode ser explicada principalmente, além de outros fatores como iluminação e meio de cultura, pela concentração celular inicial, a qual no trabalho de SYDNEY et al. (2010) foi aproximadamente 1,25 g L^{-1}, mais de 10 vezes maior do que a que foi utilizada neste trabalho.

Chlorella sp. foi cultivada em condições de 2, 5, 10 e 15% de CO_2, e a eficiência da remoção de CO_2 foi maior em 2% de CO_2 (58%). Os maiores valores de μ_{max} e de concentração de células foram 0,492 dia^{-1} e 1,211 g L^{-1}, respectivamente, sob 2% de CO_2 com inóculo com baixa densidade celular e 0,605 dia^{-1} e 1,445 g L^{-1} sob 2% de CO_2 com inóculo com alta densidade celular. Os autores propuseram que a inibição do crescimento de microalgas sob altas concentrações de CO_2 (10 a 15%) poderia ser superada através de uma cultura de alta densidade de inóculo de microalgas que foram adaptadas a 2% de CO_2 (CHIU et al., 2008). Resultados mais promissores para *Chlorella* sp. foram reportados por (YADAV et al., 2015) sob 5% de CO_2, obtendo concentração celular máxima de 2,2045 g L^{-1}. Ainda, uma cepa de *Chlorella* sp. evoluída pelo método de evolução adaptativa em laboratório sob 10% de CO_2 obteve concentração máxima de biomassa de 3,68 g L^{-1} quando cultivada sob 30% de CO_2 (LI et al., 2015).

KASSIM e MENG (2017) avaliaram a cinética de crescimento e a biofixação de CO_2 por *Chlorella* sp. e *Tetraselmis suecica* sob 0,04, 5, 15 e 30% de CO_2. Os resultados indicaram que ambas as microalgas apresentaram tolerâncias diferentes a CO_2, e os melhores desempenhos foram alcançados com 5 a 15% de CO_2. Os autores reportaram que a diminuição do pH do meio sob 30% CO_2 até valores próximos a 5 ocorreu em ambas as linhagens, o que causou diminuição na produção de biomassa. A composição bioquímica foi majoritariamente composta por proteínas, em todas as condições testadas. Algumas diferenças foram notadas na composição de carboidratos e lipídeos em *Chlorella* sp., os quais foram reduzidos em até 45% a condições de 5% CO_2 ou mais. Resultados diferentes foram obtidos para *T. suecica*, não havendo mudanças significativas no teor de carboidratos a diferentes tratamentos. Em oposição, o aumento de CO_2 provocou aumento no teor de lipídeos, o que sugere que essa variação pode ocorrer de forma diferente entre as diferentes espécies.

As implicações mecanísticas do efeito de elevadas concentrações de CO_2 no crescimento de microalgas foram previamente reportadas. Células de *Dunaliella tertiolecta* crescidas sob condições naturais (ar com baixo teor de CO_2) tiveram pirenoides bem desenvolvidos, com maior quantidade de grânulos de amido do que as células crescidas sob ar enriquecido em CO_2 (TSUZUKI et al., 1986). Ainda, células crescidas a baixo CO_2 tiveram cloroplastos localizados próximos à membrana plasmática, enquanto na outra condição essas organelas estavam mais localizadas nas áreas internas. Isso implica que as microalgas podem possivelmente tolerar altas concentrações de CO_2 ajustando sua anatomia estrutural e redistribuindo certas organelas celulares (SALIH, 2011).

4.3.4 Composição lipídica de microalgas cultivadas sob diferentes concentrações de CO_2

A análise da composição lipídica é determinante para obter as características da biomassa produzida e avaliar o perfil de ácidos graxos, fornecendo uma gama de dados úteis para a melhor identificação de importantes aplicações biotecnológicas das microalgas avaliadas. Por exemplo, para a produção de biodiesel, ácidos graxos saturados com 14 a 18 carbonos são considerados ideais (CHISTI, 2007). Outros tipos de ácidos graxos são considerados como aditivos alimentares e outros produtos de alto valor, tais como o ácido eicosapentaenóico (20:5, ω-3), o ácido docosahexanóico (22:6, ω-3) e outros ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) de cadeia longa (LI et al., 2014).

Este trabalho avaliou a composição lipídica de microalgas cultivadas sob 0,04 (ar), 15 e 30% de CO_2 ao final de 14 dias de cultivo. A análise da composição de ácidos graxos considerou os cinco principais detectados em maiores quantidades em todas as microalgas avaliadas: ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico e ácido α-linolênico. Para cada condição de cultivo, os valores obtidos são a porcentagem de área de cada pico em relação à soma das áreas de todos os picos considerados em cada cromatograma. A Tabela 4.4 apresenta os valores médios calculados. A Figura 4.13 apresenta um dos cromatogramas de separação de ácidos graxos por GC-MS, os outros das outras amostras foram semelhantes, variando as intensidades e área dos picos.

Figura 4.13 Cromatograma de separação de ácidos graxos por GC-MS de *C. vulgaris* cultivada sob 30% de CO_2

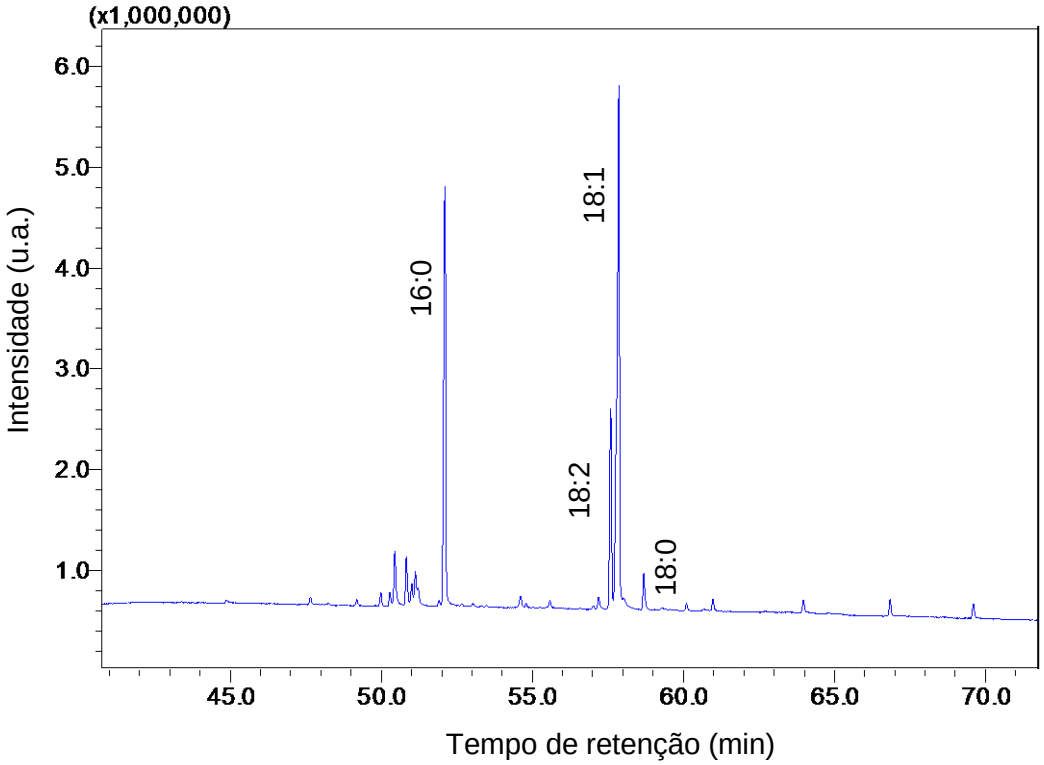


Tabela 4.4 Teor dos principais ácidos graxos nas microalgas *P. kessleri*, *C. vulgaris* e *Scenedesmus* sp. cultivadas sob 0,04, 15 e 30% de CO_2

Microalga	Concentração de CO_2 (%)	**Teor de ácidos graxos (%, porcentagem relativa)**				
		Ácido palmítico **16:0**	Ácido esteárico **18:0**	Ácido oleico **18:1**	Ácido linoleico **18:2**	Ácido α-linolênico **18:3**
Scenedesmus sp.	0,04	49,4	2,0	4,4	7,3	20,7
	15	43,8	6,2	4,9	18,7	22,2
	30	36,5	1,3	20,8	16,2	5,5
P. kessleri	0,04	18,9	3,5	2,7	19,6	39,4
	15	48,5	8,8	29,4	6,4	6,9
	30	45,3	5,1	15,3	20,2	ND
C. vulgaris	0,04	18,0	8,0	52,8	11,3	3,3
	15	37,5	9,5	10,7	6,1	24,0
	30	26,1	8,8	34,8	10,6	ND

ND - não detectado

A Tabela 4.5 apresenta os valores em porcentagem das somatórias dos ácidos graxos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e PUFA. Nesses valores estão incluídos também

as porcentagens relativas dos outros ácidos graxos detectados em menores quantidades, ou que foram detectados em somente uma das espécies, tais como 16:1, 16:2, 16:3, 20:3 e 22:6.

Tabela 4.5 Teores de SFA, MUFA e PUFA nas microalgas *P. kessleri*, *C.vulgaris* e *Scenedesmus* sp. cultivadas sob 0,04, 15 e 30% de CO_2

Microalga	Concentração de CO_2 (%)	**Teor de ácidos graxos (%)**		
		SFA	**MUFA**	**PUFA**
Scenedesmus sp.	0,04	51,4	4,4	38,3
	15	50,0	4,9	44,9
	30	37,8	20,8	41,4
P. kessleri	0,04	22,4	3,8	67,4
	15	57,3	29,4	13,3
	30	50,4	25,7	22,1
C.vulgaris	0,04	26,0	52,8	21,1
	15	47,0	16,0	36,4
	30	34,9	36,6	17,3

O ácido graxo presente em maiores quantidades, em geral, foi o ácido palmítico (16:0). Similarmente às plantas, supõe-se que em microalgas os ácidos graxos de 16 e 18 carbonos sejam sintetizados no cloroplasto a partir do precursor acetil-CoA (KHOZIN-GOLDBERG; COHEN, 2011). Em *Scenedesmus* sp., o cultivo com altas concentrações de CO_2 (30%) favoreceu a produção de ácido oleico (18:1), de 4,4% sob ar atmosférico a 20,8% sob 30% de CO_2. O mesmo comportamento foi observado em *P. kessleri*, a produção de ácido oleico aumentou de 2,7% a 29,4% sob 15% CO_2, e depois diminuiu para 15,3% sob 30% CO_2. A produção de 16:0 apresentou comportamento similar, mas a de 18:3 notadamente decresceu de 39,4% a níveis não detectáveis sob 30% de CO_2.

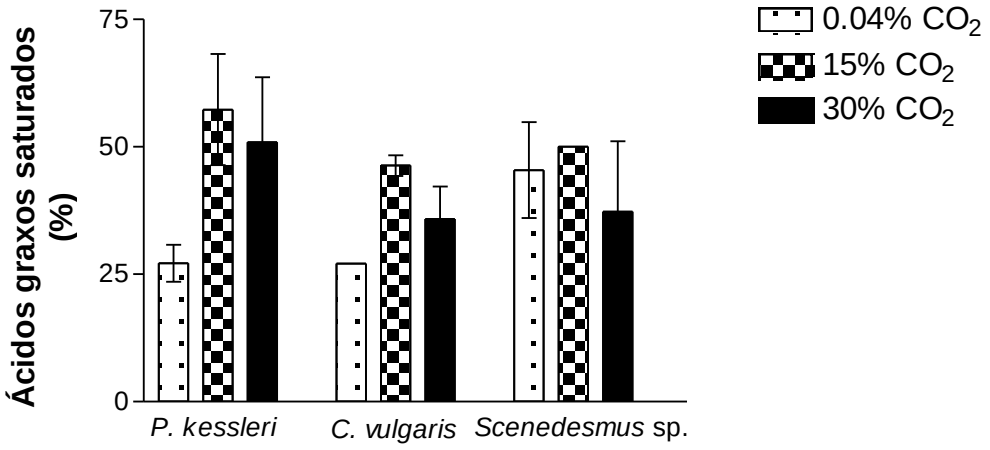
Por outro lado, *C. vulgaris* apresentou as maiores quantidades de ácido oleico no cultivo sob ar atmosférico, com 52,8%. O cultivo com 15% CO_2 favoreceu a produção de 16:0 e de 18:3 de 18,0% para 37,5% e de 3,3% para 24,0%, respectivamente, mas decresceu a de 18:1 para 10,7%. O contrário ocorreu quando concentrações maiores de CO_2 foram utilizadas, favorecendo a produção de 18:1 e diminuindo 18:3 a níveis não detectáveis.

A microalga *Scenedesmus* sp. apresentou 8,8% de 22:6 em cultivo sob ar atmosférico, 0,7% sob 15% CO_2 e 4,5% sob 30% CO_2. As outras microalgas apresentaram níveis não detectáveis e por isso esses dados não constam na Tabela 4.4, mas estão inclusos nas somatórias de PUFA na Tabela 4.5. Existe a hipótese de que 18:3 pode ter sido convertido a 22:6 (GIBSON et al., 2013), o qual é um dos PUFA mais desejados para aplicações nutracêuticas e farmacêuticas devido ao seu efeito benéfico para a saúde humana (SIMOPOULOS, 2002).

Estudos reportaram as diferenças na composição de ácidos graxos entre cultivos sob condições nutricionais de nitrogênio suficientes ou limitadas (KHOZIN-GOLDBERG; COHEN, 2011). Um estudo (VAN DER HA et al., 2012) reportou que a influência mais importante da limitação por nitrogênio no cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. a 40% de CO_2 e 60% CH_4 foi o aumento da concentração de ácido oleico de 10 para 38%. Neste trabalho, o efeito de aumentar a concentração de ácido oleico foi observado com o aumento da concentração de CO_2 na corrente que alimenta o cultivo. Isso leva a um entendimento de que altas concentrações de CO_2 provocaram uma condição de estresse similar à limitação por nitrogênio, produzindo um efeito similar na composição de ácidos graxos nas microalgas estudadas, com exceção da *C. vulgaris*.

Além da composição de ácidos graxos nas microalgas, outra informação válida que pode ser obtida desse estudo são as porcentagens relativas de ácidos graxos saturados e insaturados para cada condição de cultivo (Figura 4.14).

Figura 4.14 Porcentagens relativas de SFA nas microalgas *P. kessleri*, *C.vulgaris* e *Scenedesmus* sp. cultivadas sob 0,04, 15 e 30% CO_2



O total de ácidos graxos saturados e insaturados variou similarmente entre as três espécies de microalgas avaliadas. O total de saturados aumentou nos cultivos a 15% de CO_2

em relação aos cultivos com ar atmosférico e depois diminuiu nos cultivos sob 30% de CO_2. Porém, essas diferenças foram mais evidentes nos cultivos de *P. kessleri* e *C. vulgaris*, do que para a microalga *Scenedesmus* sp..

Em geral, falta de nutrientes e a alta densidade de células podem interferir na composição lipídica, observando-se aumento na produção de ácidos graxos saturados 14:0, 16:0 e 18:0 e decréscimo de ácidos graxos insaturados (RENAUD et al., 1995). De fato, o aumento das porcentagens de SFA e MUFA durante a fase de carência de nutrientes já foi previamente reportada (LIM et al., 2012). Sob esta condição, normalmente os ácidos graxos insaturados são consumidos como fonte de energia e SFA são acumulados. Os cultivos com 15% de CO_2 apresentaram maiores velocidades de crescimento quando comparados com ar atmosférico e 30% de CO_2. Consequentemente, eles apresentaram maior densidade celular, e provavelmente a falta de nutrientes ao final dos cultivos tenha sido também maior, o que interferiu na composição lipídica, aumentando SFA.

A suplementação com CO_2 em níveis de 2,5 a 10% em cultivos de microalgas tem sido reportada como uma estratégia para a produção de óleos com características apropriadas para a produção de biodiesel, com uma composição balanceada em SFA, MUFA e PUFA (NASCIMENTO et al., 2015). Considerando a composição de ácidos graxos, o que determina a qualidade da matéria-prima para o biodiesel é principalmente o tamanho da cadeia de carbonos e o grau de insaturação. Biodiesel obtido com ácidos graxos com maiores quantidades de SFA e MUFA possui melhor estabilidade oxidativa, mas um pior desempenho a baixas temperaturas. A adição de PUFA, por outro lado, melhora as propriedades a baixas temperaturas, mas reduz a estabilidade oxidativa (TALE et al., 2014). A matéria-prima para o biodiesel com alto grau de saturação é mais resistente à oxidação e mais estável na presença de luz, altas temperaturas e interferência de metais (MUTANDA et al., 2011).

No entanto, apesar dessa estratégia ser interessante para a produção de biodiesel, a redução de PUFA é um problema para a produção de ácidos graxos ω-3 (LIM et al., 2012), tanto como suplementos nutricionais com alto valor quanto para o mercado de nutrição animal. Os óleos ω-3 são um bom exemplo do papel das forças de mercado que afetam a viabilidade dos produtos de algas. O mercado de nutrição animal é uma alternativa, pois os óleos de algas são similares aos óleos de peixe, utilizados em rações para animais para aumentar o teor de ω-3 na carne, por exemplo (BOROWITZKA, 2013).

Neste contexto, a suplementação com CO_2 nos cultivos de microalgas teve um impacto nas potenciais aplicações biotecnológicas da biomassa. Por exemplo, utilizando ar

atmosférico favoreceu a produção de PUFA (ω-3) em *P. kessleri*. Já a suplementação com 15% de CO_2 favoreceu a produção de SFA e MUFA, matéria-prima ideal para a produção de biodiesel, enquanto desfavoreceu a produção de ω-3. A mesma concentração de CO_2 em *Scenedesmus* sp. e *C. vulgaris* favoreceu a produção de quantidades balanceadas de SFA+MUFA e PUFA, enquanto que aumentando CO_2 até 30% decresceu PUFA e SFA e aumentou MUFA (ácido oleico).

4.4 CONCLUSÃO

Neste capítulo, avaliou-se o crescimento sob concentrações crescentes de CO_2, produção de biomassa e perfil de ácidos graxos das microalgas isoladas *P. kessleri*, *Scenedesmus* sp. e *C. vulgaris*. O objetivo principal foi verificar se altos níveis de CO_2 interfeririam na composição de ácidos graxos, fornecendo também parâmetros para a identificação de possíveis aplicações biotecnológicas com a biomassa dessas microalgas. Os ensaios cinéticos sob diferentes concentrações de CO_2 (0,04, 5, 15 e 30%) demonstraram maiores velocidades de crescimento sob 5 a 15% de CO_2, as quais diminuíram sob 30% de CO_2. A concentração máxima de células, em geral, foi superior sob 15% de CO_2 e a produção de ácido oleico também aumentou nessas condições, indicando alta densidade celular e, consequente, dimuição dos nutrientes disponíveis. Outro indicador foi o aumento da quantidade total de ácidos graxos saturados nesta concentração de CO_2 em comparação com as outras. Isso sugere a possibilidade de utilizar altas concentrações de CO_2 em até 15% como ferramenta para melhorar a produção de lipídeos em cultivos de microalgas, o que motiva continuar a investigação do trabalho nessa direção. Dentre as microalgas avaliadas, *P. kessleri* e *Scenedesmus* sp. apresentaram os melhores resultados de crescimento e produção de biomassa, sendo candidatas promissoras para os ensaios em fotobiorreator. Já *C.vulgaris*, apesar de ter apresentado valores de velocidade máxima de crescimento próximos às outras, a concentração celular máxima foi aproximadamente 50% a da *P. kessleri*, além de ter apresentado uma fase de adaptação de quase 5 dias sob 30% de CO_2. As diferentes composições de ácidos graxos indicaram que, dependendo da alga e das condições de cultivo, pode-se produzir quantidades bem diferentes de ácidos graxos. Portanto, as condições operacionais são determinantes na produção dos lipídeos para diferentes aplicações biotecnológicas.

CAPÍTULO 5

ESTUDOS CINÉTICOS EM FOTOBIORREATOR

5.1 INTRODUÇÃO

Durante os ensaios cinéticos em frascos agitados, discutidos no capítulo anterior, um experimento chamou a atenção após ser observada a produção de um pigmento avermelhado liberado para o meio extracelular ao final do cultivo de *P. kessleri* sob 5% de CO_2. Uma busca na literatura não mostrou nenhum relato de produção de pigmentos extracelulares por essa microalga, por isso optou-se por investiga-la em cultivos em fotobiorreator. Como essa microalga já foi reportada por possuir carotenoides intracelulares (MINHAS et al., 2016), partiu-se da hipótese de que este pigmento poderia ser um carotenoide.

Além disso, outras características interessantes dessa microalga levaram à sua escolha. Quando cultivada em fotobiorreator, *P. kessleri* tem como características altas velocidades de crescimento, tolerância a altas temperaturas, resistência ao estresse causado por cisalhamento, pouca adesão às superfícies do biorreator e baixa tendência em formar agregados. Estas características foram observadas em cultivo em larga escala em biorreator de camada fina, no intuito de simular a produção industrial de biomassa microalgal rica em lipídeos (LI et al., 2013). No entanto, em condições ótimas de cultivo, ou seja, em meio completo rico em nutrientes, esta microalga é conhecida por armazenar energia na forma de amido, ao invés de lipídeos. Havia a hipótese de que o amido poderia ser convertido a lipídeos para armazenamento de energia, porém esta hipótese não foi comprovada, mostrando que os lipídeos são sintetizados principalmente pela via *de novo* (FERNANDES et al., 2013).

Um estudo (LI et al., 2013) avaliou a indução da hiperprodução de lipídeos (60% em massa seca) em *P. kessleri* por diferenes estratégias. A melhor estratégia avaliada consistiu em rápido crescimento de *P. kessleri* com aeração com 2% de CO_2, em meio completo, para produzir biomassa suficiente (mais de 10 g L^{-1} em massa seca), seguido de diluição do meio de cultura (em 5 ou 10 vezes) para induzir o acúmulo de lipídeos. Em outro estudo, o máximo de biomassa atingido para a *Chlorella kessleri* foi com 6% de CO_2 (DE MORAIS; COSTA, 2007; KLINTHONG et al., 2015). Em relação à composição dos lipídeos, *P. kessleri* produziu grandes quantidades de 16:0 (59,1%) (MINHAS et al., 2016). Nesse mesmo estudo, as

produtividades de astaxantina e luteína da *P. kessleri* foram 0,07 mg $L^{-1}d^{-1}$ e 0,04 mg L^{-1} d^{-1}, respectivamente, e o teor de luteína foi 0,28 mg g^{-1} (m.s.) (MINHAS et al.., 2016).

Outros produtos de alto valor e com importantes aplicações (tais como agentes antivirais, antioxidantes, propriedades anti-inflamatórias, lubrificantes em juntas ósseas (RAPOSO; DE MORAIS; DE MORAIS, 2013)) são os polissacarídeos, os quais podem ser constituintes da parede celular ou moléculas de armazenamento de energia. Esses polissacarídeos, ou exopolissacarídeos (no caso de serem liberados ao meio extracelular) são compostos por uma variedade de moléculas poliméricas de carboidratos. No cultivo de *P. kessleri*, o principal componente do extrato aquoso é um exopolissacarídeo, o qual foi caracterizado como sendo composto pelos monômeros arabinose (4,7%), ramnose (4,0%), xilose (1,7%), manose (22,5%) e galactose (67,1%). Esses exopolissacarídeos derivados de *P. kessleri* contêm materiais bioativos citotóxicos, os quais inibiram o crescimento do carcinoma de cólon em ratos (ISHIGURO et al., 2017).

Este capítulo relata o estudo da microalga *P. kessleri* em cultivos em fotobiorreator sob diferentes concentrações de CO_2, a fim de verificar as condições mais promissoras para produção de biomassa e bioprodutos (lipídeos e pigmentos extracelulares), bem como as cinéticas de crescimento e formação desses bioprodutos. Além das características já apontadas aqui, indicando a possibilidade de melhoramento do acúmulo de lipídeos e formação de outros bioprodutos de interesse, essa microalga apresentou os melhores resultados de crescimento e produção de biomassa em comparação com os outros isolados, apresentados no capítulo anterior. Outra candidata foi a *Scenedesmus* sp., a qual foi avaliada em ensaios preliminares em fotobiorreator, que serão também discutidos neste capítulo.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

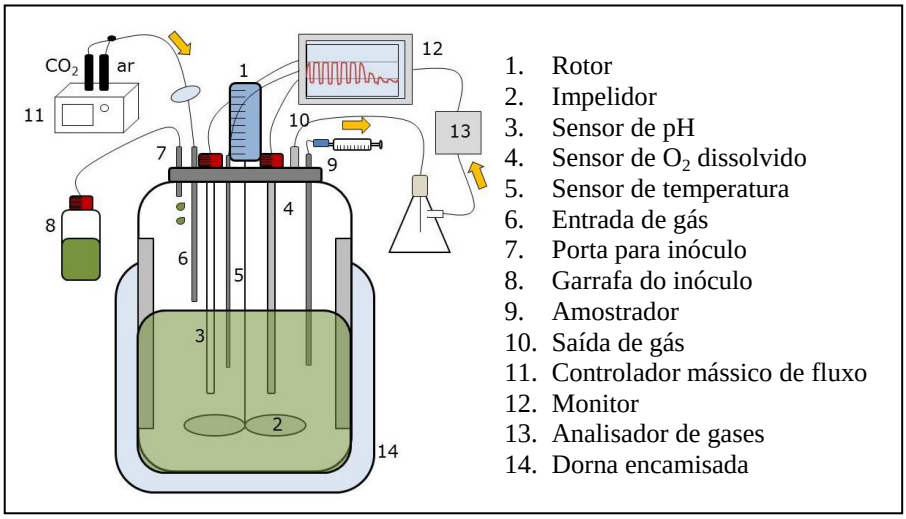
5.2.1 Configuração dos fotobiorreatores

Dois biorreatores idênticos do tipo tanque agitado (Infors HT), encamisados, e com 3,6 L de volume total, foram montados de modo que o volume útil máximo fosse de 2 L e a aeração ocorresse em sua atmosfera interna, e não no líquido, a fim de reproduzir o que foi feito nos ensaios em frascos agitados. A agitação foi promovida por impelidor de lâmina inclinada para células sensíveis, garantindo um baixo cisalhamento para não quebrar as células. Dois painéis idênticos contendo lâmpadas LED (3.500 K) foram construídos de modo

a serem divididos em 4 partes com 12 módulos de LEDs cada, cada módulo com 3 lâmpadas. Cada painel foi ligado a uma fonte chaveada de 12 V e 5 A, e a intensidade luminosa controlada por um *dimmer* analógico. Cada painel foi acoplado ao redor da dorna de cada reator, e várias medidas de intensidade luminosa em diferentes posições no interior dos reatores (ao menos 5 medidas para cada uma das 5 posições) foram realizadas (com a camisa do reator passando água) utilizando um luxímetro (CEM DT-1301). A luminosidade foi sendo ajustada durante as medidas a uma média de 1700 lux (aproximadamente 44 µmol m^{-2} s^{-1}) utilizando o *dimmer*, o qual, após o ajuste, manteve seu ponteiro fixo de modo a não alterar a intensidade luminosa ao longo dos cultivos. A Figura 5.1 mostra a disposição das lâmpadas LED no interior da dorna do reator, enquanto a Figura 5.2 apresenta o desenho esquemático dos reatores utilizados.

Figura 5.1 Interior da dorna do reator com as lâmpadas LED acesas

Figura 5.2 Desenho esquemático do biorreator utilizado nos experimentos



5.2.2 Determinação actinométrica das taxas de emissão de fótons

Como a iluminação do biorreator é primordial no cultivo de microalgas, e este parâmetro não deve se alterar durante os experimentos, foi realizado um experimento de actinometria para verificar a incidência de fótons no interior dos reatores, utilizando o actinômetro de ferrioxalato, descrito por (BRAUN; MAURETE; OLIVEROS, 1991). Cada reator, previamente coberto para operar no escuro, foi preenchido com 1,5 L da solução fotossensível do actinômetro (ácido oxálico di-hidratado ($H_2C_2O_4.2H_2O$) 0,75 mol L^{-1} e sulfato férrico penta-hidratado ($Fe_2(SO_4)_3.5H_2O$) 0,075 mol L^{-1}), a qual foi preparada em sala escura. Antes de iniciar o experimento, preparou-se 1 L de solução complexante (ácido acético 0,5 mol L^{-1}, acetato de sódio 0,5 mol L^{-1} e 1,10-fenantrolina 0,01 mol L^{-1}). Quinze frascos âmbar, numerados de 0 a 14, foram preenchidos com 24,75 mL dessa solução complexante, deixando 0,25 mL para a alíquota a ser coletada do reator, totalizando 25 mL. O ponto "0" do início do experimento foi coletado e então o sistema de LEDs do reator foi ligado, acionando ao mesmo tempo o cronômetro. A cada 10 min, alíquotas de 0,25 mL foram coletadas dos reatores, adicionadas ao frasco correspondente contendo a solução complexante, agitadas e numeradas sucessivamente a partir do número 1. A reação global da redução fotoinduzida de íons férricos a íons ferrosos pelo oxalato está representada pela Equação 5.1.

$$2\ Fe^{3+} + C_2O_4^{2-} + h\nu \rightarrow 2\ Fe^{2+} + 2\ CO_2 \qquad (5.1)$$

Os frascos permaneceram em repouso por 1 h para garantir a completa reação entre o actinômetro e a fenantrolina. Então, a absorbância a 510 nm de cada amostra foi medida utilizando um espectrofotômetro (Varian Cary® 50). A concentração de íons ferrosos reagidos foi calculada a partir de uma curva de calibração previamente realizada utilizando o mesmo espectrofotômetro (METOLINA, 2018). A taxa de emissão de fótons foi determinada através do rendimento quântico da reação de formação desse íon, igual a 1,25 mols de Fe^{2+} por mols de fótons (HATCHARD; PARKER, 1956).

5.2.3 Validação do sistema de fotobiorreatores com *Scenedesmus* sp.

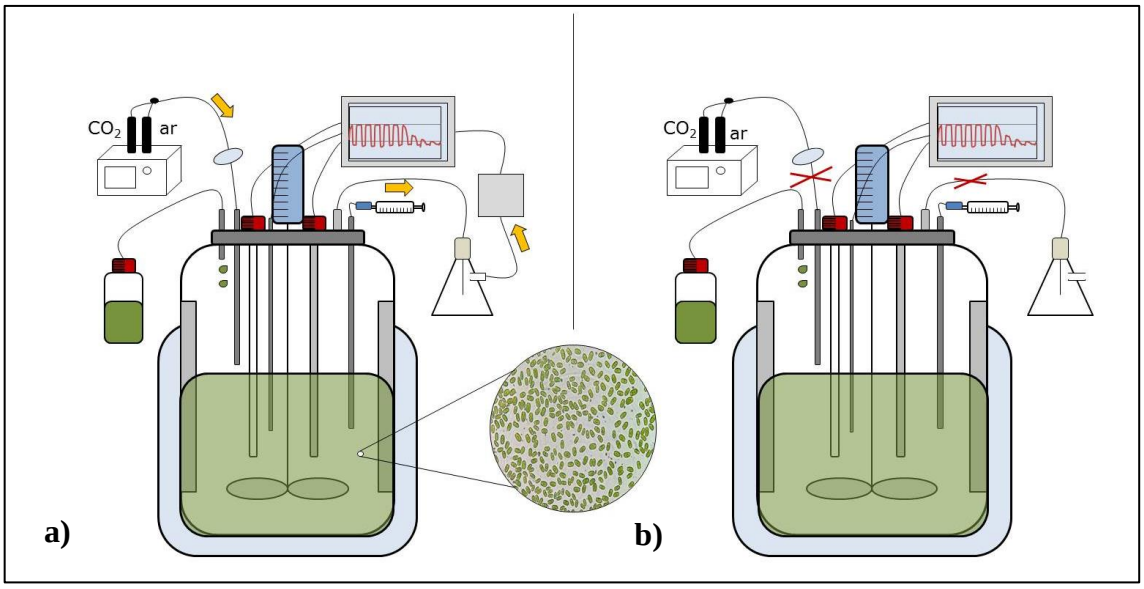
A microalga *Scenedesmus* sp. foi considerada robusta e apresentou altos valores de produção de biomassa nos ensaios em frascos agitados. Assim, ela foi utilizada nos primeiros

ensaios em fotobiorreator de forma a avaliar a melhor configuração para o fornecimento de CO_2 ao fotobiorreator. Duas configurações foram testadas: a primeira passando ar enriquecido com 5% de CO_2 continuamente no espaço livre do reator a uma vazão de 0,5 L min^{-1}, controlado utilizando um controlador mássico de fluxo (MKS Instruments); a outra similar à primeira, porém a atmosfera no interior do reator era trocada diariamente passando ar enriquecido com 5% de CO_2 durante 30 min (no período claro), à mesma vazão, e fechando a entrada e a saída de gases do reator após esse processo. A última configuração foi baseada na hipótese de que o consumo de CO_2 pela microalga é muito baixo quando comparado ao CO_2 disponível (quando trabalhando com concentrações a partir de aproximadamente 5%), fazendo com que o CO_2 esteja em excesso e o seu fornecimento diário seja suficiente para manter a concentração de CO_2 no interior do reator praticamente constante.

Esse baixo consumo de CO_2 pelas microalgas foi mostrado em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa. DA SILVEIRA (2015) conduziu estudos matemáticos de simulação para consumo de CO_2 por microalgas em reator piloto do tipo lagoa aberta. Os resultados mostraram que o consumo máximo de CO_2 em um reator com volume de 0,5 m^3, altura de 0,10 m e concentração de microalgas de 0,2 kg m^{-3} foi de apenas 6.10^{-5} mol s^{-1}. Comparando com uma vazão real média de adição de CO_2 de 1,5 L min^{-1} a 25°C e 1 atm no reator de 500 L, expressa em 1.10^{-3} mol s^{-1}, a vazão de adição de CO_2 teoricamente é 17 vezes o consumido pelo crescimento máximo da biomassa.

A Figura 5.3 apresenta o desenho esquemático das duas configurações descritas, a contínua e a intermitente (não contínua).

Figura 5.3 Desenho esquemático das configurações de operação dos biorreatores para cultivo de microalgas: a) aeração contínua e b) aeração intermitente



Os reatores operaram em modo batelada, sendo preenchidos inicialmente com 1,5 L de meio WC sem tampão e vitaminas (ANDERSEN et al., 2004). Foram inoculados 150 mL da microalga *Scenedesmus* sp., calculado para DO_{750nm} inicial de 0,1. A temperatura utilizada foi de 28°C e a agitação foi 120 rpm. A luminosidade foi controlada (14h/10h claro/escuro) com o painel de LEDs ao redor da dorna, com intensidade luminosa média no interior do reator de 1.700 lux (aproximadamente 40 µmol fótons $s^{-1}m^{-2}$). Sensores de pH e pO_2 (Mettler Toledo) permitiram o acompanhamento da evolução desses parâmetros, pH e oxigênio dissolvido, respectivamente. Foram monitorados também os parâmetros de concentração de CO_2 e O_2 na saída do reator, utilizando um analisador de gases (Infors HT), somente para a configuração com aeração contínua. O crescimento das microalgas foi monitorado a cada 24 h por 12 dias através de coletas de 10 a 15 mL de amostra para quantificar a produção de biomassa por medidas de absorbância em espectrofotômetro (UV-2600, Shimadzu) a 680 nm e 750 nm e concentração em massa seca, bem como avaliar o teor de clorofila. No último dia de cultivo, a biomassa foi destinada à análise de composição lipídica e à análise elementar (C,N,H).

5.2.4 Cultivo da microalga *P. kessleri* em fotobiorreator sob diferentes concentrações de CO_2

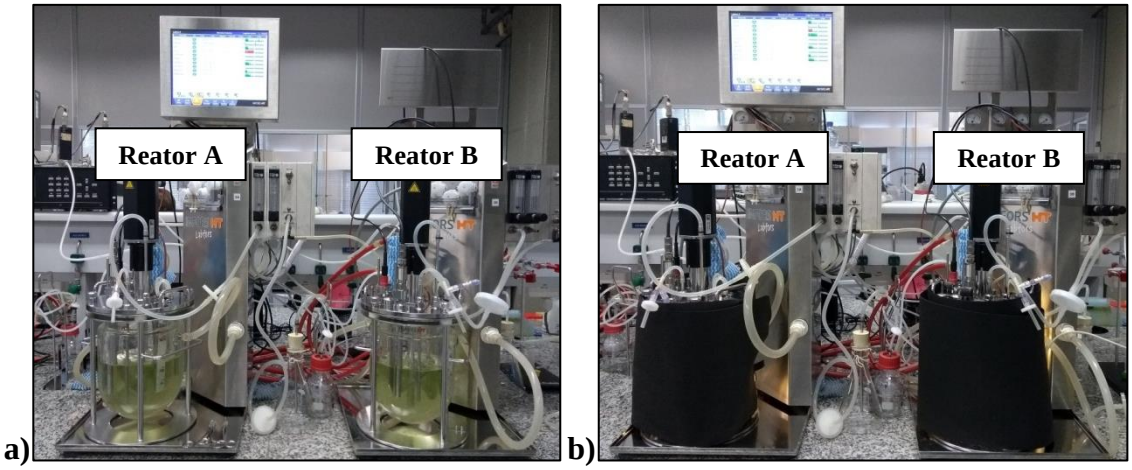
A microalga *P. kessleri* foi cultivada em fotobiorreator, em duplicatas ao mesmo tempo (reatores A e B) e em duplicatas em tempos diferentes, para cada condição de CO_2

avaliada (5, 15 e 30% de CO_2). Exceto pela concentração de CO_2, a qual foi controlada por controlador de fluxo mássico (MKS Instruments), os outros parâmetros (temperatura, agitação, luminosidade, meio de cultura, volume inicial, volume de inóculo e densidade de células inicial) foram os mesmos do ensaio anterior (item 5.2.3). A Tabela 5.1 apresenta a denominação dos ensaios, e a Figura 5.4 a foto dos reatores em uso, com e sem o painel de LEDs em torno da dorna.

Tabela 5.1 Denominação dos ensaios em fotobiorreator de acordo com a concentração de CO_2

Concentração de CO_2 (%)	**Ensaio**	**Reator**	**Nome do ensaio**
5	3	A	R3A
		B	R3B
	6	A	R6A
		B	R6B
15	4	A	R4A
		B	R4B
	7	A	R7A
		B	R7B
30	5	A	R5A
		B	R5B
	8	A	R8A
		B	R8B

Figura 5.4 Biorreatores utilizados nos experimentos: a) sem painel luminoso e b) com painel luminoso ao redor da dorna e coberto com folha de PVA preta para não dissipar a luz



Como relatado anteriormente, durante os ensaios cinéticos em frascos agitados, um experimento chamou a atenção após ser observada a produção de um pigmento avermelhado liberado para o meio extracelular ao final do cultivo de *P. kessleri* sob 5% de CO_2 (Figura 5.5). Após verificar o que havia sido feito de diferente nesse experimento, percebeu-se que nos últimos dois dias de cultivo a troca da atmosfera no interior dos frascos não havia sido feita, condição essa que foi reprodutível em ensaios posteriores, confirmando que a interrupção do fornecimento de CO_2 nos últimos dias de cultivo foi crucial para a formação do pigmento. Esse modo de operação, com supressão de CO_2 ao final do cultivo, até onde se sabe, não foi descrito na literatura e foi constatado como uma condição imperativa para as células liberarem o pigmento ao meio extracelular.

Figura 5.5 Imagem de uma amostra coletada ao final do cultivo de *P. kessleri*, após separação das células por centrifugação, mostrando o sobrenadante avermelhado produzido

Nos ensaios em fotobiorreator, a aeração ocorreu de forma intermitente, 30 min a cada 24 h, até o 10º dia de cultivo, então os reatores foram mantidos fechados sem aerar até o 14º, quando se parou o ensaio e a biomassa foi recuperada, de modo a reproduzir o que foi feito nos ensaios com frascos agitados. O crescimento das microalgas foi monitorado a cada 24 h através de coletas de volumes de 10 a 15 mL de amostra, para quantificar a produção de biomassa por medidas de absorbância em espectrofotômetro (UV-2600, Shimadzu) a 680 nm e 750 nm e concentração celular em massa seca, bem como verificar o teor de clorofila. No último dia de cultivo, a biomassa foi destinada à análise de composição lipídica e à análise elementar (C,N,H), e o sobrenadante à posterior caracterização do pigmento.

5.2.5 Métodos analíticos e de análise dos dados

5.2.5.1 Cálculo das velocidades específicas máximas (μ_{max})

Como já descrito anteriormente no capítulo anterior, adotou-se o método simplificado para obtenção de μ_{max} através do coeficiente angular da reta que passa pelos pontos referentes à fase exponencial nos gráficos de ln(DO_{750nm}) em função do tempo para cada cultivo. Na fase exponencial, μ é máxima, constante e vale $(lnX - lnX_0)/t$, sendo X a concentração de células, que se relaciona linearmente com a DO_{750nm}.

5.2.5.2 Concentração de células em massa seca

Para a obtenção da concentração celular em massa seca, 10 mL da biomassa obtida ao final dos cultivos foram colocados em filtros 0,45 µm (Millipore) previamente secos em estufa por 12 h a 70°C e pesados até massa constante. A fase aquosa foi filtrada a vácuo e a biomassa molhada juntamente com o filtro foi seca em microondas por 10 min em baixa potência. Então, a biomassa seca com o filtro foi pesada até massa constante e subtraiu-se o peso do papel de filtro seco para obter somente a massa de células. A concentração celular foi calculada dividindo a massa obtida pelo volume utilizado. Todo esse processo foi realizado em duplicata para cada cultivo, obtendo-se assim a média entre as duas concentrações.

5.2.5.3 Análise do teor de lipídeos totais e perfil de ácidos graxos

Para a extração dos lipídeos utilizou-se o método Bligh&Dyer (BLIGH; DYER, 1959) modificado, detalhadamente descrito no capítulo anterior (itens 4.2.4 e 4.2.5). O teor de lipídeos totais foi obtido por gravimetria, e então o conteúdo total de lipídeos foi utilizado na reação de transesterificação para obtenção dos ésteres dos ácidos graxos, os quais foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, como descrito detalhadamente no capítulo anterior e também por (BREUER et al., 2013).

5.2.5.4 Análise do teor de clorofila por espectrofotometria na região do UV-Vis

O teor de clorofila foi determinado a cada 24 h a partir de volumes da cultura de 2 mL, 1 mL ou 0,5 mL, dependendo do tempo de cultivo e teor de biomassa. Esses volumes foram escolhidos para obter absorbâncias a 680 nm entre 0,1 e 0,7. O conteúdo em microtubos de 2 mL de cada amostra foi centrifugado a 10.000g por 3 min e a biomassa concentrada, descartando o sobrenadante. A biomassa precipitada foi extraída com 1,8 mL de metanol, resultando em volume final de aproximadamente 2 mL em cada microtubo, por 30 min no escuro a 45°C (PRUVOST et al., 2011). As amostras foram centrifugadas novamente a 10.000g por 3 min antes de serem analisadas. Medidas de absorbância foram realizadas a 652 nm, 665 nm e 750 nm. Absorbâncias a 652 nm e 665 nm tiveram seus valores corrigidos pela turbidez, subtraindo as absorbâncias a 750 nm. As concentrações de clorofila-a (Cl.a) e clorofila-b (Cl.b) foram determinadas de acordo com as Equações 5.2 e 5.3 (RITCHIE, 2006).

$$[Cl.a]\left[\frac{\mu g}{mL}\right] = 8.0962\, A_{652} + 16.5169\, A_{665} \tag{5.2}$$

$$[Cl.b]\left[\frac{\mu g}{mL}\right] = 27.4405\, A_{652} - 12.1688\, A_{665} \tag{5.3}$$

5.2.5.5 Análise do teor de clorofila por fluorescência

O uso de medidas de fluorescência da clorofila-a para examinar o desempenho fotossintético e o estresse em algas e plantas tem se difundido em diversos estudos. Após a observação de (KAUTSKY; HIRSCH, 1931) que mudanças na fluorescência induzida pela iluminação de folhas adaptadas ao escuro estão qualitativamente correlacionadas com mudanças na assimilação de CO_2, ficou evidente que, em algumas circunstâncias, as emissões de fluorescência em organismos fotossintetizantes podem estar correlacionadas com suas taxas fotossintéticas (BAKER, 2008). De fato, tem sido demonstrado que a fração de decréscimo da fluorescência de clorofila é linearmente relacionada à taxa de assimilação de CO_2 e é um indicador da atividade fotossintética (LICHTENTHALER et al., 2007).

À temperatura ambiente, a fluorescência da clorofila-a, em sua maioria, é emitida pelo PSII (fotossistema II). Sob condição de baixa intensidade luminosa, em elevados rendimentos quânticos, cerca de 97% da energia dos fótons absorvidos é usada no processo fotoquímico para produzir ATP e NADPH, 2,5% é transformada em calor e 0,5% é reemitida como fluorescência. Esta fluorescência emitida pelo PSII pode ser detectada por um fotodetector sensível aos comprimentos de onda na região de 680 nm (BAKER, 2008).

A detecção de clorofila por fluorescência foi feita utilizando a biomassa de microalga fresca logo após a coleta de amostra, diariamente durante todo o período de cultivo. A amostra coletada foi diluída ou concentrada para uma DO_{680nm} de 0,2. No espectrômetro de fluorescência (F900, Edinburgh Instruments), a amostra foi excitada em 433 nm e todos os espectros foram obtidos na faixa de comprimentos de onda de 450 a 800 nm, utilizando uma abertura de 5 nm tanto para a fenda de excitação como para a de emissão, e resolução de 1 nm (intervalo entre os comprimentos de onda). O espectro final foi a média de 3 repetições.

5.2.5.6 Análise elementar (C,N,H)

A análise elementar é uma técnica para determinação das porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio em uma amostra. Seu funcionamento é baseado no método de Pregl-Dumas (PATTERSON, 1973), em que as amostras são sujeitas à combustão em uma atmosfera de oxigênio puro, e os gases resultantes dessa combustão são quantificados em um detector TCD (detector de condutividade térmica).

As amostras de biomassa seca de cada cultivo foram coletadas para análise dos elementos C, N e H, sendo necessários no mínimo 5 mg de cada. As análises foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química - USP, utilizando o equipamento Perkin Elmer 2400 series ii.

5.2.5.7 Cálculo da taxa de fixação de CO_2

O cálculo da fixação de CO_2 é dado pela Equação 5.5 (KASSIM; MENG, 2017), na qual PCO_2 é a taxa de fixação e MCO_2 e MC representam os pesos moleculares do CO_2 (44 g mol^{-1}) e C (12 g mol^{-1}), respectivamente. C_C é a média do teor de carbono de acordo com a análise elementar e P (g $L^{-1}d^{-1}$) é a produtividade de biomassa de microalga (Equação 5.4).

$$P = \frac{C_{final} - C_{inicial}}{t_{final} - t_{inicial}} \tag{5.4}$$

$$PCO_2 = C_C\, P\, x \left(\frac{MCO_2}{MC}\right) \tag{5.5}$$

5.2.5.8 Análise do teor de carotenoides totais

Os carotenoides em solução obedecem à lei de Lambert-Beer, na qual a absorbância é diretamente proporcional à concentração. Dessa forma, os carotenoides podem ser relativamente quantificados espectrofotometricamente (PAVIA et al., 2016). O teor de carotenoides totais no sobrenadante das amostras de todos os cultivos foi estimado por espectrofotometria UV-Vis (UV-2600, Shimadzu) em 450 nm, com coeficiente de absortividade molar de 2.500 (BRITTON, 1985) (Equação 5.6).

$$Teor\ de\ carotenoides\ (\mu g/mL) = \frac{A.10^4}{A_{1cm}^{1\%}.V} \quad (5.6)$$

V é o volume de amostra bruta que fornece a absorbância A em 450 nm e $A_{1cm}^{1\%}$ é o coeficiente de absortividade molar.

5.2.5.9 Análise estatística e softwares

A partir dos valores obtidos experimentalmente, os diversos parâmetros foram calculados empregando-se o programa *Excel Microsoft 2010* e as análises estatísticas foram realizadas no programa *Prism 3.0* através dos testes de análise de variância (*One-way ANOVA*), sendo *Tukey* o pós-teste aplicado. Os gráficos foram plotados utilizando-se os *softwares Origin 2018b*, *Excel Microsoft 2010* ou *Prism 3.0*.

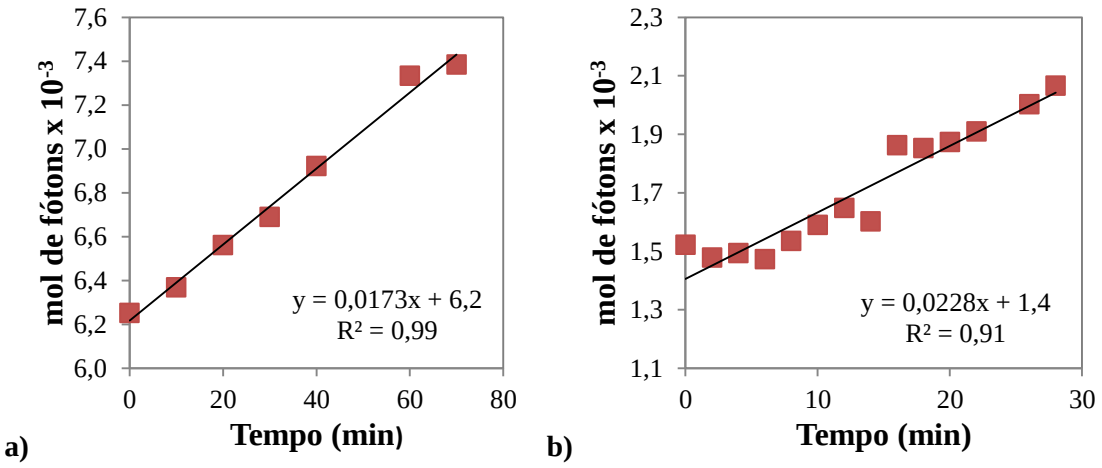
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Determinação actinométrica das taxas de emissão de fótons

A determinação espectrofotométrica das concentrações de íons Fe^{2+} foi realizada empregando-se curva padrão (APÊNDICE C), pela qual obteve-se o coeficiente de absorção molar de 10.505 L mol^{-1} cm^{-1} para o complexo Fe(II)-o-fenantrolina, valor que foi próximo ao reportado anteriormente por (HATCHARD; PARKER, 1956), de 11.100 L mol^{-1} cm^{-1}. A curva padrão foi utilizada para calcular as concentrações de íons Fe^{2+} em cada tempo de reação, as quais estão relacionadas com o número de mols de fótons dividindo cada valor obtido por 1,11 (HATCHARD; PARKER, 1956), rendimento quântico (íons/fóton) na região de emissão da lâmpada (APÊNDICE C).

Calculados os números de mols de fótons, foram obtidas as curvas de emissão de fótons por tempo para cada fotobiorreator (Figura 5.6).

Figura 5.6 Curvas de emissão de fótons por tempo referentes ao Reator A (a) e ao Reator B (b)



As taxas de emissão de fótons em cada fotobiorreator foram obtidas pelo coeficiente linear das curvas de emissão, fazendo-se as devidas conversões de unidade de tempo, e os resultados estão apresentados na Tabela 5.2. As taxas específicas de emissão de fótons na tabela foram obtidas dividindo-se as taxas de emissão de fótons pelo volume de solução fotossensível em cada reator (1,5 L).

Tabela 5.2 Taxas de emissão de fótons referentes aos fotobiorreatores A e B

Fotobiorreator	**Taxa de emissão de fótons (Einstein s^{-1})**	**Taxa específica de emissão de fótons (Einstein L^{-1} s^{-1})**
A	$2,36 \times 10^{-6}$	$1,57 \times 10^{-6}$
B	$3,01 \times 10^{-6}$	$2,01 \times 10^{-6}$

A unidade [Einstein] é definida pela energia de um mol de fótons, então a unidade da taxa de emissão de fótons é [Einstein s^{-1}]. As curvas de emissão de fótons para os dois fotobiorreatores apresentaram coeficientes com a mesma ordem de grandeza, porém a taxa de emissão de fótons obtida para o fotobiorreator B foi aproximadamente 27,5% maior do que para o A. Provavelmente essa diferença se deve ao ajuste manual do *dimmer* analógico durante as medidas de luminosidade, para que ambos os reatores tivessem a mesma luminosidade. Apesar dessa diferença, considerou-se que os dois fotobiorreatores são similares em relação à emissão de fótons.

5.3.2 Validação do método de operação dos fotobiorreatores utilizando a microalga *Scenedesmus* sp.

Para essa avaliação, empregou-se o modo contínuo, no qual ar enriquecido com 5% de CO_2 foi aspergido continuamente na atmosfera interna do reator a uma vazão de 0,5 L min^{-1}. O outro modo de aeração foi o intermitente, no qual esse processo de aeração era feito somente durante 30 min ao dia, durante o período claro, o que em hipótese seria suficiente para manter a concentração de CO_2 na atmosfera do reator praticamente constante, já que o consumo de CO_2 pela microalga é relativamente baixo, como calculado por DA SILVEIRA (2015).

5.3.2.1 Avaliação dos perfis de pH e oxigênio dissolvido

Uma das vantagens de se realizar o cultivo de microalgas em fotobiorreator é a possibilidade de monitorar, em tempo real, o pH e o oxigênio dissolvido ao longo do cultivo, o que fornece importantes informações sobre o comportamento da microalga em determinadas condições operacionais. Esse monitoramento é realizado utilizando sensores desses dois parâmetros, os quais devem ser calibrados previamente ao início do cultivo. O sensor de oxigênio dissolvido, particularmente, é calibrado da seguinte forma: após a estabilização das condições operacionais do reator (temperatura, agitação e aeração) marca-se o ponto “100%”, então as oscilações de oxigênio dissolvido são determinadas a partir dessa calibração e fornecidas em valores de porcentagem. Neste experimento, a calibração foi feita passando-se ar enriquecido com 5% de CO_2, então esta foi a condição chamada de “100%”. Nessa condição, a pressão parcial do O_2 é aproximadamente 0,1995 atm, a qual foi utilizada para o cálculo da concentração de oxigênio dissolvido através da lei de Henry (Equação 5.7), assumindo que o sistema atingiu a saturação e a solução é muito diluída (SCHMIDELL; LIMA; AQUARONE; BORZANI, 2001).

$$C_{o_2} = H \, . \, p_g \tag{5.7}$$

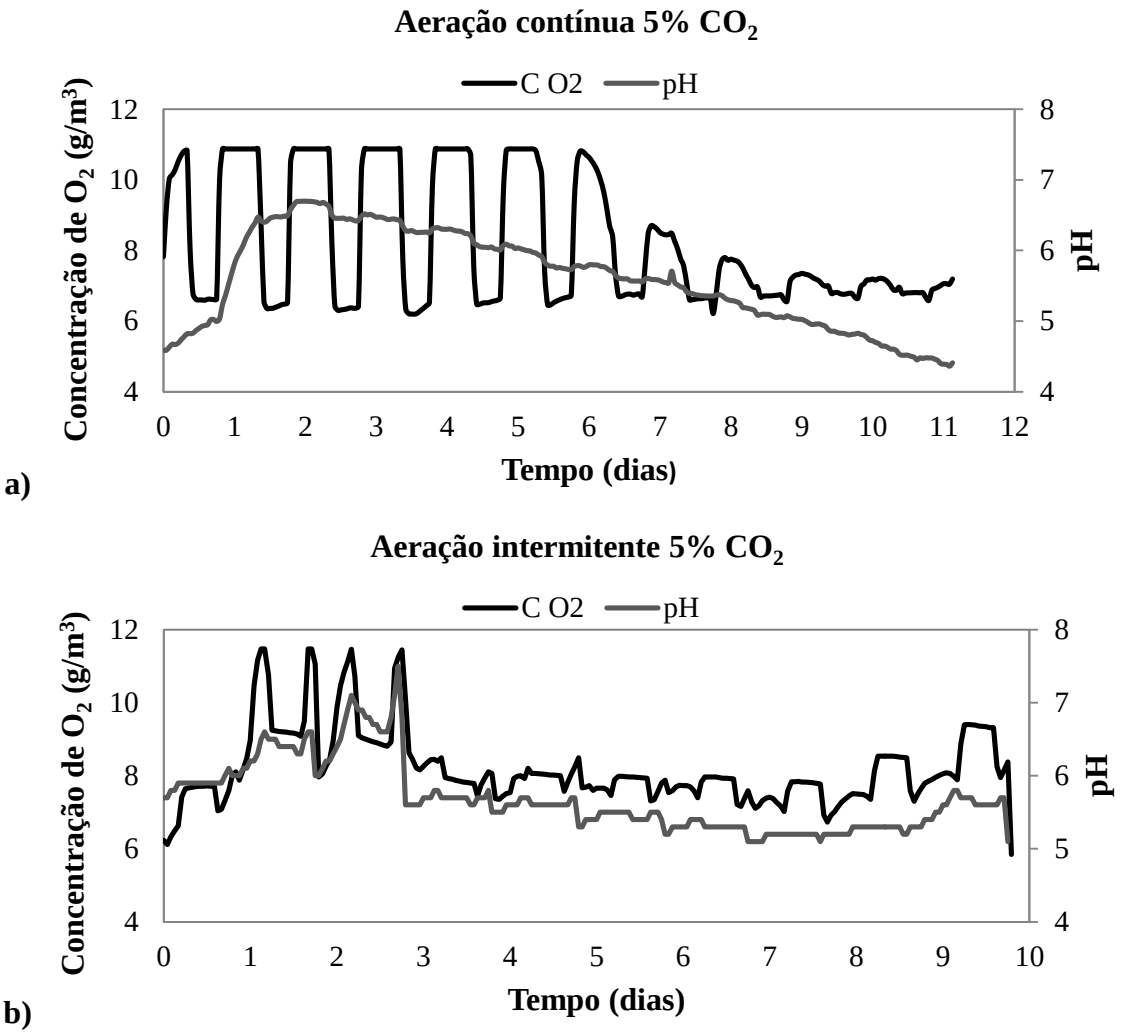
Onde: C_{O_2} = concentração de oxigênio na saturação (gO_2/m^3)

H = constante de Henry (gO_2/m^3. atm), aproximadamente 37,1 a 28°C

p_g = pressão parcial de O_2 na fase gasosa (atm)

Fazendo-se os cálculos, a C_{O_2} na saturação sob 5% CO_2 é de aproximadamente 7,4 g/m^3 (ou mg/L). Dessa forma, a C_{O_2} foi calculada para todos os valores de porcentagem de oxigênio dissolvido a cada 15 min durante todo o cultivo no reator, fornecendo o perfil de oxigênio dissolvido ao longo do cultivo. A Figura 5.7 apresenta tais perfis de oxigênio dissolvido e pH durante os cultivos sob aeração contínua (Fig. 5.7a) e intermitente (Fig. 5.7b).

Figura 5.7 Perfis de oxigênio dissolvido (C_{O_2}) e pH durante o cultivo de *Scenedesmus* sp. em fotobiorreator sob aeração contínua a 5% CO_2 (a) e sob aeração intermitente a 5% CO_2 (b)



Durante o crescimento fototrófico, no ciclo claro, microalgas consomem CO_2 e produzem O_2. Por outro lado, no ciclo escuro, ocorre a respiração, na qual as microalgas consomem O_2 e produzem CO_2. Essas variações de produção/consumo de O_2 foram observadas em ambas as condições operacionais de cultivo. No entanto, sob aeração contínua, como CO_2 e ar eram constantemente repostos no reator durante todo o cultivo, as variações de

oxigênio dissolvido eram devidas somente à atividade das microalgas em produzir/consumir O_2. Portanto, é possível verificar os ciclos claro/escuro muito bem definidos nessa condição, sendo que no período de maior atividade fotossintética, entre o primeiro e o sexto dia de cultivo, a C_{O_2} atingiu valores máximos de aproximadamente 11 g/m^3. Após esse período, a C_{O_2} decaiu a cada dia até o final do cultivo.

No cultivo sob aeração intermitente, os "pulsos" de ar enriquecido com CO_2 ocorreram por 30 min a cada 24 h durante os períodos claros, então a variação de O_2 não foi somente devida à atividade das microalgas, pois o ar não era constantemente reposto. Observa-se ainda assim os aumentos e quedas na concentração de oxigênio dissolvido devidos aos ciclos claro/escuro, porém os valores máximos de aproximadamente 11 g/m^3 foram atingidos do primeiro ao terceiro dia de cultivo, e depois os valores se mantiveram em torno de 8 g/m^3, aumentando um pouco no final do cultivo.

Sabe-se que o oxigênio produzido pode aumentar muito sua concentração dependendo das condições operacionais do reator, e isso produz um efeito negativo na produção de biomassa, inibindo o crescimento das células (KAZBAR et al., 2019). KAZBAR e colaboradores (2019) avaliaram a influência de diferentes concentrações de O_2 dissolvido na produção de biomassa em *C. vulgaris*, utilizando um fotobiorreator fechado em quimiostato, com taxa de diluição D = 0,02 h^{-1} e densidade de fluxo de fótons de 250 µmol m^{-2} s^{-1}. As concentrações de oxigênio dissolvido foram controladas variando-se a vazão de N_2 na corrente gasosa. Em valores de C_{O_2} entre 8 e 25 g/m^3, a influência na produtividade foi negligenciável, mas para C_{O_2}de 31 g/m^3 houve perda na produtividade de 30% (KAZBAR et al., 2019).

Dessa forma, pode-se dizer que em ambos os cultivos, sob aeração contínua ou intermitente, a concentração de oxigênio dissolvido não foi tão alta a ponto de inibir o crescimento das microalgas. Outro estudo avaliou a influência da concentração de oxigênio dissolvido na produção de ácido docosahexaenoico pela microalga marinha *Schizochytrium limacinum* SR21. Com nível de 50% de oxigênio em relação à saturação houve diminuição no pH e uma correlação negativa com o acúmulo de lipídeos, enquanto baixas concentrações de oxigênio (10% da saturação) foram determinantes para o acúmulo de lipídeos (CHI et al., 2009). Portanto, o monitoramento deste parâmetro é importante também para otimizar as condições a fim de favorecer o acúmulo de lipídeos nas microalgas.

Em relação ao pH, no cultivo sob aeração contínua o valor máximo alcançado foi aproximadamente 6,7 no dia 2, decaindo até 4,5 até o final do cultivo. Além disso, é possível

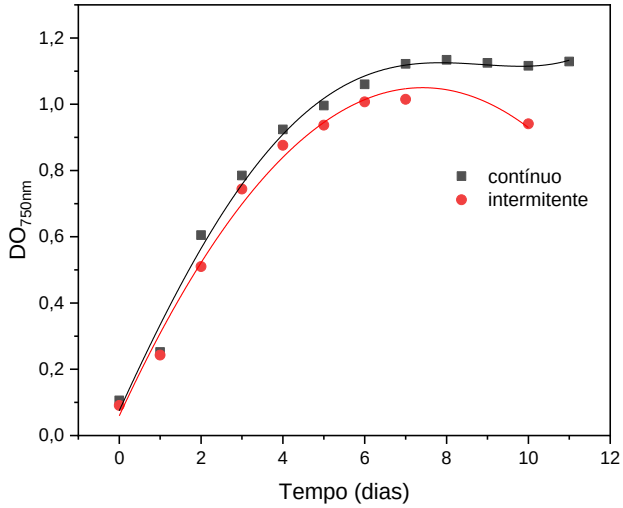
observar algumas oscilações devido aos ciclos claro/escuro. Os valores máximos de pH em torno do segundo dia de cultivo correspondem ao período de maior atividade fotossintética das microalgas, no qual estão crescendo à velocidade máxima. Dessa forma, o pH tende a aumentar com o aumento do crescimento pois mais microalgas consomem mais CO_2, e o equilíbrio da reação $HCO_3^- + H^+ \leftrightarrow CO_2 + H_2O$ é então deslocado para a formação de CO_2 e H_2O, diminuindo a concentração de H^+ e, consequentemente, aumentando o pH. Após a fase exponencial, o pH tende a cair, como foi observado (Figura 5.9), pois as microalgas crescem a uma velocidade reduzida, diminuindo também a atividade fotossintética. Da mesma forma, durante a respiração no período escuro, o pH tende a cair um pouco devido à produção de CO_2.

Já no cultivo sob aeração intermitente, o pH alcançou valores máximos em torno de 7,5 e mínimos em torno de 5,0, valores estes maiores do que os máximos e mínimos observados no cultivo sob aeração contínua. Tais resultados podem ser explicados pelo fato de que nesse cultivo o CO_2 foi reposto somente uma vez ao dia, deslocando ainda mais o equilíbrio para a formação de produtos, e assim aumentando o consumo de H^+ e, consequentemente, aumentando o pH. Além disso, é possível observar alguns pulsos, os quais correspondem aos momentos em que ocorreu a aeração do reator, apresentando quedas bruscas de pH.

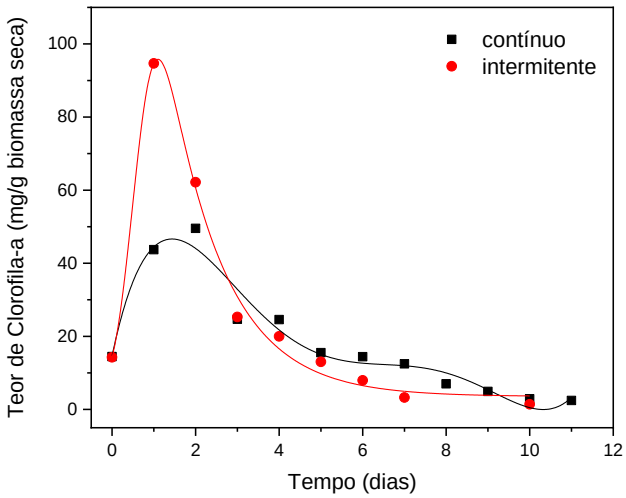
5.3.2.2 Avaliação dos parâmetros cinéticos e perfil de clorofila-a

A Figura 5.8 apresenta as cinéticas de crescimento da *Scenedesmus* sp. nas diferentes configurações dos reatores, bem como os perfis de clorofila-a ao longo dos cultivos. As cinéticas de crescimento (Figura 5.8a), obtidas através de medidas de DO a 750 nm (turbidez), apresentaram perfis semelhantes, com crescimento um pouco maior no cultivo sob aeração contínua. Já o perfil de clorofila-a apresentou valores máximos entre o primeiro e o terceiro dia, o que corrobora com os dados de pH, que apresentou valores máximos nesse período do cultivo, que corresponde à máxima atividade fotossintética. A Tabela 5.3 apresenta os valores de μ_{max} (obtidos pela inclinação da reta do gráfico de $\ln(DO_{750nm})$ em função do tempo durante a fase exponencial – APÊNDICE D), produção de biomassa no dia 10 de cultivo e taxa de fixação de CO_2. Os resultados completos da análise elementar estão apresentados no APÊNDICE D.

Figura 5.8 Cinéticas de crescimento de *Scenedesmus* sp. em fotobiorreator sob aeração contínua e intermitente a 5% CO_2 (a) e teor de clorofila-a ao longo dos cultivos (b)



a)



b)

Tabela 5.3 Velocidade máxima específica (μ_{max}), concentração em massa seca no dia 10 de cultivo (X) e taxa de fixação de CO_2 (PCO_2) no cultivo de *Scenedesmus* sp. sob aeração contínua ou intermitente a 5% de CO_2 e comparação com os ensaios em frascos agitados nas mesmas condições

	μ_{max} (dia^{-1})	**X (g L^{-1})**	**PCO_2 (mg L^{-1} d^{-1})**
Modo contínuo	0,87	0,47	78,67
Modo intermitente	0,74	0,38	63,85
Frascos agitados – modo intermitente	0,24	0,44	-

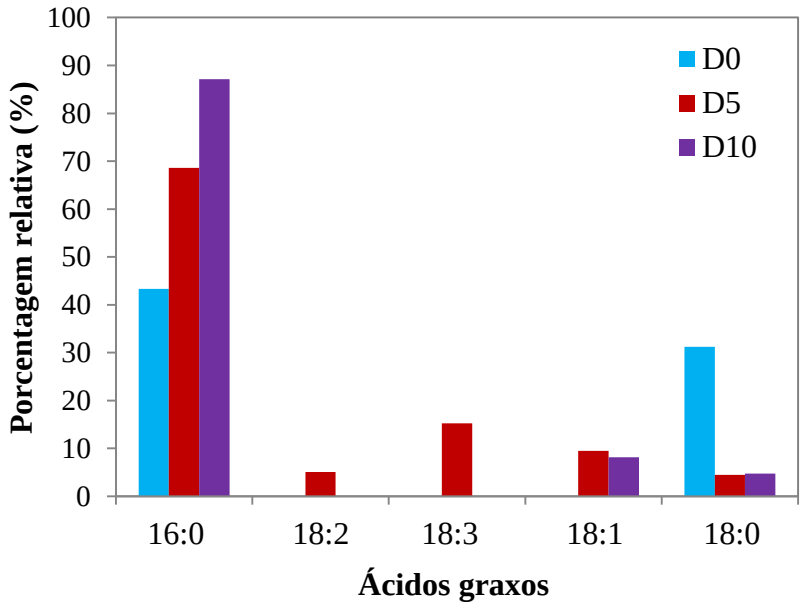
Apesar de cinéticas de crescimento semelhantes, μ_{max} foi aproximadamente 17% maior no modo de aeração contínua do que no modo intermitente. Além disso, a concentração de biomassa seca no dia 10 de cultivo foi também maior no modo contínuo e, portanto, a taxa de fixação de CO_2 foi maior também. Em relação aos ensaios em frascos agitados (Capítulo 4), nas mesmas condições de CO_2 e no mesmo período de cultivo, μ_{max} no modo intermitente foi aproximadamente 3 vezes maior, enquanto a produção de biomassa foi praticamente equivalente.

Apesar das poucas divergências entre os valores desses parâmetros analisados para os dois cultivos, pode-se assumir que o cultivo de microalgas em um fotobiorreator fechado, saturado com ar enriquecido com CO_2, e trocando a atmosfera diariamente, em vez de alimentá-lo continuamente a uma vazão definida, é igualmente eficiente nas condições operacionais avaliadas. Para outras formas operacionais, como concentração de CO_2 mais baixa ou alta densidade celular, esse modo de aeração deve ser reavaliado. Neste trabalho, no modo intermitente, menos CO_2 foi desperdiçado e liberado para a atmosfera, o que seria bastante significativo em cultivos com maiores concentrações de CO_2 do que 5%, por exemplo. Dessa forma, esse método foi adotado em todos os seguintes experimentos em fotobiorreator.

5.3.2.3 Avaliação do perfil de ácidos graxos em diferentes fases de crescimento

Com os ensaios em fotobiorreator foi possível coletar biomassa suficiente durante o cultivo para realizar a extração dos lipídeos e verificar a composição de ácidos graxos em diferentes fases do crescimento. A Figura 5.9 apresenta a porcentagem relativa de ácidos graxos, isto é, a relação entre o ácido graxo em questão e o total de ácidos graxos, dos cinco ácidos graxos presentes em maior quantidade na biomassa coletada, em diferentes dias, durante o crescimento da *Scenedesmus* sp. sob 5% de CO_2 em sistema de aeração contínua.

Figura 5.9 Composição relativa dos principais ácidos graxos detectados em diferentes fases de crescimento (dias 0, 5 e 10 - D0, D5 e D10) de *Scenedesmus* sp. sob 5% de CO_2 em sistema de aeração contínua



A composição lipídica de microalgas pode variar de acordo com as condições de cultivo e também durante as diferentes fases de crescimento. Em geral, células em crescimento exponencial apresentam maiores quantidades de ácidos graxos insaturados, enquanto que na fase de declínio, com falta de nutrientes e alta densidade celular, estes são normalmente consumidos como fonte de energia, provocando o acúmlo de SFA (RENAUD et al., 1995; LIM et al., 2012).

Nesse estudo, como observado em outros ensaios, o ácido graxo presente em maior quantidade foi o ácido palmítico (16:0), e a sua porcentagem relativa aumentou conforme o tempo de crescimento da cultura. Os ácidos graxos insaturados (18:2, 18:3 e 18:1) só foram detectados na fase intermediária de crescimento, no dia 5. Ao final do cultivo, no dia 10, foram detectados também 18:1 e 18:0, o qual decaiu desde o início do cultivo.

5.3.3 Ensaios cinéticos com a microalga *P. kessleri* em fotobiorreator sob diferentes concentrações de CO_2

5.3.3.1 Cinéticas de crescimento

As cinéticas de crescimento da *P. kessleri* em fotobiorreator sob diferentes concentrações de CO_2 estão apresentadas na Figura 5.10. Comparando as curvas, não se nota

grandes diferenças entre as cinéticas de crescimento sob 5 e 15% CO_2. No entanto, sob 30% CO_2 o crescimento foi notadamente um pouco menor do que nos outros casos. As velocidades específicas de crescimento foram obtidas pelos gráficos de ln(DO_{750nm}) em função do tempo (APÊNDICE E) durante a fase exponencial (Tabela 5.4).

Figura 5.10 Cinéticas de crescimento de *P. kessleri* em fotobiorreator sob aeração intermitente a 5, 15 e 30% CO_2. As barras de erro são os desvios padrões de 4 repetições

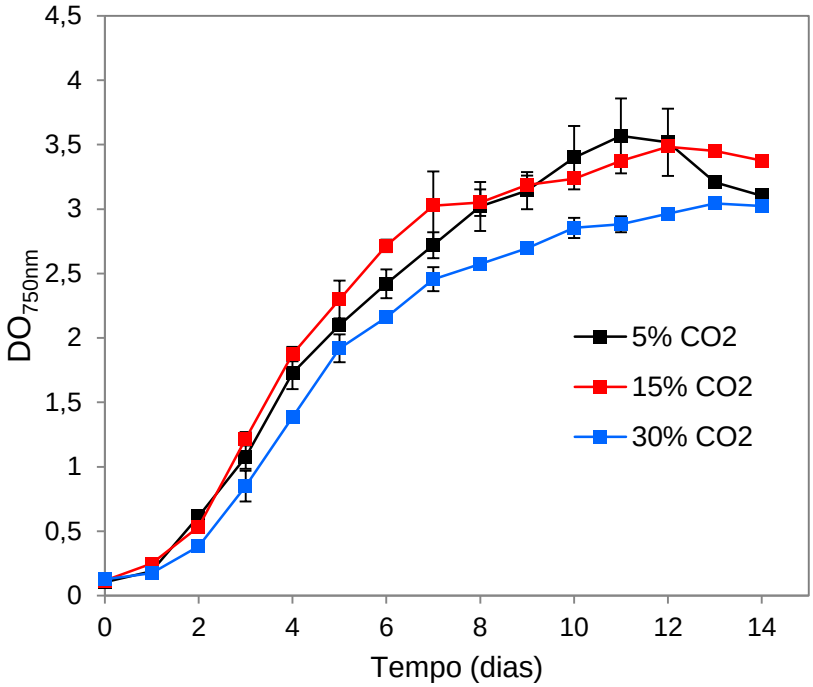


Tabela 5.4 Valores de velocidade máxima específica (μ_{max}) referentes aos cultivos da *P. kessleri* sob 5, 15 e 30% CO_2

Velocidade máxima específica (μ_{max}) [dia^{-1}]					
Ensaio	**5% CO_2**	**Ensaio**	**15% CO_2**	**Ensaio**	**30% CO_2**
R3A	0,81	R4A	0,85	R5A	0,92
R3B	0,82	R4B	0,74	R5B	0,81
R6A	0,66	R7A	0,66	R8A	0,69
R6B	0,66	R7B	0,72	R8B	0,69
Média	0,74 ± 0,09		0,74 ± 0,08		0,77 ± 0,11

As velocidades específicas de crescimento foram 0,74 ± 0,09, 0,74 ± 0,08 e 0,77 ± 0,11 dia^{-1} nos cultivos sob 5, 15 e 30% de CO_2, respectivamente, não apresentando diferença

significativa entre os valores ($p>0,05$). Apesar do crescimento da microalga ter sido mais lento sob 30% de CO_2 do que nas outras condições, aparentemente isso só é mais pronunciado após a fase exponencial, que ocorreu, em média, até o quarto ou quinto dia de cultivo (gráficos de $\ln(DO_{750nm})$ em função do tempo no APÊNDICE E). Contudo, os cultivos sob 30% de CO_2 apresentaram uma fase de adaptação de aproximadamente um dia, e, portanto, as células entraram na fase de crescimento exponencial somente depois do primeiro dia de cultivo, a qual terminou aproximadamente no terceiro dia. (DE MORAIS; COSTA, 2007) obtiveram resultados inferiores de velocidade específica máxima de crescimento com a microalga *Chlorella kessleri*: 0,257, 0,267, 0,267 e 0,199 dia^{-1} sob 0,04, 6, 12 e 18% de CO_2, respectivamente.

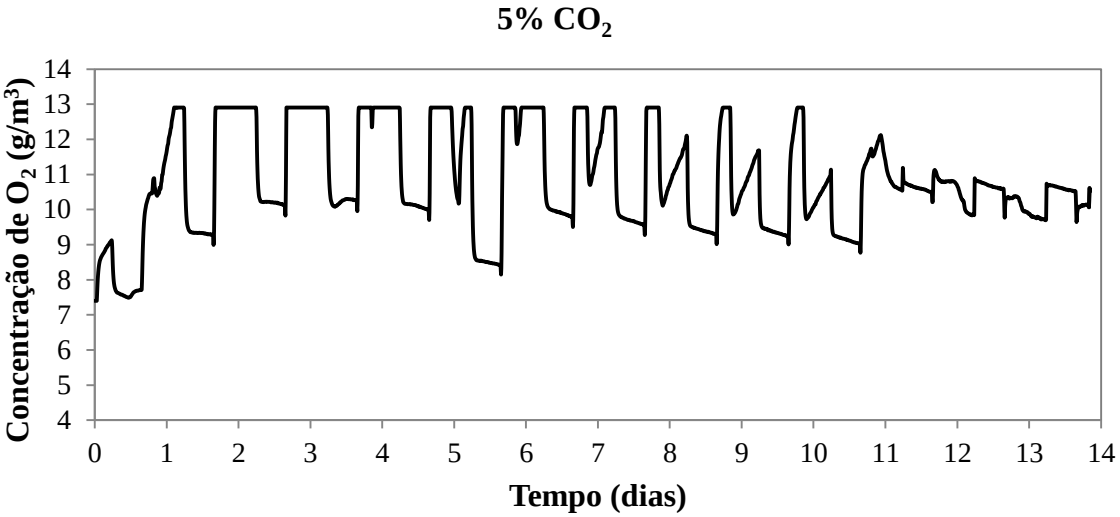
5.3.3.2 Avaliação dos perfis de pH e oxigênio dissolvido

Assim como discutido no item 5.3.2.1, oxigênio dissolvido e pH foram monitorados durante todo o cultivo através de sensores previamente calibrados. A calibração do sensor de O_2 foi feita após saturar a atmosfera do reator com a mistura de ar e CO_2 nas respectivas concentrações de 5, 15 e 30%, de acordo com o cultivo. Dessa forma, foi possível calcular as concentrações de oxigênio dissolvido ao longo dos cultivos utilizando a Equação 5.7 e os valores da Tabela 5.5. Os perfis de oxigênio dissolvido e pH referentes a cada cultivo estão apresentados nas Figuras 5.11 e 5.12, respectivamente.

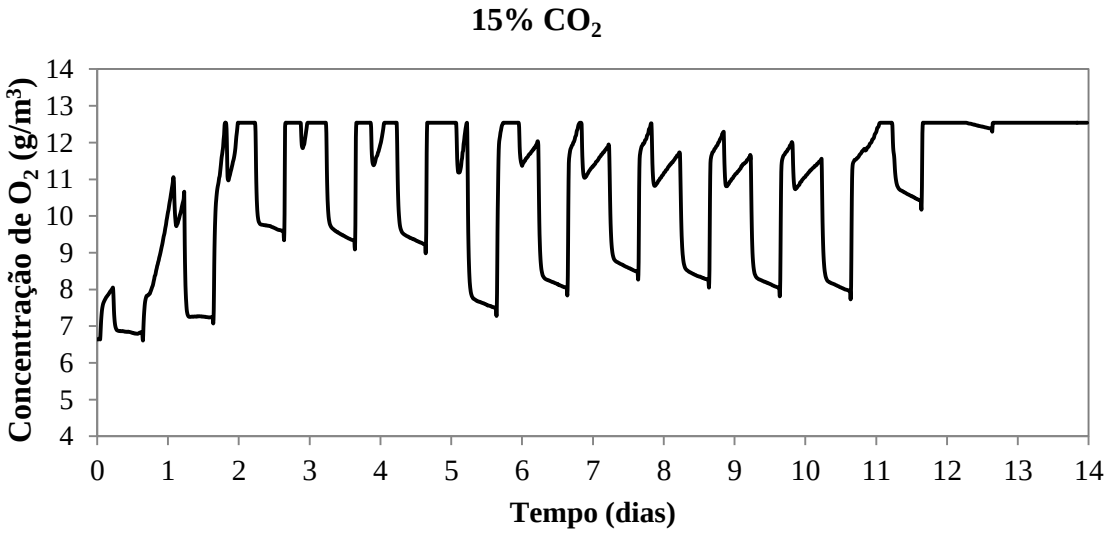
Tabela 5.5 Pressão parcial de O_2 e concentração de O_2 dissolvido na saturação, de acordo com a concentração de CO_2 na mistura com ar

Concentração de CO_2 (%)	**Pressão parcial de O_2 (atm)**	**Concentração de O_2 dissolvido na saturação (g/m^3)**
0,04	0,2095	7,8
5	0,1990	7,4
15	0,1781	6,6
30	0,1466	5,4

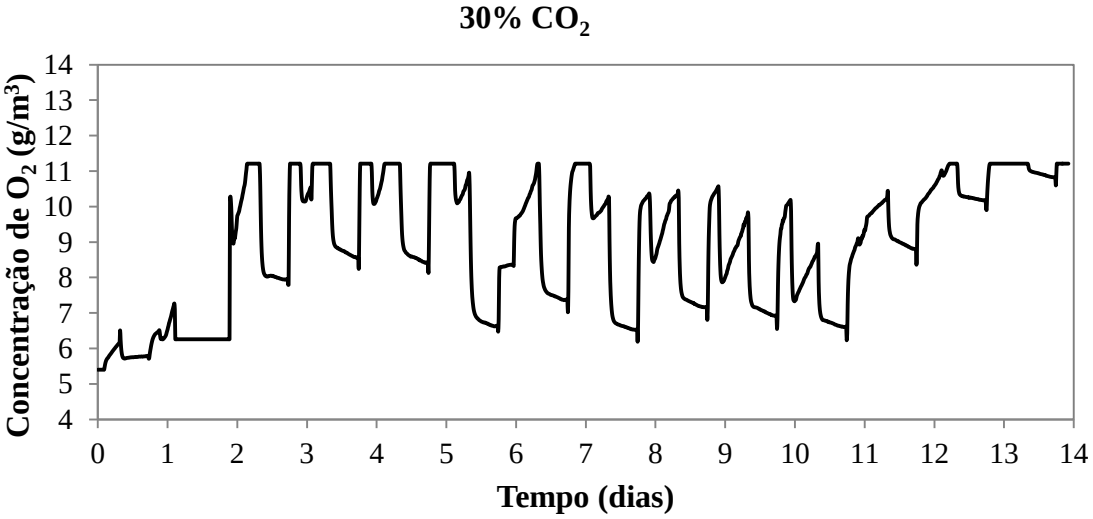
Figura 5.11 Perfis de oxigênio dissolvido durante os cultivos de *P. kessleri* em fotobiorreator sob aeração intermitente a 5% CO_2 (a), 15% CO_2 (b) e 30% CO_2 (c)



a)



b)

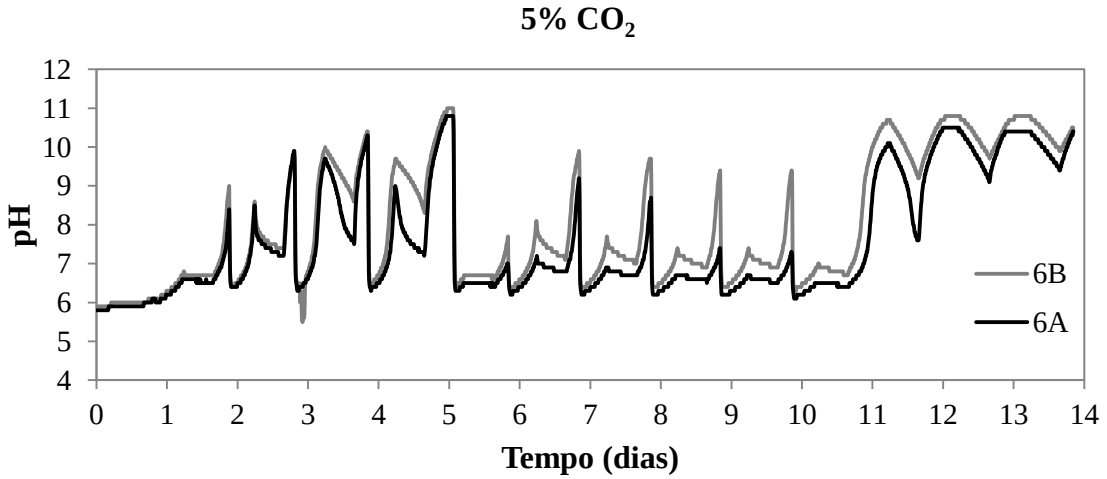


c)

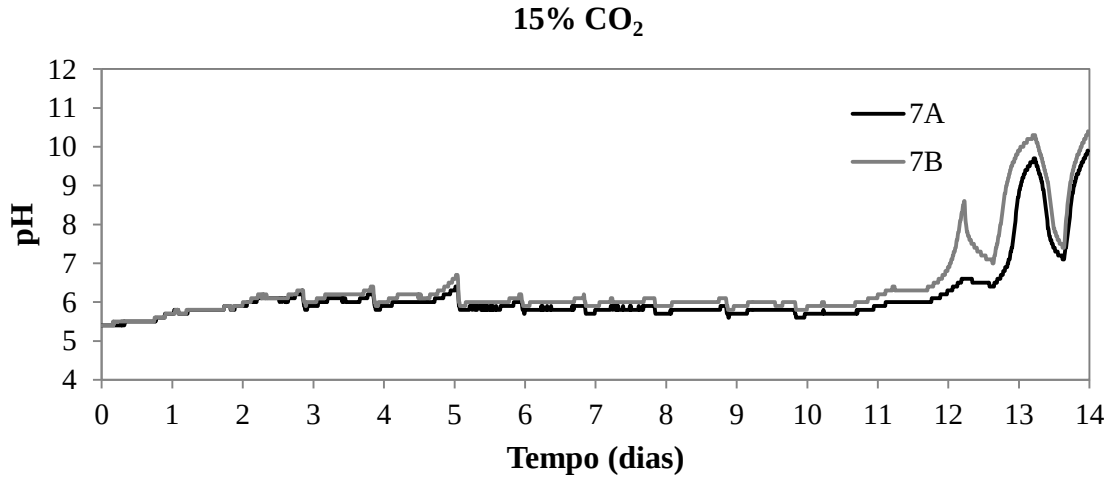
Os perfis de oxigênio dissolvido para todas as condições de CO_2 foram semelhantes, porém algumas particularidades foram observadas. Em 5% CO_2, o valor máximo de oxigênio dissolvido (aproximadamente 13 g/m^3) foi atingido no final do primeiro dia de cultivo. É possível observar durante os ciclos claros (nos máximos de O_2 dissolvido) o momento em que ar enriquecido com CO_2 foi reposto no reator, visto pela pequena queda na concentração de O_2, a qual depois é restabelecida até o início do ciclo escuro, onde se observa uma queda brusca na concentração de O_2, pois este é consumido na respiração. A partir dos dias 5 e 6 de cultivo, observa-se uma maior dificuldade das células em produzirem O_2, período no qual a atividade fotossintética já decaiu bastante, pois já passou a fase de crescimento exponencial. Nos cultivos sob 15 e 30% de CO_2, as concentrações máximas de O_2 foram observadas a partir do segundo dia de cultivo, com valores de aproximadamente 12,5 e 11 g/m^3, respectivamente.

Outro ponto a ser lembrado é que a aeração do reator diária ocorreu até o décimo dia de cultivo, e após esse dia o reator permaneceu com a entrada e a saída de gases fechadas. Nos perfis de O_2 dissolvido, pode-se observar essa mudança no modo de operação, pois o oxigênio alcançou novamente os níveis máximos (nos cultivos a 15 e 30% de CO_2). No cultivo a 5% de CO_2, os valores de O_2 continuaram a cair após o dia 10, provavelmente porque não havia CO_2 suficiente para ser consumido e as células produzirem grandes quantidades de O_2, diferentemente das outras condições. Contudo, não foi possível confirmar esta hipótese porque não foi possível medir a concentração de CO_2 na saída do reator utilizando o analisador de gás, já que no modo intermitente não há fluxo de gás.

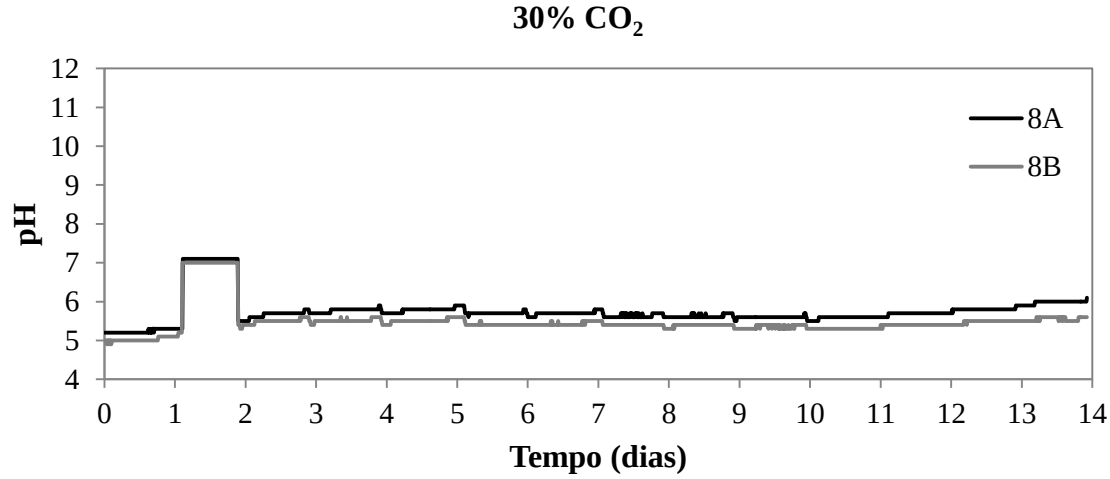
Figura 5.12 Perfis de pH durante os cultivos de *P. kessleri* em fotobiorreator sob aeração intermitente a 5% CO_2 (a), 15% CO_2 (b) e 30% CO_2 (c)



a)



b)



c)

O pH variou consideravelmente entre as 3 concentrações de CO_2 avaliadas. No cultivo a 5% de CO_2, o pH subiu de aproximadamente 5,7, no dia 0, para 10,5 no quinto, e depois decresceu até o dia 10, quando a aeração foi interrompida, então o pH voltou a subir até valores próximos de 10,5. O primeiro aumento foi devido ao aumento da concentração de microalgas, que consomem rapidamente o CO_2 dissolvido, aumentando assim o pH do meio, chegando ao máximo no quinto dia, que também corresponde ao máximo da atividade fotossintética. É possível também observar as oscilações pH devido aos ciclos claro/escuro e também durante a aeração do reator nos períodos claros. O segundo aumento, após o dia 10, ocorreu devido à falta de CO_2 dissolvido no meio, o qual não era mais fornecido.

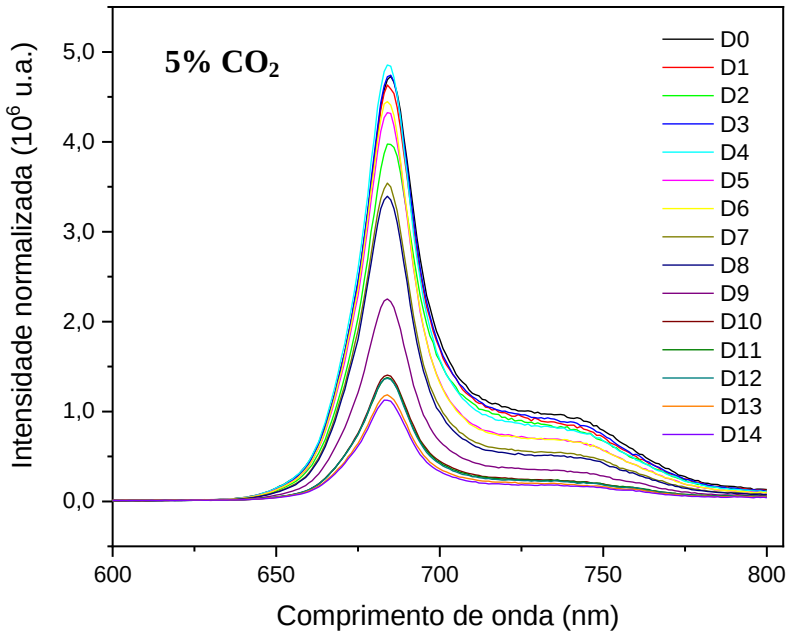
No cultivo a 15% de CO_2, o pH inicial foi aproximadamente 5,4 e aumentou para quase 6,5 no quinto dia de cultivo, decrescendo novamente até o dia 10. Houve um grande aumento do pH nos dias 13 e 14 para aproximadamente 10, o que ocorreu mais tardiamente do que no cultivo a 5% de CO_2, provavelmente porque mais CO_2 estava disponível por mais tempo do que no cultivo anterior. Já no cultivo a 30% de CO_2, os valores de pH não apresentaram grandes oscilações, variando de aproximadamente 5,4 a 5,8 durante todo o cultivo, voltando a aumentar novamente até quase 6,0 no último dia. Isso ocorreu porque 30% de CO_2 é uma concentração muito elevada, então o consumo de CO_2 pelas microalgas não foi suficiente para provocar mudanças no pH. A oscilação ocorrida entre o primeiro e o segundo dia deve ser desconsiderada, pois foi provavelmente um erro devido a uma queda de energia no sistema, afetando os dois reatores.

5.3.3.3 Perfis de concentração de clorofila-a e atividade fotossintética

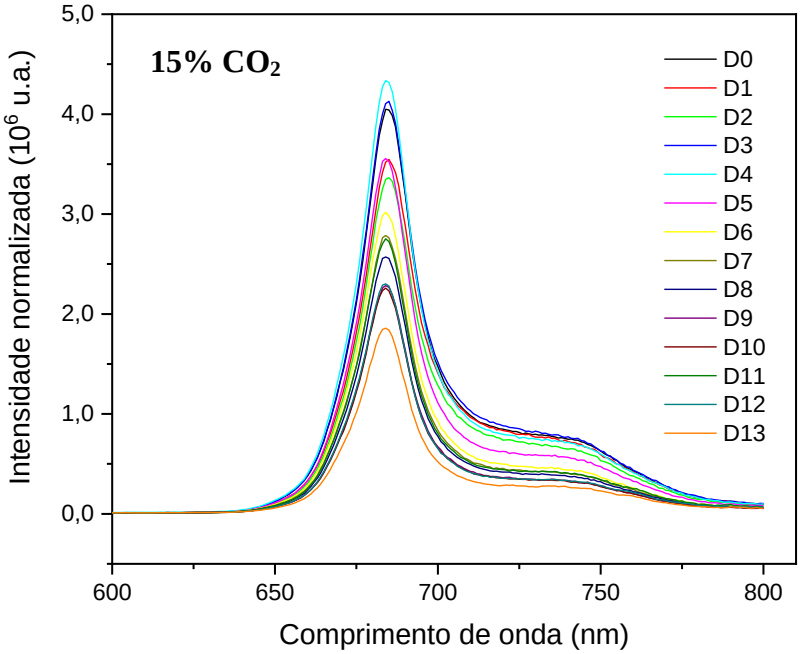
O espectro de fluorescência da Cl.a apresenta um máximo de emissão em torno de 684 nm e outro menos pronunciado na faixa de 740 nm (Figura 5.13) (BAKER, 2008). A Figura 5.14 apresenta as intensidades de fluorescência máximas normalizadas (ou seja, divida pelo valor da absorbância a 680 nm) referentes a todos os dias de cultivo de *P. kessleri* sob diferentes condições de CO_2. Em todos os casos, a maior intensidade foi obtida no quarto dia de cultivo, como também pode ser observado na Figura 5.15. Após o quarto dia, as intensidades de emissão de fluorescência decresceram, com um mínimo no último dia de cultivo. Esse perfil também coincidiu com o obtido na Figura 5.15, o qual apresenta o teor de Cl.a pelo método da extração por metanol seguida de medidas de absorbância. Pode-se

afirmar, então, que no dia 4 de cultivo a atividade fotossintética da microalga, ou seja, a assimilação de CO_2 foi máxima.

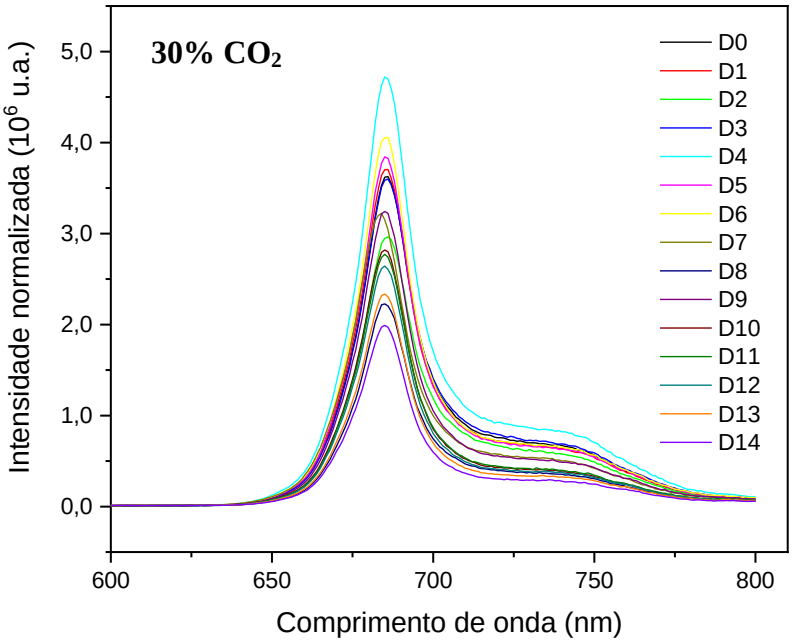
Figura 5.13 Perfis de emissão de fluorescência de clorofila-a durante os dias cultivo de *P. kessleri* em fotobiorreator sob aeração intermitente a 5% CO_2 (a), 15% CO_2 (b) e 30% CO_2 (c)



a)



b)



c)

Figura 5.14 Perfis de intensidade máxima normalizada de emissão de fluorescência durante o cultivo de *P. kessleri* nos fotobiorreatores sob aeração intermitente a 5, 15 e 30% CO_2

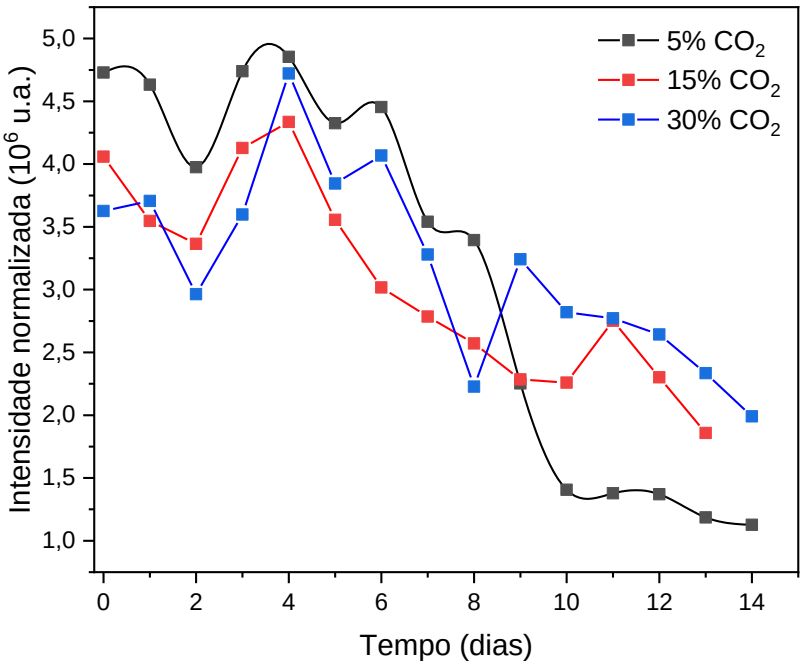
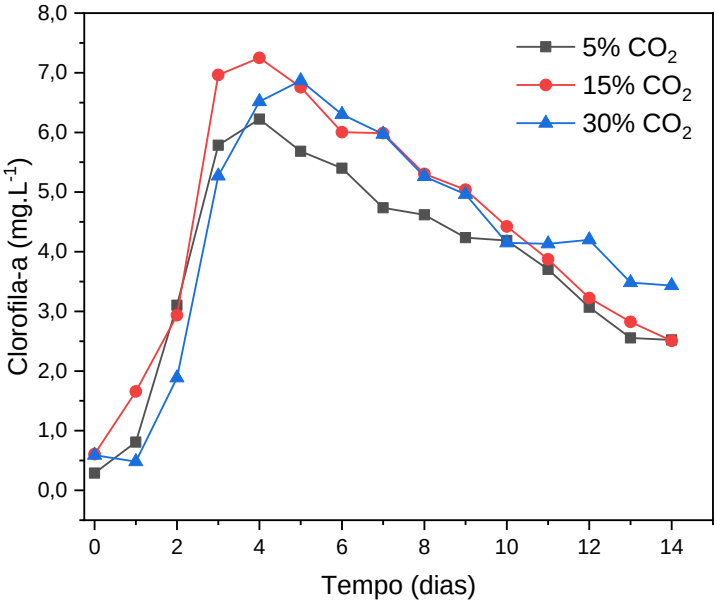


Figura 5.15 Perfis de clorofila-a durante o cultivo de *P. kessleri* em fotobiorreator sob aeração intermitente a 5, 15 e 30% CO_2



Comparando os diferentes perfis das Figuras 5.14 e 5.15 sob diferentes concentrações de CO_2, pode-se observar que sob 5% de CO_2 a microalga apresentou os menores valores de Cl.a e as maiores intensidades de emissão de fluorescência até o dia 8. Sob 15% de CO_2, a microalga apresentou as maiores quantidades de Cl.a até o dia 4 e depois coincidiu com a condição de 30% de CO_2 até o dia 10, o que ocorreu de forma similar em relação à fluorescência. Isso leva a entender que, sob altas concentrações de CO_2 (15 e 30%), a atividade fotossintética não foi dependente da concentração de CO_2. Por outro lado, após o dia 10, o teor de Cl.a foi maior a 30% de CO_2 do que nas outras condições. É preciso lembrar que nesse dia (dia 10) a aeração foi interrompida, então todo o CO_2 disponível até o dia 14 foi proveniente desse dia. Dessa forma, faz sentido que as microalgas no cultivo sob 30% de CO_2 ainda estivessem mais ativas fotossinteticamente do que nos outros cultivos.

Um estudo que utilizou uma abordagem de evolução adaptativa em laboratório obteve cepas de *Chlorella* sp. adaptadas sob 10 e 20% de CO_2, e comparou o teor de pigmentos das cepas adaptadas com a original (LI et al., 2015). Considerando o teor de pigmentos em função das concentrações de CO_2, o máximo teor de Cl.a, Cl.b e carotenoides da cepa original diminuiu com o aumento da concentração de CO_2 de 1% para 30%. Para a cepa adaptada sob 10% de CO_2, o teor de pigmentos foi quase idêntico nas concentrações de CO_2 de 1 a 20%, e diminuiu sob 30% de CO_2. No entanto, para a cepa adaptada sob 20% de CO_2 o teor de

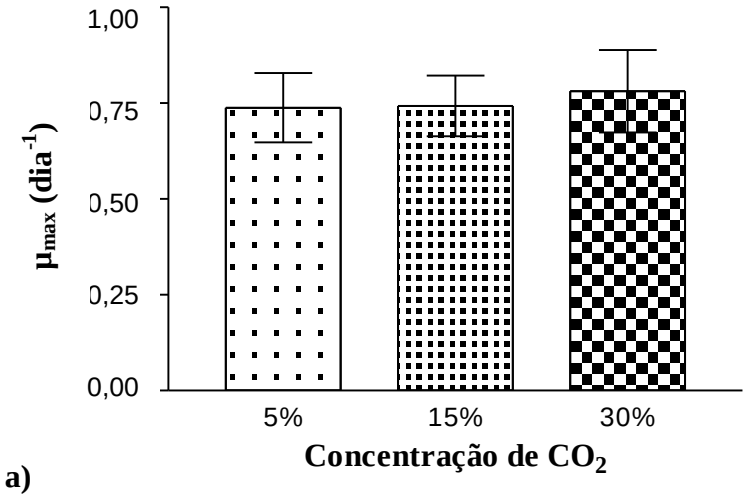
pigmentos quase permaneceu estável de 1 a 30% de CO_2. Considerando o teor de pigmentos em função do tempo de cultivo, o teor de pigmentos aumentou durante os três dias iniciais e diminuiu posteriormente, para todas as cepas cultivadas e em todos os níveis de concentração de CO_2. Isso pode ter sido causado pela mudança na taxa de absorção de nitrogênio, demonstrado em estudos anteriores (LI et al., 2015).

Esse perfil dos pigmentos em função do tempo de cultivo observado por LI e colaboradores (2015) foi semelhante ao observado neste trabalho, o que poderia levar às mesmas conclusões de que, após o quarto dia de cultivo, o teor de Cl.a dimiminiu, provavelmente pela diminuição de nutrientes no meio, principalmente nitrogênio, após o final da fase exponencial. Além disso, a cepa utilizada de *P. kessleri* pode ser considerada já adaptada a altas concentrações de CO_2, e o perfil de Cl.a não apresentou diferenças significativas para 5, 15 ou 30% de CO_2, como desmonstrado para a cepa adaptada sob 20% de CO_2 por (LI et al., 2015).

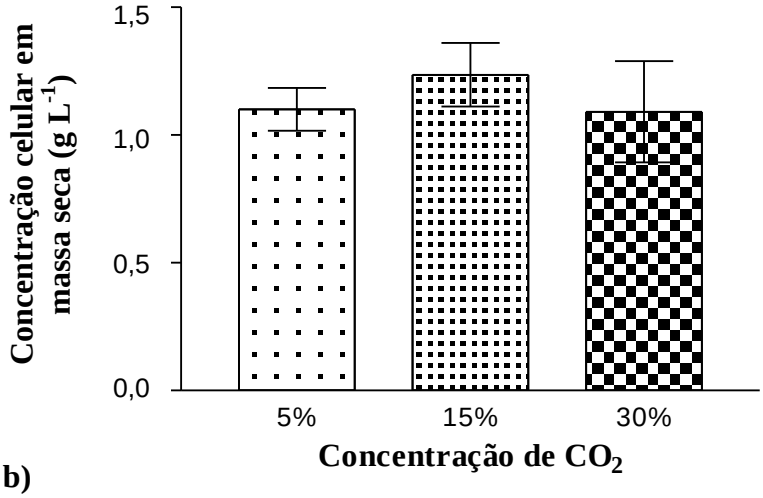
5.3.3.4 Avaliação dos parâmetros fisiológicos

A Figura 5.16 apresenta uma comparação dos parâmetros fisiológicos obtidos dos cultivos da microalga *P. kessleri* sob diferentes concentrações de CO_2. As barras de erro são os desvios padrões entre a média de 4 repetições para cada condição de CO_2.

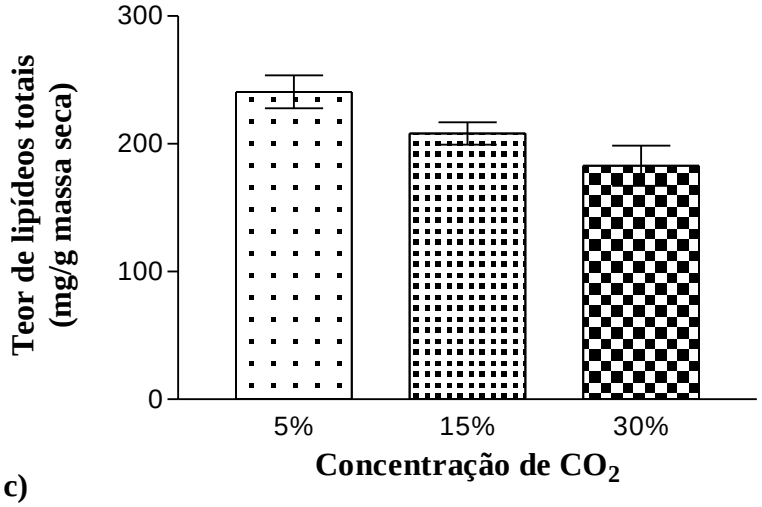
Figura 5.16 Comparação entre parâmetros fisiológicos dos cultivos de *P. kessleri* em fotobiorreator sob aeração intermitente a 5, 15 e 30% CO_2: velocidade específica de crescimento (μ_{max}) (a), concentração celular máxima em massa seca (b), teor de lipídeos totais (c) e taxa de fixação de CO_2 (d)



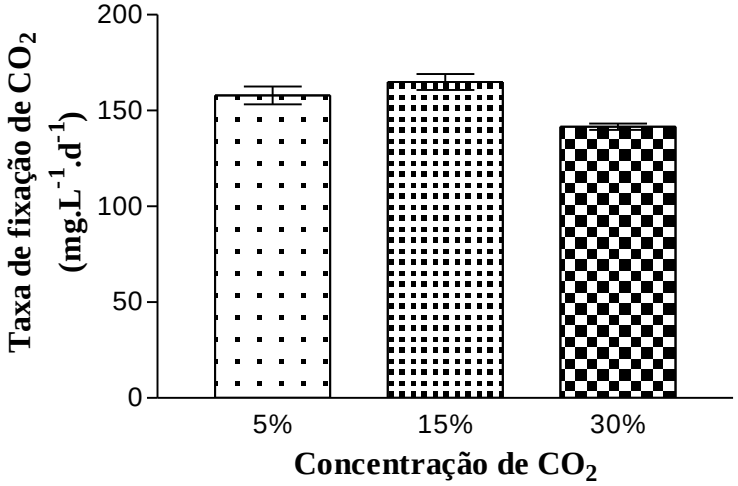
a)



b)



c)



d)

As concentrações celulares ao final dos cultivos (em massa seca) foram, em média, 1,09 ± 0,12, 1,24 ± 0,15 e 1,09 ± 0,25 g L^{-1} em 5, 15 e 30% de CO_2, respectivamente. Apesar da concentração celular, em média, ter sido aproximadamente 13% maior sob 15% de CO_2 do que nas outras condições, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p>0,05$). Como

discutido anteriormente para o parâmetro de velocidade específica máxima de crescimento, um estudo com a microalga *Chlorella kessleri* (DE MORAIS; COSTA, 2007) reportou valores de concentração máxima celular inferiores aos obtidos neste trabalho, exceto em condições de CO_2 atmosféricas. Foram obtidos os seguintes valores: 1,45, 0,98, 0,80 e 0,88 g L^{-1} sob 0,04, 6, 12 e 18% de CO_2, respectivamente.

Os teores de lipídeos ao final dos cultivos foram aproximadamente 241 ± 11, 208 ± 5 e 183 ± 4 mg g^{-1} de massa seca (aproximadamente 24, 21 e 18%, respectivamente) em 5, 15 e 30% de CO_2, respectivamente. Apesar de esses valores terem sido bem diferentes, com uma tendência ao maior acúmulo de lipídeos sob 5% de CO_2 (aproximadamente 31% a mais do que sob 30% de CO_2), as diferenças entre os valores não foram estatisticamente significativas ($p>0,05$). MINHAS et al. (2016) reportaram um teor de lipídeos na microalga *P. kessleri* de 21,42% (massa seca), bem próximo aos obtidos neste trabalho. Esse acúmulo de lipídeos pode ser melhorado variando-se, por exemplo, a composição e fator de diluição do meio de cultura em condições otimizadas, como reportado por (LI et al., 2013), podendo-se obter até 60% de lipídeos em massa seca.

Da mesma forma que para a concentração celular máxima, a taxa de fixação de CO_2 foi ligeiramente maior para 15% de CO_2, com valor médio de 165 ± 5 mg $L^{-1}d^{-1}$, em relação às outras condições (158 ± 7 e 141 ± 3 mg $L^{-1}d^{-1}$ para 5 e 30% de CO_2, respectivamente). No entanto, a única diferença estatisticamente significativa foi em relação aos valores de 15 e 30% de CO_2 ($p<0,05$). Essa tendência pode ser entendida, pois o cálculo da taxa de fixação de CO_2 leva em consideração a produtividade, que é a concentração celular máxima divida pelo número de dias de cultivo. Dessa forma, como a concentração celular ao final do cultivo foi maior nos cultivos sob 15% de CO_2, provavelmente esse fator influenciou mais a taxa de fixação de CO_2. O outro fator variável é porcentagem de carbono na biomassa final, obtida por análise elementar (APÊNDICE E). As porcentagens de carbono na biomassa do 12º dia de cultivo sob 15 e 30% de CO_2 foram, respectivamente, 47,5% e 48,5%, em média. Para 5% de CO_2, essa porcentagem foi obtida no 14º dia, obtendo um valor de aproximadamente 52%.

A Tabela 5.6 apresenta uma comparação entre as taxas de fixação de CO_2 por microalgas do gênero *Chlorella* spp. em diferentes condições de CO_2 (KLINTHONG et al., 2015). Para a *C. vulgaris*, as melhores taxas de fixação de CO_2 ocorreram nos cultivos com maior concentração de CO_2, em comparação com o controle com ar. Para a *C. kessleri*, a taxa de fixação de CO_2 obtida foi de 163 mg $L^{-1}d^{-1}$ sob 18% de CO_2, muito semelhante à obtida neste trabalho sob 15% de CO_2 (165 ± 5 mg $L^{-1}d^{-1}$).

Tabela 5.6 Taxas de fixação de CO_2 de microalgas do gênero *Chlorella* spp. cultivadas sob diferentes condições de CO_2

Linhagem	**CO_2 (%)**	**Taxa fixação de CO_2 (mg $L^{-1}d^{-1}$)**	**Referência**
P. kessleri	5	158 ± 7	Este trabalho
P. kessleri	15	165 ± 5	Este trabalho
P. kessleri	30	141 ± 3	Este trabalho
C. kessleri	18	163	DE MORAIS; COSTA (2007)
	15	624	YUN et al. (1997)
C. vulgaris	10	522	STEPHENSON et al. (2010)
	0,04	75	SCRAGG et al. (2002)

Fonte: Adaptado de KLINTHONG et al. (2015)

Outras taxas de fixação de CO_2 foram reportadas em diferentes trabalhos para diferentes microalgas, variando de 251 a 1500 mg CO_2 $L^{-1}d^{-1}$, como mostrado na Tabela 5.7. Outros trabalhos apontaram valores para *Chlorella* sp. de 287 mg $L^{-1}d^{-1}$ (YADAV et al., 2015), e de 150 a 291 mg $L^{-1}d^{-1}$ para um consórcio de microalgas tolerantes a altas concentrações de CO_2 (BHAKTA et al., 2015). *Scenedesmus obtusiusculus* isolada das nascentes de Cuatro Ciénegas, México, demonstrou crescimento até 10% de CO_2 e uma taxa de fixação de CO_2 de 970 g $m^{-3}d^{-1}$, significativamente maior do que as demais cepas relatadas (TOLEDO-CERVANTES et al., 2013).

Tabela 5.7 Taxas de fixação de CO_2 de diferentes espécies de microalgas

Microalga	**Taxa de fixação de CO_2 (mg L^{-1} d^{-1})**	**Referência**
Dunaliella tertiolecta	272	SYDNEY et al. (2010)
Dunaliella tertiolecta	313	KISHIMOTO et al. (1994)
Chlorella vulgaris	251	SYDNEY et al. (2010)
Chlorella vulgaris	865	HIRATA et al. (1996)
Spirulina platensis	318	SYDNEY et al. (2010)
Botryococcus braunii	497	SYDNEY et al. (2010)
Botryococcus braunii	1100	MURAKAMI; IKENOUCHI (1997)
Synechocystis aquatilis	1500	MURAKAMI; IKENOUCHI (1997)

Fonte: Adaptado de SINGH et al. (2014)

Em relação a outros microrganismos oleaginosos, que produzem lipídeos intracelulares, pode-se destacar as leveduras. Um pequeno número de espécies de leveduras

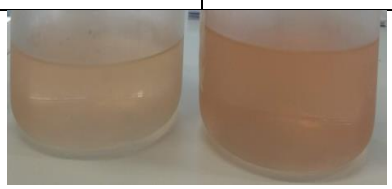
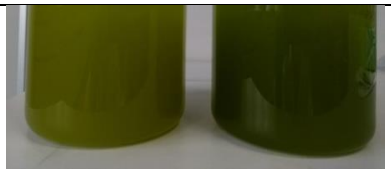
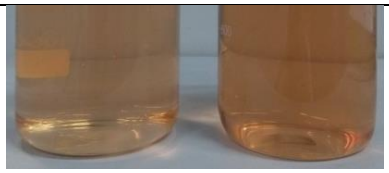
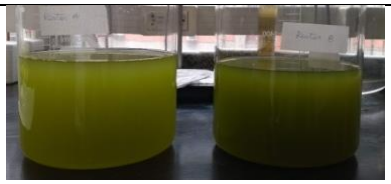
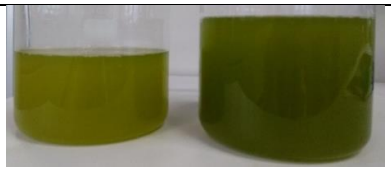
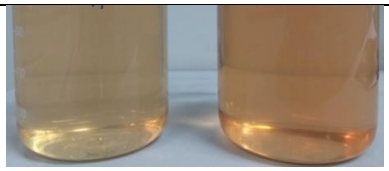
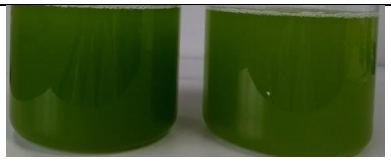
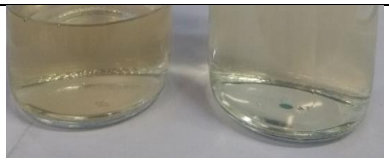
tem demonstrado produtividade substancial de biomassa celular e lipídeos. Essas espécies de leveduras oleaginosas são particularmente atrativas para a produção de lipídeos. Por exemplo, *Cryptococcus curvatus* foi reportada por acumular até 60% em lipídeos. Essa espécie também cresceu a uma densidade celular de 118 g L^{-1} quando cultivada em meio contendo nitrogênio e glicerol, como fonte de carbono, com teor de lipídeos de 25%. Produtividades de biomassa celular semelhantes foram observadas em culturas de *Rhodosporidium toruloides*, que atingiram densidade celular de 100 g L^{-1} e 75% de teor de lipídeos, quando cultivadas sob condições de estresse (SITEPU et al., 2014).

Assim, também nas leveduras o teor lipídico e a concentração celular máxima são dependentes da cultura e altamente variáveis. As densidades celulares reportadas para leveduras foram aproximadamente 100 vezes maior do que as que foram obtidas por *P. kessleri* neste trabalho (1,09 g L^{-1}). Porém, é preciso lembrar que o cultivo das microalgas se iniciou com baixa densidade celular, motivo necessário para a melhor avaliação das cinéticas de crescimento, e a única fonte de carbono utilizada foi o CO_2, diferentemente das leveduras.

5.3.3.5 Avaliação da produção de carotenoides

Após a centrifugação da biomassa obtida ao final dos cultivos da *P. kessleri* em diferentes concentrações de CO_2, observou-se a formação de um sobrenadante de cor avermelhada, cuja intensidade variou entre os cultivos. A Tabela 5.8 apresenta as fotos da biomassa final e do sobrenadante após centrifugação das células, em todos os cultivos. Observando somente a cor dos sobrenadantes, pode-se perceber que, em geral, o reator B produziu mais pigmento do que o reator A, pela coloração mais intensa. Além disso, foi observada a produção do pigmento avermelhado nos cultivos sob 5 e 15% de CO_2, mas não sob 30% de CO_2, que apresentou um pigmento amarelado.

Tabela 5.8 Biomassa resultante ao final dos cultivos de *P. kessleri* sob diferentes concentrações de CO_2. Na coluna da esquerda os frascos contêm microalgas e nos da direita somente o sobrenadante após centrifugação

	Ensaio	Antes da centrifugação		Depois da centrifugação	
		A	B	A	B
5% CO_2	3				
	6				
15% CO_2	4				
	7				
30% CO_2	5				
	8				

Carotenoides possuem um papel importante nas células na transferência de energia durante a fotossíntese e na proteção do aparato fotossintético contra danos foto-oxidativos, neutralizando radicais livres e atuando como agentes antioxidantes (PINHEIRO et al., 2019). A produção de antioxidantes por microrganismos fotossintetizantes, em alguns casos, ocorre quando as microalgas estão sujeitas a um estresse, o qual pode ser acompanhado de inibição da divisão celular. Durante o cultivo de microalgas, o enriquecimento com CO_2 é um pré-requisito para atingir alta produtividade. Ao mesmo tempo, altos níveis de CO_2 são normalmente estressantes para a microalga, especialmente para o aparato fotossintético, podendo induzir o acúmulo de carotenoides. Estudos recentes sobre o cultivo de *H. pluvialis* sob concentrações elevadas de CO_2 demonstraram que o aumento da porcentagem de CO_2 na mistura gasosa até 5% favoreceu o acúmulo de astaxantina (CHEKANOV et al., 2017). Esta

concentração de CO_2 (5%) demonstrou ser também vantajosa para conter a contaminação biológica e promover a fotossíntese (CHENG et al., 2016).

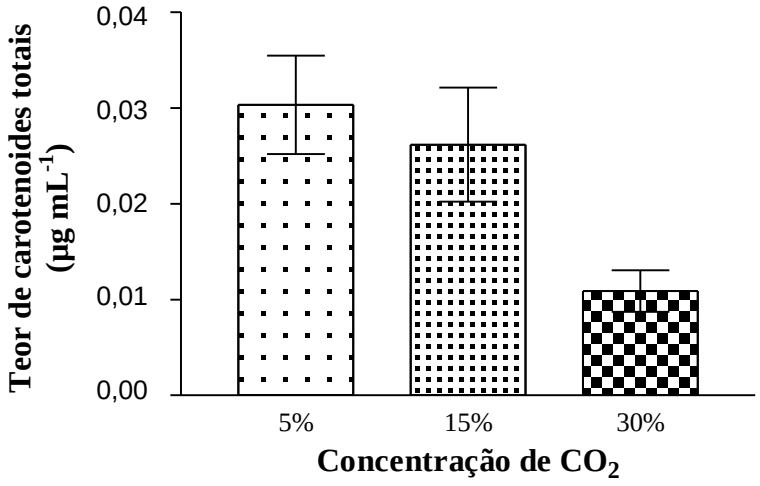
Neste trabalho, a hipótese para a produção do pigmento extracelular foi o estresse causado pela falta do suprimento de CO_2 no final do cultivo. Nesse caso, a interrupção do suprimento de CO_2 foi feita no dia 10, terminando o cultivo no dia 14. Dessa forma, provavelmente 30% de CO_2 não tenha provocado um estresse suficiente pela falta de CO_2, como nos outros casos, para produzir o pigmento vermelho, já que é uma concentração de CO_2 muito elevada. No entanto, os mecanismos que provocaram a produção de pigmentos e liberação ao meio extracelular pelas células não foram estudados.

Outra hipótese que foi feita foi que os pigmentos produzidos eram carotenoides, baseado no metabolismo de microalgas e relatos da literatura (BOROWITZKA, 2013). Os testes preliminares de solubilidade em diferentes solventes, e subsequente aquisição dos espectros de UV-Vis, forneceram indícios e características de carotenoides, o que foi confirmado com outros métodos analíticos, os quais serão discutidos no capítulo seguinte. Nesta etapa, considerou-se os carotenoides totais, os quais foram quantificados por espectrofotometria em 450 nm (Equação 5.5). Os resultados estão apresentados na Tabela 5.9 e na Figura 5.17.

Tabela 5.9 Concentração de carotenoides totais ao final dos cultivos de *P. kessleri* sob diferentes concentrações de CO_2

Concentração de CO_2 (%)	**Ensaio**	**Concentração de carotenoides totais (µg mL^{-1})**		
		Reator A	Reator B	Média das repetições
5	3	2,44 10^{-2}	3,37 10^{-2}	3,03 ± 0,43 10^{-2}
	6	2,77 10^{-2}	3,54 10^{-2}	
15	4	1,81 10^{-2}	2,76 10^{-2}	2,62 ± 0,40 10^{-2}
	7	2,65 10^{-2}	3,24 10^{-2}	
30	5	1,01 10^{-2}	1,05 10^{-2}	1,09 ± 0,16 10^{-2}
	8	1,40 10^{-2}	0,89 10^{-2}	

Figura 5.17 Concentração de carotenoides totais ao final dos cultivos de *P. kessleri* sob diferentes concentrações de CO_2



O teor de carotenoides nos cultivos no Reator B foi, em média, 20% maior do que nos cultivos no Reator A, provavelmente devido a essa mesma diferença entre as taxas de emissão de fótons nos reatores, obtidas pelo experimento de actinometria. Contudo, levando-se em consideração as diferenças entre as médias para cada concentração de CO_2, o teor de carotenoides foi aproximadamente 16% maior sob 5% de CO_2 em relação a 15% de CO_2, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p>0,05$). Já o teor de carotenoides sob 15% de CO_2, por sua vez, foi aproximadamente 140% maior em relação a 30% de CO_2, e essa diferença foi estatisticamente significativa ($p<0,01$).

Um recente estudo (SOARES et al., 2019) avaliou a composição dos principais carotenoides e ácidos graxos de nove espécies de microalgas como fonte de compostos nutracêuticos. *P. kessleri*, *Coelastrum sphaericum* e *Chlorella zofingiensis* são fontes naturais de astaxantina. O maior rendimento de astaxantina obtido para a microalga *P. kessleri* foi quase 23 mg g^{-1} (SOARES et al., 2019). As produtividades de astaxantina e luteína da *P. kessleri* obtidas por MINHAS et al. (2016) foram 0,07 mg $L^{-1}d^{-1}$ e 0,04 mg $L^{-1}d^{-1}$, respectivamente, e o teor de luteína foi 0,28 mg g^{-1} (m.s.). Esses valores são comparativamente superiores à maior concentração de carotenoides totais obtida neste trabalho (0,03 mg L^{-1}).

Em realção a outras espécies de microalgas, a microalga *Chlorella protothecoides* apresentou uma taxa de crescimento relativamente alta em condições heterotróficas e produtividade de luteína na faixa de 4,6 a 5,4 mg g^{-1} com rendimento de cerca de 200 mg L^{-1}. Outras microalgas que também apresentaram altos níveis de luteína foram *Dunaliella salina*

(6,6 mg g^{-1}), *Scenedesmus almeriensis* (5,3 mg g^{-1}), a microalga vermelha *Galdieria sulphuraria* (0,4 mg.g^{-1}), e as microalgas *Chlamydomonas planctogloea*, *Desmodesmus protuberans* e *Desmodesmus denticulatus*, com teor de luteína na biomassa de 7,4, 10,5 e 8,5 mg g^{-1}, respectivamente. Sabendo que a atual fonte comercial de luteína são as flores de calêndula, que possuem um teor de luteína de 0,04 a 0,30 mg g^{-1}, essas microalgas tem o potencial de produzir cerca de 35 a 250 vezes mais luteína (CEZARE-GOMES et al., 2019).

A microalga *P. kessleri* é conhecida por produzir exopolissacarídeos, ou seja, polissacarídeos liberados ao meio extracelular (RAPOSO et al., 2013), porém não há relatos sobre produção extracelular de carotenoides. Com o melhor do meu conhecimento, os únicos relatos de carotenoides produzidos extracelularmente foram a partir da microalga *Botryococcus braunii*. Esta microalga é conhecida por produzir hidrocarbonetos extracelulares em grandes quantidades, adequados para uso como fonte de biocombustíveis, e polissacarídeos. Além disso, também é conhecida por produzir carotenoides intracelulares, tais como neoxantina, loroxantina, violaxantina, luteína, α-caroteno e β-caroteno, enquanto o principal componente dos carotenoides extracelulares é a equinenona (CHENG et al., 2019).

Em relação a outros microrganismos, diversos trabalhos reportaram a produção de carotenoides intracelulares em diferentes fontes microbianas, além de microalgas, particularmente leveduras e bactérias (MUSSAGY et al., 2019). Dentre as leveduras, *Rhodotorula toruloides* é considerada uma das mais promissoras para aplicações industriais, por ser fonte de carotenoides, lipídeos e enzimas de alto valor. Um estudo (PINHEIRO et al., 2019) avaliou a produção de lipídeos e carotenoides por *R. toruloides* utilizando xilose como única fonte de carbono e estratégias de evolução adaptativa em laboratório e estresse oxidativo com H_2O_2 e irradiação por luz. Em relação aos carotenoides, a maior produção foi de 44,0 ± 2.4 mg L^{-1} com a cepa adaptada sob estresse oxidativo, aproximadamente 1.466 vezes maior do que a reportada neste trabalho. Em outro trabalho, 30 linhagens de bactérias pigmentadas foram isoladas da Antártica, das quais 10 diferentes tipos de carotenoides foram identificados. Dentre eles, um carotenoide com 50 carbonos, identificado como C.p. 450 glucosídeo, o qual não havia sido relatado anteriormente em outros trabalhos. Quanto ao teor de carotenoides totais, estes variaram de 0,33 a 0,73 mg/g de massa seca entre as linhagens. *Flavobacterium* sp. P33 alcançou um teor de 0,60 mg/g, enquanto *Arthrobacter* sp. P40 alcançou 0,33 mg/g, ambos podendo ser melhorados em cultivos em condições otimizadas (VILA et al., 2019).

5.3.3.6 Avaliação da composição de ácidos graxos

Ao final dos cultivos, a biomassa de células foi recolhida, centrifugada e seca para então seguir com a extração dos lipídeos, pelo método de Bligh & Dyer (1959), seguida de reação para obtenção dos metil ésteres de ácidos graxos, como descrito por BREUER et al. (2013). Os ácidos graxos foram detectados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas para a identificação. Para o cálculo da porcentagem relativa de um determinado ácido graxo, a área do pico desse composto no cromatograma foi dividida pela soma das áreas dos picos dos principais ácidos graxos detectados. Dessa forma, foram calculadas as porcentagens relativas aos cinco principais ácidos graxos presentes em maiores quantidades para cada cultivo. Os resultados fornecidos na Tabela 5.10 são as médias das duplicatas para condição de CO_2.

Tabela 5.10 Teor dos principais ácidos graxos da microalga *P. kessleri* cultivada sob 5, 15 e 30% de CO_2. Os valores são as médias das porcentagens relativas para cada condição

Ácido graxo		**Concentração de CO_2 (%)**		
		5	**15**	**30**
Ácido palmítico	16:0	26,0 ± 1,9	30,3 ± 2,8	61,9 ± 15,8
Ácido esteárico	18:0	8,7 ± 1,6	9,0 ± 0,3	3,5 ± 0,7
Ácido oleico	18:1	13,9 ± 9,5	30,3 ± 0,2	11,5 ± 2,6
Ácido linoleico	18:2	31,0 ± 1,6	28,0 ± 2,5	15,4 ± 7,0
Ácido α-linolênico	18:3	20,4 ± 8,2	ND	ND
Total saturados		34,7 ± 0,3	39,3 ± 3,1	65,4 ± 15,1
Total insaturados		65,3 ± 0,3	60,7 ± 3,1	34,6 ± 15,1

ND – não detectado

Em geral, como esperado e também já observado nos cultivos em frascos agitados, o ácido graxo presente em maior quantidade foi o ácido palmítico, com aproximadamente 28% nos cultivos sob 5 e 15% de CO_2, aumentando para aproximadamente 62% sob 30% de CO_2. Esse aumento na quantidade de ácido palmítico com o aumento da concentração de CO_2 também foi observado nos experimentos em frascos agitados para a mesma microalga. Similarmente ao que foi observado nos experimentos em frascos agitados, a quantidade de ácido oleico também aumentou até 15% de CO_2, de aproximadamente 14% a 30%, e depois

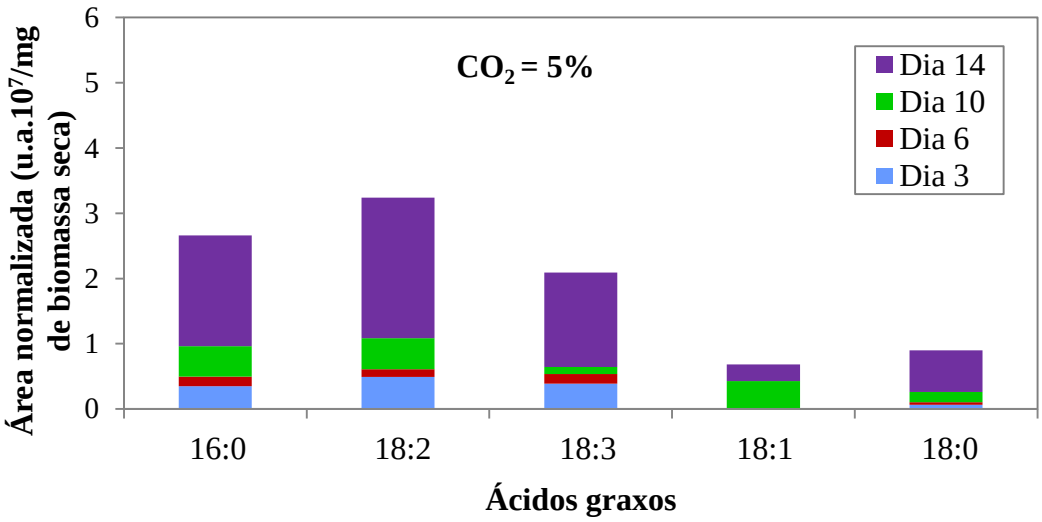
diminuiu para 11,5% sob 30% de CO_2. Como relatado anteriormente no capítulo anterior, isso poderia ser um indício de que altas concentrações de CO_2 provocam uma condição de estresse similar à limitação por nitrogênio, uma condição conhecida por provocar o acúmulo de lipídeos em microalgas (VAN DER HA et al., 2012).

Os outros componentes também apresentaram perfis similares ao que foi observado nos cultivos em frascos agitados, com concentrações de 18:0 entre 3 e 9%, a quantidade de 18:3 também decaiu com o aumento da concentração de CO_2, passando de 20% (sob 5% de CO_2) até níveis não detectáveis em 15% de CO_2 e depois até 7% sob 30% de CO_2. As porcentagens relativas de ácido linoleico (18:2) nos cultivos em fotobiorreator foram maiores do que as observadas nos cultivos em frascos agitados, aproximadamente 31%, 28% e 15% (5, 15 e 30% de CO_2, respectivamente) em fotobiorreator e aproximadamente 20%, 6% e 20% (0,04, 15 e 30% de CO_2, respectivamente) em frascos agitados. Essas observações comparando a composição de ácidos graxos nos cultivos em fotobiorreator e em frascos agitados são interessantes para mostrar a equivalência entre ambas as formas de cultivo, sendo o biorreator uma ampliação de escala, não alterando a composição lipídica das microalgas.

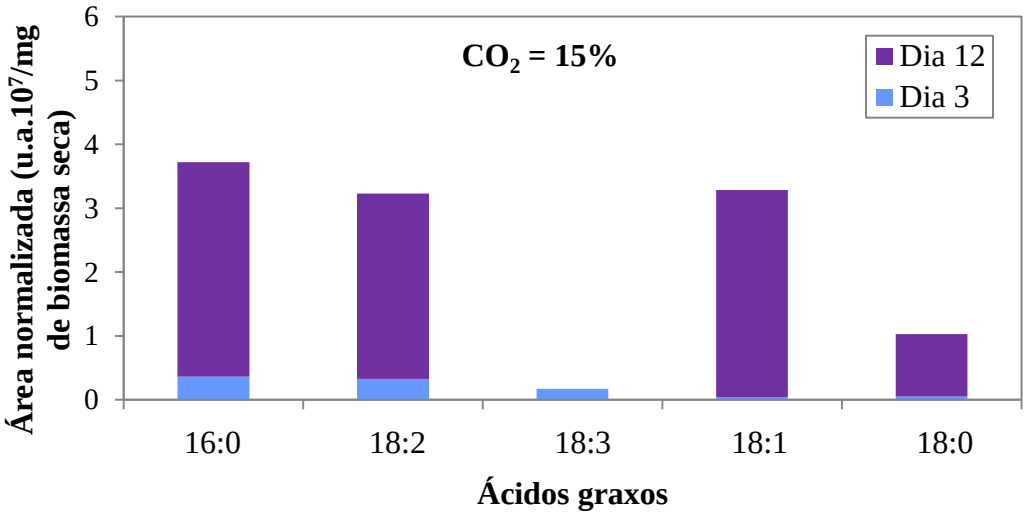
A Tabela 5.10 apresenta também os teores de ácidos graxos saturados e insaturados para todas as condições de cultivo. É possível observar que nem sempre a somatória de saturados e insaturados foi 100%, pois foram mostrados na tabela somente os valores dos principais ácidos graxos detectados, porém os que estavam presentes em pequenas quantidades foram contabilizados no total de saturados ou insaturados.

Neste trabalho, foi realizada também a avaliação da composição de ácidos graxos em diferentes fases do crescimento (Figura 5.18). A quantidade de cada ácido graxo está em função da área normalizada, ou seja, a área de cada pico referente a cada ácido graxo no cromatograma dividida pela massa pesada para a extração dos lipídeos. Considerando que o volume de injeção no GC-MS foi o mesmo (1 µL), as áreas normalizadas são proporcionais à quantidade de ácidos graxos em cada amostra.

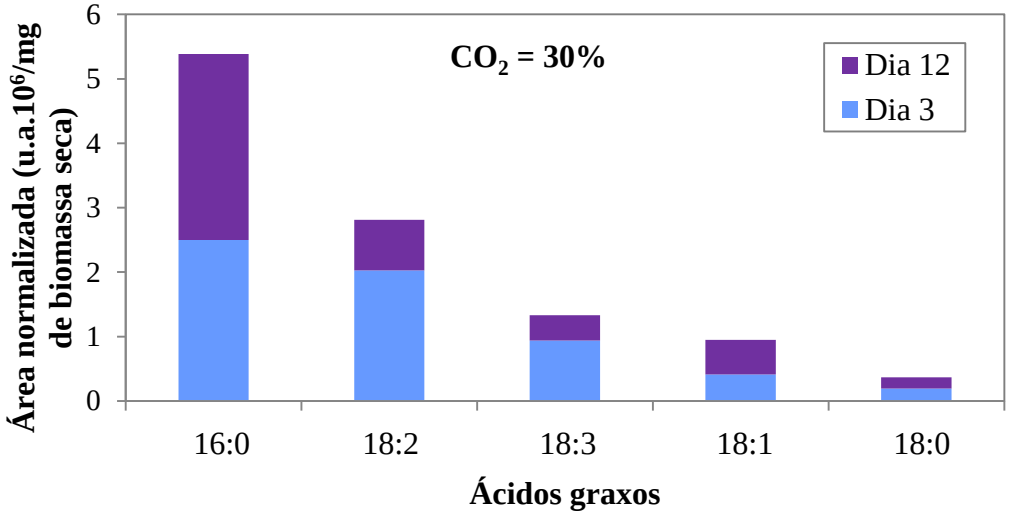
Figura 5.18 Composição dos principais ácidos graxos em diferentes dias durante o cultivo de *P. kessleri* sob 5% (a), 15% (b) e 30% de CO_2 (c)



a)



b)



c)

A primeira característica notável é a diferença entre as proporções dos ácidos graxos nas diferentes fases de crescimento. No cultivo sob 5% de CO_2, as quantidades de 16:0, 18:2 e 18:3 eram equivalentes no dia 3 (meio da fase exponencial), depois diminuíram no dia 6 (final da fase exponencial / início da fase estacionária), voltaram a aumentar no dia 10 (meio da fase estacionária) e continuaram a aumentar até o dia 14 (final do cultivo). Ao final do cultivo, a quantidade desses ácidos graxos foi mais de 3 vezes a do meio da fase exponencial. Comportamento similar foi observado no cultivo sob 15% de CO_2, porém as discrepâncias entre as quantidades de ácidos graxos nas diferentes fases de crescimento foram maiores. Por exemplo, a quantidade de 16:0 ao final do cultivo (dia 12) foi mais de 6 vezes a do meio da fase exponencial (dia 3). Para 18:1 essa diferença foi ainda maior, aproximadamente 30 vezes. Já para o cultivo sob 30% de CO_2, as quantidades de ácidos graxos em geral foram semelhantes nas diferentes fases de crescimento.

Em relação à composição dos ácidos graxos, sob 5% de CO_2 não havia a presença de 18:1, ou não a níveis detectáveis, no meio da fase exponencial, aparecendo somente na análise do dia 10, durante a fase estacionária. A mesma observação pode ser feita para o cultivo sob 15% de CO_2, com aumento de mais de 30 vezes na quantidade de 18:1 ao final do cultivo em relação ao meio da fase exponencial, como já relatado. Diferente do cultivo sob 5% de CO_2, não foi observada a produção de 18:3 na análise ao final do cultivo sob 15% de CO_2. Todas essas observações, novamente, não podem ser aplicadas para o cultivo sob 30% de CO_2, apresentando níveis equivalentes de 18:1 nos diferentes dias de cultivo analisados e quantidade um pouco menor de 18:3 no dia 12 em relação ao dia 3.

Esse comportamento do aumento de ácido oleico foi relatado anteriormente neste capítulo quando foram comparadas as porcentagens relativas referentes aos cultivos em diferentes concentrações de CO_2. A principal observação foi o aumento de 18:1 no cultivo sob 15% de CO_2 em relação ao de 5% de CO_2. O mesmo foi constatado nos cultivos em frascos agitados, apresentados no Capítulo 4. Neste caso, foi constatado um aumento muito significativo de 18:1 também comparando-se as fases de crescimento, sendo esse aumento mais pronunciado sob 15% de CO_2. Esta situação está relacionada com uma situação de acúmulo de lipídeos, como reportado por VAN DER HA et al.(2012), embora a análise por gravimetria tenha apontado maior acúmulo de lipídeos totais na condição de 5% de CO_2.

Como já relatado neste capítulo, em geral, células em crescimento exponencial apresentam maiores quantidades de ácidos graxos insaturados, enquanto que na fase de declínio, com falta de nutrientes e alta densidade celular, estes são normalmente consumidos

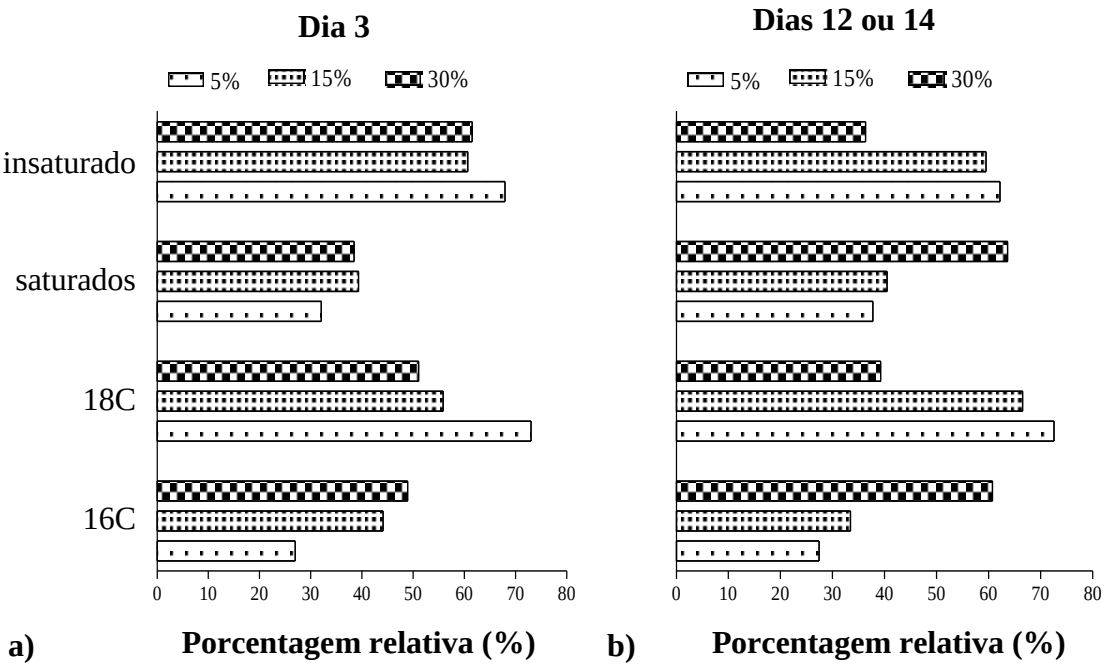
como fonte de energia, provocando o acúmlo de SFA (RENAUD et al., 1995; LIM et al., 2012). As mesmas observações foram feitas por ANDRADE e colaboradores (2015) estudando a composição lipídica das espécies *C. vulgaris*, *Chlorella* sp., *Desmodesmus* sp., *Monoraphidium* sp., *e Oocystis* sp. durante diferentes fases de crescimento.

Um recente estudo comparou a composição de ácidos graxos em diferentes fases do crescimento da microalga *Scenedesmus obliquus* cultivada com diferentes fotoperíodos. Durante o desenvolvimento das células, os principais ácidos graxos foram 18:3, 16:0 e 18:1. Na fase exponencial, 18:3 estava em maior quantidade e decaiu na fase estacionária, bem como ocorreu o aumento de 18:1. Na fase de declínio, 16:0 estava presente em maior quantidade. Os ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) apresentaram maiores concentrações na fase estacionária e reduziram na fase de declínio, enquanto os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) apresentaram as maiores concentrações na fase exponencial antes de reduzirem significantemente na fase estacionária (VENDRUSCOLO et al., 2019). Esses dados corroboram os resultados encontrados neste trabalho, principalmente o declínio de 18:3 e aumento de 18:1 após a fase exponencial.

A Figura 5.19 apresenta as porcentagens relativas de ácidos graxos dos cultivos sob diferentes concentrações de CO_2, organizados em diferentes categorias: total de saturados, total de insaturados, total com 16 carbonos (16C) e total com 18 carbonos (18C), além de em diferentes fases do cultivo (meio da fase exponencial e final do cultivo na fase estacionária).

Em relação aos insaturados, a quantidade total foi maior nos cultivos sob 5% de CO_2 do que nos outros, com valores em torno de 70%. Sob 30% de CO_2, a quantidade de insaturados caiu de aproximadamente 60% no dia 3 para quase 35% no dia 12 de cultivo. O oposto, obviamente, foi obervado para os saturados. (NASCIMENTO et al., 2015) também demonstraram que o grau de suplementação de CO_2 alterou o grau de saturação dos ácidos graxos em diferentes microalgas. Uma análise qualitativa demonstrou predominância de ácidos graxos saturados ou monoinsaturados em comparação com os poli-insaturados em todos cenários com diferentes concentrações de CO_2, o que difere dos resultados deste trabalho. No entanto, a produção de PUFA foi maior sob 2,5% de CO_2 para as microalgas do gênero *Botryococcus* spp. e maior sob 10% de CO_2 para a microalga *C. vulgaris* (NASCIMENTO et al., 2015). Outro estudo (TANG et al., 2011) avaliou duas microalgas diferentes *S. obliquus* e *C. pyrenoidosa* sob concentrações de CO_2 de 0,03, 5, 10, 20, 30 e 50% e constatou que o aumento de CO_2 provocou um aumento no grau de insaturações dos ácidos graxos em ambas as microalgas, produzindo maiores quantidades de PUFA.

Figura 5.19 Porcentagens relativas de ácidos graxos saturados, insaturados, com 16C e com 18C em diferentes dias de cultivo de *P. kessleri* sob 5, 15 e 30% de CO_2: a) Dia 3; b) Dia 12 (15 e 30% CO_2) e Dia 14 (5% CO_2)



Em relação ao número de carbonos, a quantidade relativa de ácidos graxos com 18 carbonos diminuiu com o aumento da concentração de CO_2, e esse efeito foi também observado para as diferentes fases de cultivo, com um pequeno aumento (de aproximadamente 10%) no dia 12 em relação ao dia 3 no cultivo sob 15% de CO_2 e diminuição (de aproximadamente 10%) no cultivo sob 30% de CO_2 comparando o dia 12 com o dia 3. Da mesma forma, observou-se um aumento na quantidade relativa de ácidos graxos com 16 carbonos com o aumento da concentração de CO_2. Este efeito não foi observado no estudo de (TANG et al., 2011), cujas quantidades de ácidos graxos com 16 ou 18 carbonos não variaram significativamente com o aumento da concentração de CO_2, porém apresentaram valores médios diferentes para as duas microalgas avaliadas: 33% e 63% para 16C e 18C, respectivamente, para a microalga *S. obliquus* e 52% e 46% para 16C e 18C, respectivamente, para a microalga *C. pyrenoidosa*.

5.4 CONCLUSÃO

As microalgas *Scenedesmus* sp. e *P. kessleri* foram cultivadas em biorreator do tipo tanque agitado, o qual foi adaptado para o cultivo de microalgas com um sistema de iluminação adequado e trabalhando numa configuração variando a composição do gás de entrada até 30% de CO_2. Os resultados comprovaram a robustez das microalgas e do sistema de fotobiorreatores, com valores de parâmetros cinéticos compatíveis entre os ensaios. Em comparação com os cultivos em frascos agitados, os valores de velocidade específica máxima foram maiores nos cultivos em fotobiorreator, além de possibilitarem a análise dos parâmetros pH e oxigênio dissolvido em tempo real. Nos cultivos sob 30% de CO_2, o pH permaneceu na faixa de 5 a 5,5, o que pode ter contribuído para o menor crescimento da microalga nessa condição. Em geral, o crescimento, a produção de biomassa, a produção de lipídeos e a taxa de fixação de CO_2 foram melhores de 5 a 15% de CO_2, embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significativas. O método para a produção de carotenoides extracelulares pela microalga *P. kessleri* foi validado e consistiu na suplementação com CO_2 da corrente de ar dos cultivos até o décimo dia, seguida de interrupção do fornecimento dessa mistura gasosa até o último dia de cultivo. Foi observada a produção de pigmentos de amarelo a vermelho em todos os cultivos, porém a concentração de carotenoides nos cultivos sob 5 e 15% de CO_2 foi significativamente maior (mais de 140%) do que sob 30% de CO_2. A composição de ácidos graxos corroborou os dados obtidos previamente nos cultivos em frascos agitados. Foi verificada maior quantidade de ácidos graxos saturados ao final dos cultivos (sob 5 e 15% de CO_2) em comparação com a fase de crescimento exponencial. Houve também aumento de ácido oleico, cujo aparecimento pode estar ligado a uma condição de estresse que favorece o acúmulo de lipídeos e possivelmente de carotenoides.

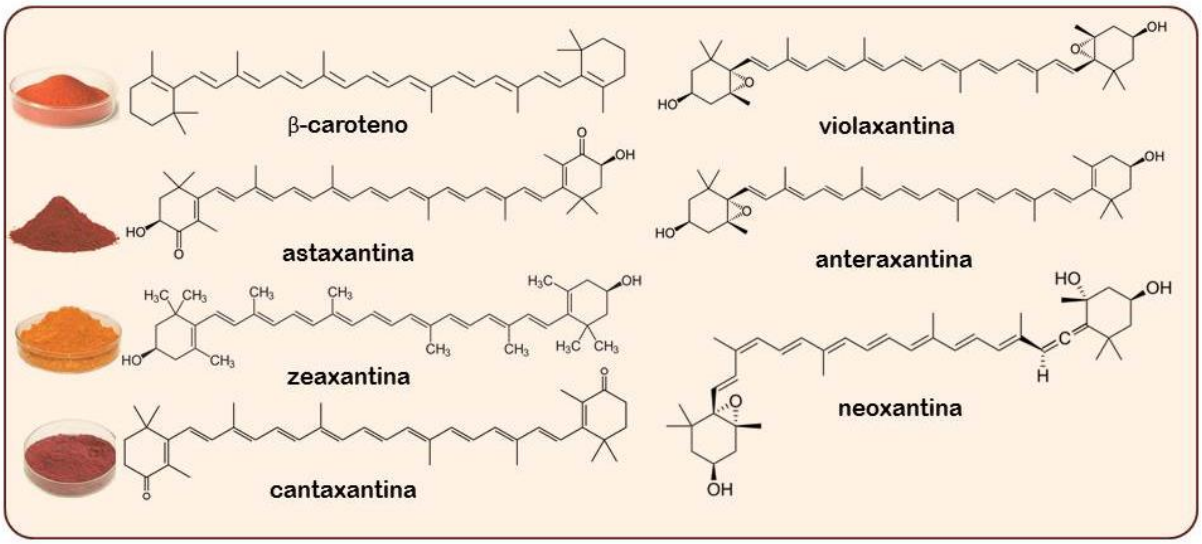
CAPÍTULO 6

AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS CAROTENOIDES

6.1 INTRODUÇÃO

Carotenoides são os pigmentos mais amplamente distribuídos na natureza. Eles são uma classe de mais de 700 pigmentos que variam da cor amarela à vermelha. Aproximadamente 1.117 carotenoides naturais de 683 fontes (entre plantas, algas, cianobactérias, bactérias, leveduras e fungos filamentosos) foram descritos (MUSSAGY et al., 2019). Em orgnanismos fotossintetizantes, estas moléculas atuam na célula na coleta de energia luminosa e sua transferência para clorofila na fotossíntese, bem como fotoprotetores para o aparato fotossintético dissipando a energia excessiva usada na fotossíntese e inibindo a formação de EROs (DE CARVALHO; CARAMUJO, 2017). Diversas microalgas contêm essa importante classe de compostos bioativos. Alguns dos carotenoides encontrados em microalgas reportados são: neoxantina, violaxantina, luteína, zeaxantina, ß-caroteno, anteraxantina, astaxantina e cantaxantina (Figura 6.1) (BOROWITZKA, 2013).

Figura 6.1 Estrutura química dos principais carotenoides reportados em microalgas (BOROWITZKA, 2013)



A produção de pigmentos é realizada industrialmente principalmente por síntese química, tendo produzido 1.400 toneladas de carotenoides em 2014, responsáveis por gerar US$ 1,4 bilhão. Para 2019, eram esperados cerca de US$ 1,8 bilhão, incluindo todas as fontes de carotenoides (sintético e natural). A participação de mercado dos carotenoides de maior sucesso comercial (β-caroteno, luteína e astaxantina) foi de cerca de 60% em 2010. Desse mercado, destaca-se a produção de β-caroteno, representando aproximadamente US$ 270 milhões, dos quais US$ 68 milhões são β-caroteno natural. O preço médio de mercado varia entre US$ 300 e 1.500 kg^{-1}(CEZARE-GOMES et al., 2019).

Astaxantina é o carotenoide de maior valor agregado produzido por microalgas que atingiu maior sucesso comercial. O maior mercado para astaxantina é como fonte de pigmentação em aquicultura, primariamente salmão e truta. Astaxantina era vendida por aproximadamente US$ 2.500 kg^{-1} (LORENZ; CYSEWSKI, 2000), caindo para cerca de US$ 1.900 kg^{-1} em 2014 (CEZARE-GOMES et al., 2019). O mercado mundial em 2010 foi cerca de US$ 230 milhões (CEZARE-GOMES et al., 2019). Apesar de 0,95% desse mercado consumir astaxantina produzida sinteticamente, a demanda por produtos naturais tornam os pigmentos sintéticos menos desejáveis e fornece uma oportunidade para a produção de astaxantina natural, principalmente pela microalga *Haematococcus pluvialis* (LORENZ; CYSEWSKI, 2000). Além disso, astaxantina é um antioxidante 10 vezes mais efetivo do que ß-caroteno, e mais de 100 vezes mais efetivo do que vitamina E (POLYAKOV; MAGYAR; KISPERT, 2013).

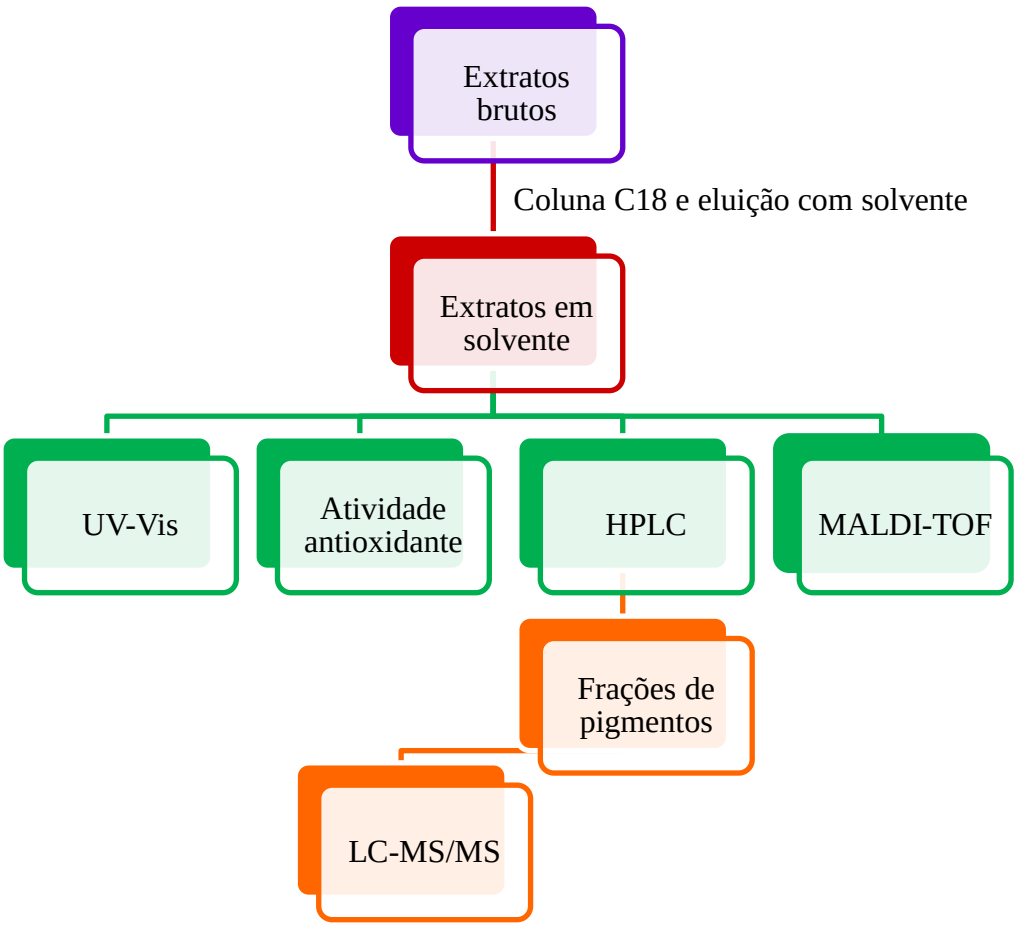
Luteína, bem como a zeaxantina, é encontrada em altas concentrações na retina humana. Estudos têm demonstrado que uma dieta suplementada com luteína pode resultar no aumento da quantidade desse pigmento macular e, consequentemente, prevenir algumas doenças degenerativas do olho (KRINSKY; LANDRUM; BONE, 2003). De fato, baixos níveis de luteína e a zeaxantina foram observados em pessoas com catarata (MINHAS et al., 2016). Esses pigmentos foram aprovados pela União Europeia como aditivos e corantes alimentares para a saúde ocular, e o mercado de luteína deve crescer a uma taxa anual de 3,6%. O mercado de zeaxantina ainda é incipiente, porém ambos juntos podem ultrapassar US$ 250 milhões por ano. Atualmente, a principal fonte de luteína são flores de calêndula e não há produção comercial de luteína a partir de microalgas (CEZARE-GOMES et al., 2019).

Este capítulo é destinado ao estudo da recuperação, purificação e caracterização química dos carotenoides extracelulares obtidos após cultivos de *P. kessleri* em fotobiorreator, relatados no Capítulo 5.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os principais carotenoides comuns podem ser identificados de forma conclusiva pelo uso criterioso e combinado de dados cromatográficos, espectros de absorção na região do UV-Vis e reações químicas específicas para confirmar o tipo, localização e número de grupos funcionais. As duplas ligações conjugadas constituem o sistema cromóforo que confere aos carotenoides a sua cor atrativa e fornece o espectro de absorção na região do visível, que serve como base para a sua identificação e quantificação. A espectrometria de massas (MS) e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) são, no entanto, indispensáveis na elucidação de estruturas desconhecidas ou inconclusivas de carotenoides (BRITTON, 2004). A Figura 6.2 apresenta a sequência de etapas seguidas para a purificação do produto: retenção dos pigmentos em coluna de sílica empacotada e eluição com solventes orgânicos, caracterização dos extratos, separação das frações de pigmentos por cromatografia líquida de alta eficiência em escala semi-preparativa e caracterização por MS.

Figura 6.2 Sequência de etapas de purificação do produto e caracterização das frações de carotenoides



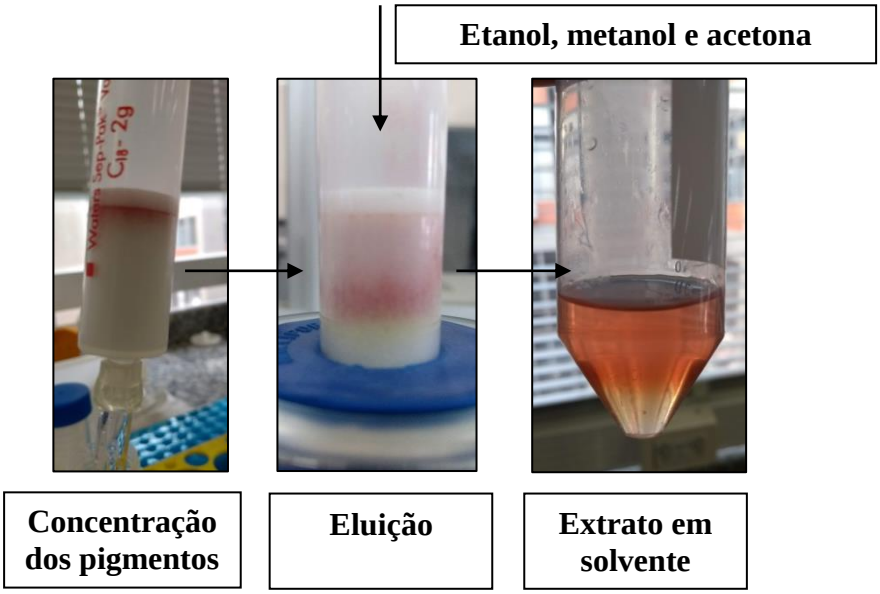
Carotenoides são moléculas altamente conjugadas, o que os tornam suscetíveis à degradação por calor, luz, oxigênio, ácidos e íons metálicos (KOPEC et al., 2012). A cor permite monitorar qualitativamente as diferentes etapas na análise de carotenoides. Em geral, perda ou mudança de cor durante a análise pode indicar degradação ou modificação estrutural (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

As amostras brutas contendo os carotenoides em solução aquosa e obtidas ao final dos cultivos em reator, já livre de células após centrifugação, foram estocadas em geladeira a 4°C em frascos âmbar. O trabalho laboratorial de extração com solventes e análises foi planejado para que as amostras fossem analisadas assim que extraídas. Todo o processo de extração e análise de carotenoides foi feito sob proteção da luz, ou com o mínimo possível, cobrindo os frascos com papel alumínio e mantendo-os no escuro. A oxidação das amostras foi reduzida direcionando nitrogênio aos recipientes antes das análises e antes de guardá-las. Além disso, nitrogênio também foi borbulhado nos solventes orgânicos antes de todos os procedimentos.

6.2.1 Pré-purificação dos pigmentos e avaliação da solubilidade em diferentes solventes orgânicos

Em geral, carotenos são mais solúveis em éter de petróleo e hexano, enquanto xantofilas são mais solúveis em metanol e etanol (BRITTON, 1985). Para uma pré-purificação dos pigmentos e avaliação do solvente mais apropriado, 30 mL de cada amostra de sobrenadante de cor avermelhada, resultantes dos ensaios cinéticos da *P. kessleri* em fotobiorreator, foram passadas em coluna de sílica empacotada C18 (Waters Sep-Pak Vac), sob vácuo, para separar o pigmento (fração mais lipofílica) do restante da amostra (fração aquosa). Após passar a amostra, os pigmentos ficaram retidos na coluna, e então foram eluídos, em frasco seco, com 5 mL de diferentes solventes orgânicos puros: acetona, etanol, clorofórmio, éter e metanol. A Figura 6.3 representa as etapas do processo. Clorofórmio e éter não eluíram o pigmento, somente acetona, etanol e metanol.

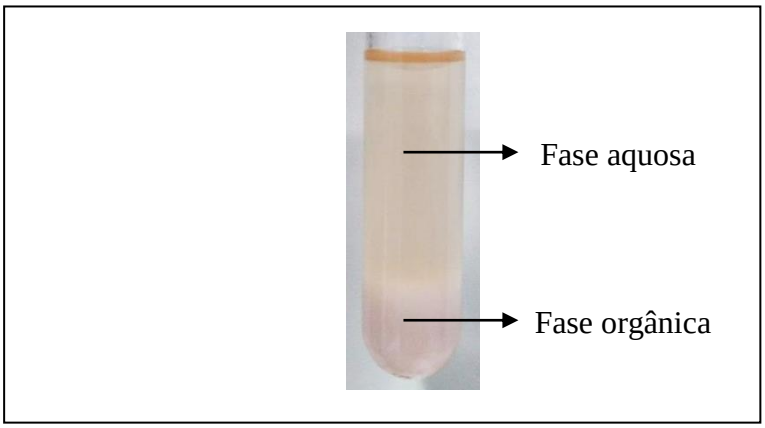
Figura 6.3 Etapas de pré-purificação dos pigmentos em coluna empacotada de sílica C18 e eluição com solventes orgânicos



As amostras de cada extrato (acetona, etanol e metanol) foram filtradas a 0,22 µm, analisadas por espectrometria de massas MALDI (conforme metodologia descrita no item 6.2.2.3) e também foram obtidos os espectros de absorção de 300 a 800 nm em espectrofotômetro (Shimadzu, modelo 2600). Os espectros de absorção dos carotenoides são dependentes do solvente (PAVIA et al., 2016) e, sendo assim, foram comparados os máximos de absorção das amostras em diferentes solventes (APÊNDICE G). Os espectros de massas (APÊNDICE F) de uma mesma amostra em diferentes solventes forneceram os mesmos íons, porém os extratos em metanol apresentaram maiores intensidades em relação aos outros. Dessa forma, optou-se por utilizar os extratos metanólicos nas análises seguintes.

Ainda na avaliação da solubilidade, 2 mL dos extratos metanólicos foram colocados em tubos de vidro previamente secos, 1 mL de clorofórmio foi adicionado, agitou-se em vórtex, adicionou-se 1 mL de água deionizada (milli-q), agitou-se em vórtex novamente e centrifugou-se por 5 min a 1.000*g*. Foi observada a separação das fases aquosa e orgânica (clorofórmio), esta última contendo o pigmento avermelhado extraído. Assim, pigmento extraído em metanol foi solúvel também em solventes menos polares, como o clorofórmio. A Figura 6.4 mostra a foto do tubo ensaio contendo as fases aquosa (superior) e orgânica (inferior).

Figura 6.4 Foto do tubo de ensaio contendo o extrato metanólico após extração com clorofórmio e água e separação das fases



6.2.2 Caracterização dos extratos metanólicos

6.2.2.1 Análise espectrofotométrica no UV-Vis

O espectro visível é a primeira ferramenta de identificação dos carotenoides, sendo o comprimento de onda máximo de absorção (λ_{max}) e a forma do espectro característicos de cada cromóforo. Os extratos metanólicos de todas as amostras foram analisados por espectrofotometria UV-Vis (Shimadzu, modelo 2600) com varredura de 190 a 800 nm.

6.2.2.2 Avaliação da atividade antioxidante

A capacidade antioxidante equivalente de Trolox (*Trolox equivalent antioxidant capacity* - TEAC) é o método mais comumente utilizado para avaliar a atividade antioxidante de um determinado composto comparando com a capacidade antioxidante do padrão Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametacromano-ácido 2-carboxílico). A avaliação quantitativa da atividade antioxidante frente ao radical $ABTS^{\bullet+}$ foi realizada através de medidas espectrofotométricas do consumo do radical na presença de substâncias antioxidantes. Utilizou-se o método ABTS ([2,2'-azinobis (3-etilbenzoatiazolina-6-ácido sulfônico)]) modificado (RE et al., 1999), o qual permite avaliar compostos tanto de natureza lipofílica quanto hidrofílica. Foram utilizados os extratos etanólicos obtidos anteriormente. Antes de realizar o ensaio foi feita uma curva padrão com o reagente Trolox (Sigma) partindo-se de

uma solução estoque 1,5 mM em tampão PBS (pH 7,4) e variando a concentração final de 0 a 330 µM, conforme metodologia descrita por (VIDAL, 2016). Um volume de 2 mL do radical $ABTS^{\bullet+}$ (formado pela reação da solução ABTS 7 mM com solução de perssulfato de potássio 2,45 mM e diluído em etanol para uma absorbância de 0,7 a 734 nm) foi adicionado a 100 µL da solução de Trolox em diferentes concentrações e deixou-se reagir no escuro por 10 min. Após este período, foi realizada a leitura da absorbância a 734 nm utilizando um espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu, modelo 2600). Para as medidas das amostras, realizou-se o mesmo procedimento, utilizando 100 µL de cada extrato etanólico. A partir da curva padrão, foram calculadas as quantidades equivalentes de Trolox para cada amostra, expressas em µM de Trolox/ mL de amostra.

6.2.2.3 Análise por espectrometria de massas MALDI-TOF

Apesar de rebuscada e de fornecer muito mais parâmetros, neste trabalho a espectrometria de massas com fonte de ionização do tipo MALDI foi utilizada para confirmar a presença de carotenoides nos extratos metanólicos, ainda não puros, comparando com um padrão de astaxantina (Sigma), previamente solubilizado em clorofórmio e diluído com metanol para uma concentração final de 5,0 mg L^{-1}.

Cerca de 200 µL dos extratos metanólicos e da astaxanina foram secos em concentrador a vácuo (CentriVap, LabConco) e re-suspensos com uma solução 50% acetonitrila e 0,1 % de TFA (v/v). Aproximadamente 1 µL de cada amostra foi colocado em cada *spot* da placa de amostragem de aço polido (modelo MTP 384, Bruker Daltonics). Após completa secagem à temperatura ambiente, adicionou-se sobre cada amostra 1 µL da solução saturada de HCCA. Foram feitos 3 *spots* para cada amostra. Novamente, após completa secagem, a placa foi inserida no espectrômetro de massas Ultraflextreme (Bruker) com fonte de ionização do tipo MALDI (laser "smartbeam" gerando íons positivos ou negativos) e analisador do tipo TOF. Cada espectro foi obtido manualmente em modo íon positivo e o intervalo de massas analisado foi de *m/z* 200 a 1000 Da. Para a fragmentação TOF/TOF, os íons principais e os fragmentos foram reacelerados usando um dispositivo LIFT localizado no tubo de voo com tensões de refletor de 29,50 e 13,95 kV. O seletor de íons precursores foi ajustado em 0,45% da *m/z* desejada, as tensões LIFT foram ajustadas em 19,00 e 3,15 kV e o supressor metaestável LIFT foi desativado. Os espectros obtidos de cada *spot* foram avaliados utilizando o software *Flex Analysis* (Bruker).

6.2.2.4 Análise da composição de carotenoides por HPLC analítico

O método mais comumente empregado para analisar carotenoides utiliza HPLC combinado com detecção por absorção no UV-Vis (NETO et al., 2016). Os extratos metanólicos, previamente filtrados a 0,22 µm, foram analisados em HPLC analítico (UFLC, Shimadzu) com detector de arranjo de fotodiodos (PDA) e equipado com uma coluna Shim-pack XR-ODS (Shimadzu, 2,0 mm x 30mm). Como fase móvel, foi utilizado um gradiente linear de acetonitrila (grau HPLC, Merck) e água deionizada (milli-q) com 0,1% (v/v) de ácido acético (0 a 5 min, isocrático acetonitrila 5%; 5 a 15 min, gradiente acetonitrila de 5 a 80%; 15 a 20 min, isocrático acetonitrila 5%). A vazão da fase móvel foi de 0,2 mL min^{-1} e a temperatura da coluna foi 40°C. O volume de injeção foi 5 µL. A detecção foi feita a 320 nm e o espectro de absorção na faixa de comprimentos de onda entre 190 e 800 nm.

6.2.3 Separação das frações de carotenoides por HPLC semi-preparativo

Uma vez analisada a composição dos extratos, verificou-se duas frações bem distintas e com espectros na região do UV-Vis característicos. Para realizar a separação e coleta de volumes suficientes para análises subsequentes dessas frações, utilizou-se um HPLC semi-preparativo (LC-6AD, Shimadzu) equipado com detector PDA e coletor de frações automático. Os extratos metanólicos, previamente filtrados a 0,22 µm, foram injetados em coluna de fase reversa C18 (Zorbax, 9,4 mm x 250 mm x 5µm). Como fase móvel, foi utilizado um gradiente linear de acetonitrila (grau HPLC, Merck) e água deionizada (milli-q) com 0,1% (v/v) de ácido acético (0 a 2 min, isocrático acetonitrila 5%; 2 a 32 min, gradiente acetonitrila de 5 a 80%; 32 a 35 min, isocrático acetonitrila 80%; 35 a 40 min, isocrático acetonitrila 5%). A vazão da fase móvel foi de 3 mL min^{-1}, a temperatura da coluna 40°C e o volume de injeção foi de 1.000 µL. A detecção foi feita a 320 nm e espectro de absorção na faixa de comprimentos de onda entre 190 e 800 nm.

Devido à presença de 0,1% (v/v) de ácido acético na fase móvel aquosa, a evaporação do solvente foi feita o mais rápido possível para evitar qualquer reação indesejada. Devido à termolabilidade dos carotenoides, o aquecimento para evaporação do solvente em concentrador a vácuo (CentriVap, LabConco) ocorreu a uma temperatura abaixo de 40°C, e foi finalizada com nitrogênio. Tomou-se o cuidado para evitar que o extrato ficasse

completamente seco no frasco de vidro, pois isso poderia resultar em degradação dos carotenoides.

6.2.4 Caracterização das frações de carotenoides por espectrometria de massas sequencial

Os instrumentos hifenados LC-UV-Vis-MS têm se tornado a principal escolha para a análise de carotenoides (CEZARE-GOMES et al., 2019), sendo os instrumentos híbridos (QTOF, IT-TOF), que combinam analisadores de diferentes tipos para realizar espectrometria de massas sequencial (MS/MS), utilizados para diferenciar isômeros estruturais e identificar novos compostos (NETO et al., 2016).

Nesta análise foi utilizado o equipamento LC-MS/MS IT-TOF (Shimadzu), que fornece espectros de massas e MS/MS simultaneamente. Volumes de 5 µL das frações concentradas de carotenoides, vermelha e amarela, foram injetados no equipamento, equipado com detector PDA e fonte de ionização por 'electrospray' (ESI). Utilizou-se coluna Shim-pack XR-ODS (Shimadzu, 2,0 mm x 30 mm), fase móvel composta por um gradiente linear de acetonitrila (grau HPLC, Merck) e água deionizada (milli-q) com 0,1% (v/v) de ácido acético (0 a 2 min, isocrático com acetonitrila 5%; 2 a 15 min, gradiente linear de acetonitrila de 5 a 80%; 15 a 17 min, isocrático com acetonitrila 80%; 17 a 18 min, isocrático com acetonitrila 5%) a uma vazão de 0,2 mL min^{-1} e temperatura do forno de 40°C. A detecção no detector PDA foi feita a 320 nm. Os espectros de massa foram adquiridos com faixa de escaneamento de *m/z* de 50 a 1.000.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

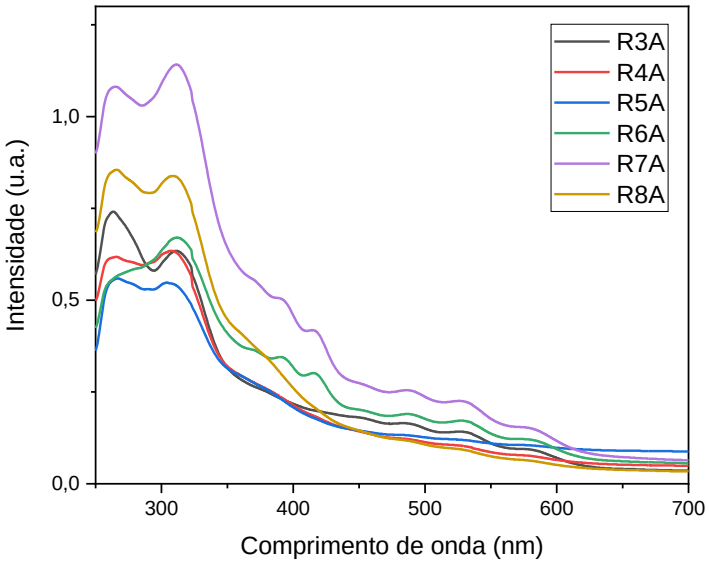
6.3.1 Caracterização dos extratos metanólicos

6.3.1.1 Espectros de absorção no UV-Vis

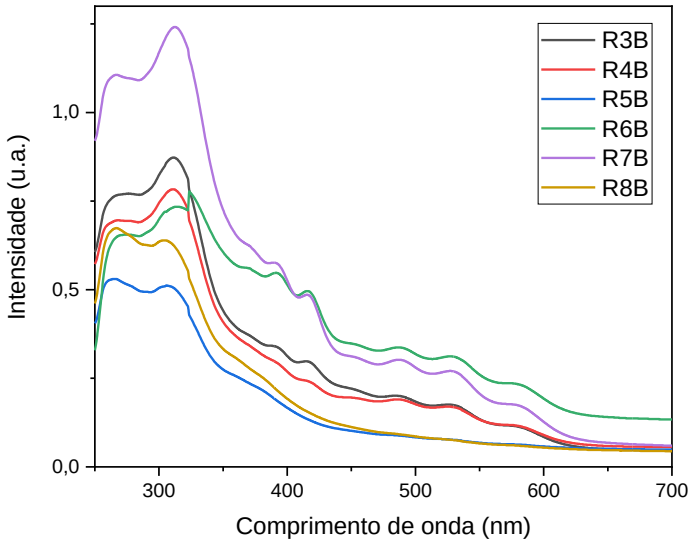
A Figura 6.5 apresenta os espectros de absorção na região de comprimentos de onda entre 250 e 700 nm dos extratos metanólicos. Praticamente todos os espectros apresentaram

picos de absorção em aproximadamente 263 e 310 nm e, exceto pelos extratos referentes aos cultivos sob 30% de CO_2 (R5A, R5B, 58A e R8B), todos também apresentaram picos em aproximadamente 292 e 416 nm, seguidos de 3 picos consecutivos em aproximadamente 487, 528 e 578 nm.

Figura 6.5 Espectros de absorção na região do UV-Vis dos extratos metanólicos. a) Reator A e b) Reator B



a)



b)

Os comprimentos de onda dos picos de absorção dos espectros na região do UV-Vis fornecem pistas sobre a estrutura das moléculas presentes na solução. Os compostos coloridos, como os carotenoides, apresentam grupos cromóforos, que são grupos que apresentam duplas ligações conjugadas, ou seja, alternadas. A maioria dos carotenoides absorve em três comprimentos de onda, resultando num espectro com três picos seguidos na região do visível. Quanto maior o número de ligações duplas conjugadas, maiores os valores de λ_{max} (PAVIA et al., 2016). Esse é o chamado deslocamento batocrômico, e ocorre porque na presença de ligações duplas conjugadas, os níveis de energia eletrônicos de um cromóforo ficam mais próximos. Consequentemente, a energia necessária para produzir uma transição de um nível de energia eletrônico ocupado para um nível desocupado diminui, e o comprimento de onda da luz absorvida fica maior (PAVIA et al., 2016). Assim, o licopeno, o mais insaturado carotenoide acíclico, com 11 duplas ligações conjugadas, é vermelho e absorve em comprimentos de onda longos (λ_{max} em 444, 470 e 502 nm) (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

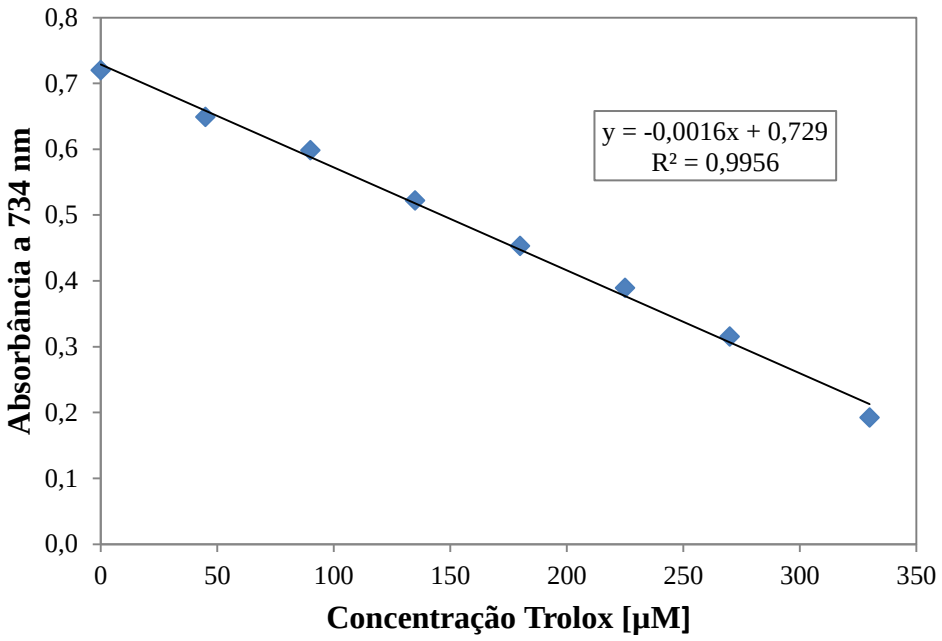
Em relação aos grupos funcionais, um grupo carbonila isolado, que não esteja em conjugação com o cromóforo, não altera o espectro. Já um grupo carbonila em conjugação com a série de ligações duplas conjugadas estende o cromóforo, resultando também num deslocamento batocrômico e perda da estrutura fina espectral. A introdução de substituintes hidróxi- e metóxi- na molécula carotenoide não afeta o cromóforo e, portanto, não produz nenhum efeito de absorção no espectro. Assim, os espectros da luteína, zeinoxantina, e α-criptoxantina se assemelham ao do α-caroteno, e os de β-criptoxantina e zeaxantina são idênticos ao do β-caroteno (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Em relação aos isômeros *cis* e *trans*, a isomerização *cis* de uma dupla ligação de um cromóforo causa uma pequena perda da cor, efeito hipocrômico, acompanhado pela aparição de um pico *cis* próximo da região ultravioleta (PAVIA et al., 2016).

6.3.1.2 Avaliação da atividade antioxidante

A Figura 6.6 apresenta a curva padrão de Trolox, composto antioxidante utilizado como referência, para o cálculo da atividade antioxidante dos extratos etanólicos.

Figura 6.6 Curva padrão de Trolox do ensaio da atividade antioxidante



Os resultados quantitativos de atividade antioxidante dos extratos etanólicos, expressos em concentração equivalente de Trolox (µM), utilizando a Equação 6.1 obtida da curva padrão, estão apresentados na Tabela 6.1.

$$C_{eq.Trolox} = \frac{(Abs - 0{,}729)}{-0{,}0016} \tag{6.1}$$

Tabela 6.1 Cálculo da concentração equivalente de Trolox dos extratos etanólicos

Concentração de CO_2 (%)	Amostra	Abs média	C eq. Trolox [µM]
5	R3A	0,620 ± 0,005	67,81
	R3B	0,626 ± 0,002	64,06
15	R4A	0,617 ± 0,009	70,00
	R4B	0,586 ± 0,013	89,38
30	R5A	0,628 ± 0,016	63,13
	R5B	0,620 ± 0,013	68,13

Todos os extratos apresentaram atividade antioxidante, a maioria entre 60 e 70 µM equivalentes de Trolox, com destaque para a amostra R4B, referente ao cultivo sob 15% CO_2

no reator B, cujo extrato apresentou atividade antioxidante de quase 90 µM equivalentes de Trolox. Isso se deve, provavelmente, à maior concentração de pigmento nessa amostra, como observado nos espectros de UV-Vis no APÊNDICE G, comparando-se os extratos em etanol. Nesses espectros, a absorbância na região do visível (de 400 a 700 nm) é de aproximadamente 0,2 para a amostra R4B, enquanto nas outras amostras os valores de absorbância estão abaixo de 0,1.

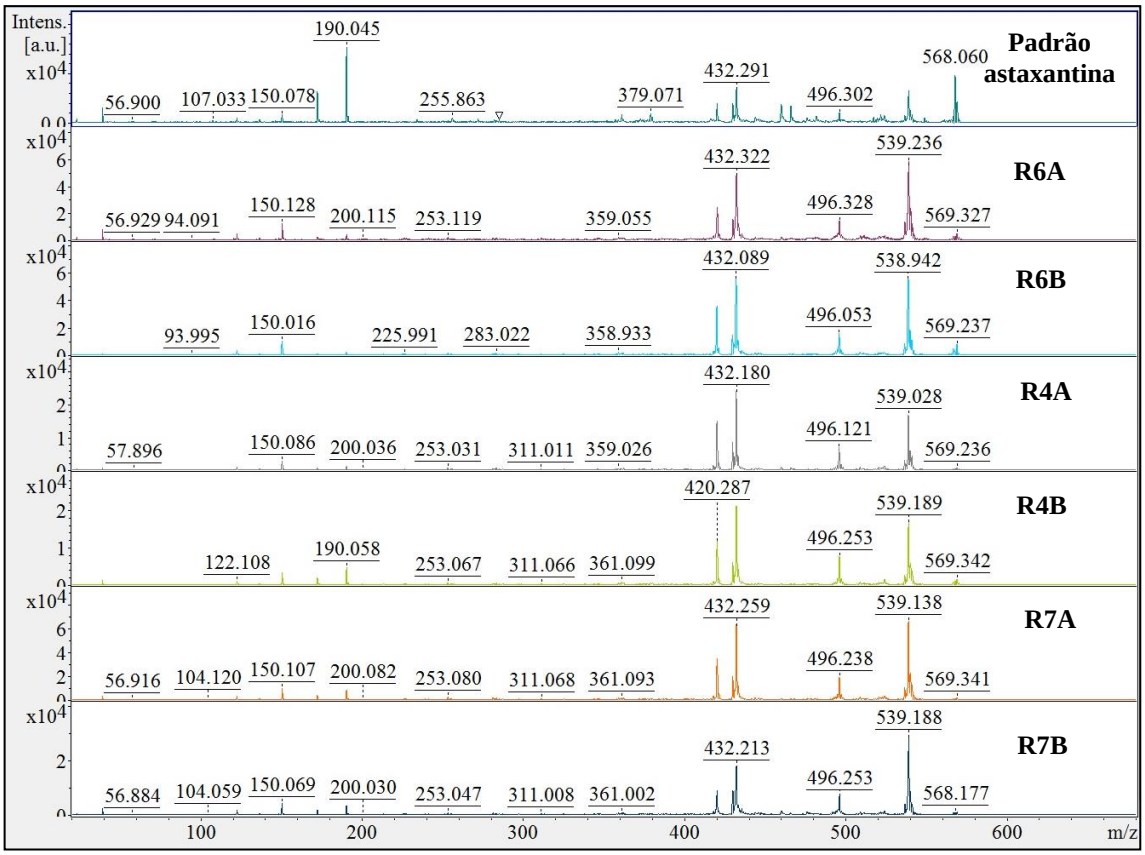
Normalmente, os valores de atividade antioxidante utilizando a metodologia TEAC são expressos em µmol Trolox/g de biomassa seca de alga (LI et al., 2007), quando se parte de uma determinada massa seca de alga e é feita a extração dos carotenoides com solvente. Porém, neste trabalho partiu-se de amostra líquida, pois os pigmentos estavam presentes no meio aquoso resultante dos cultivos das microalgas, e foram concentrados e eluídos com solvente para a obtenção dos extratos utilizados nesta análise. Dessa forma, dificulta-se a comparação com outros dados reportados na literatura.

LI e colaboradores (LI et al., 2007) reportaram a capacidade antioxidante de 23 microalgas, as quais variaram de 1,33 a 29,56 µmol Trolox/g de biomassa seca. Os autores, inclusive, relataram diferentes valores de capacidade oxidante para a mesma espécie de microalga, diferentes linhagens. Outro estudo (SHARMA; PARUL; THIYAM, 2019) avaliou a capacidade antioxidante da microalga *P. kessleri* cultivada em condições de cultivo autotróficas, mixotróficas e heterotróficas. Das condições testadas, o maior valor obtido (2,96 µmol Trolox/g) foi em condições mixotróficas com meio GB11 suplementado com glicose 20 g L^{-1}, e o menor (1,40 µmol Trolox/g) foi em condições heterotróficas, no escuro, com meio GB11 suplementado com glicose 15 g L^{-1}. Esses resultados estão na faixa de capacidade antioxidante reportada por (LI et al., 2007), e demonstraram que diferentes condições de cultivo, para a mesma espécie, resultaram em diferentes valores de capacidade antioxidante, provavelmente devido às diferenças na composição bioquímica (SHARMA; PARUL; THIYAM, 2019).

6.3.1.3 Análise por espectrometria de massas MALDI-TOF

A Figura 6.7 apresenta os espectros de massa da fragmentação TOF/TOF dos extratos metanólicos referentes aos cultivos sob 5 e 15% de CO_2 e da astaxantina.

Figura 6.7 Espectros de massas da fragmentação TOF/TOF dos extratos metanólicos referentes aos cultivos sob 5 e 15% de CO_2 e comparação com o padrão de astaxantina



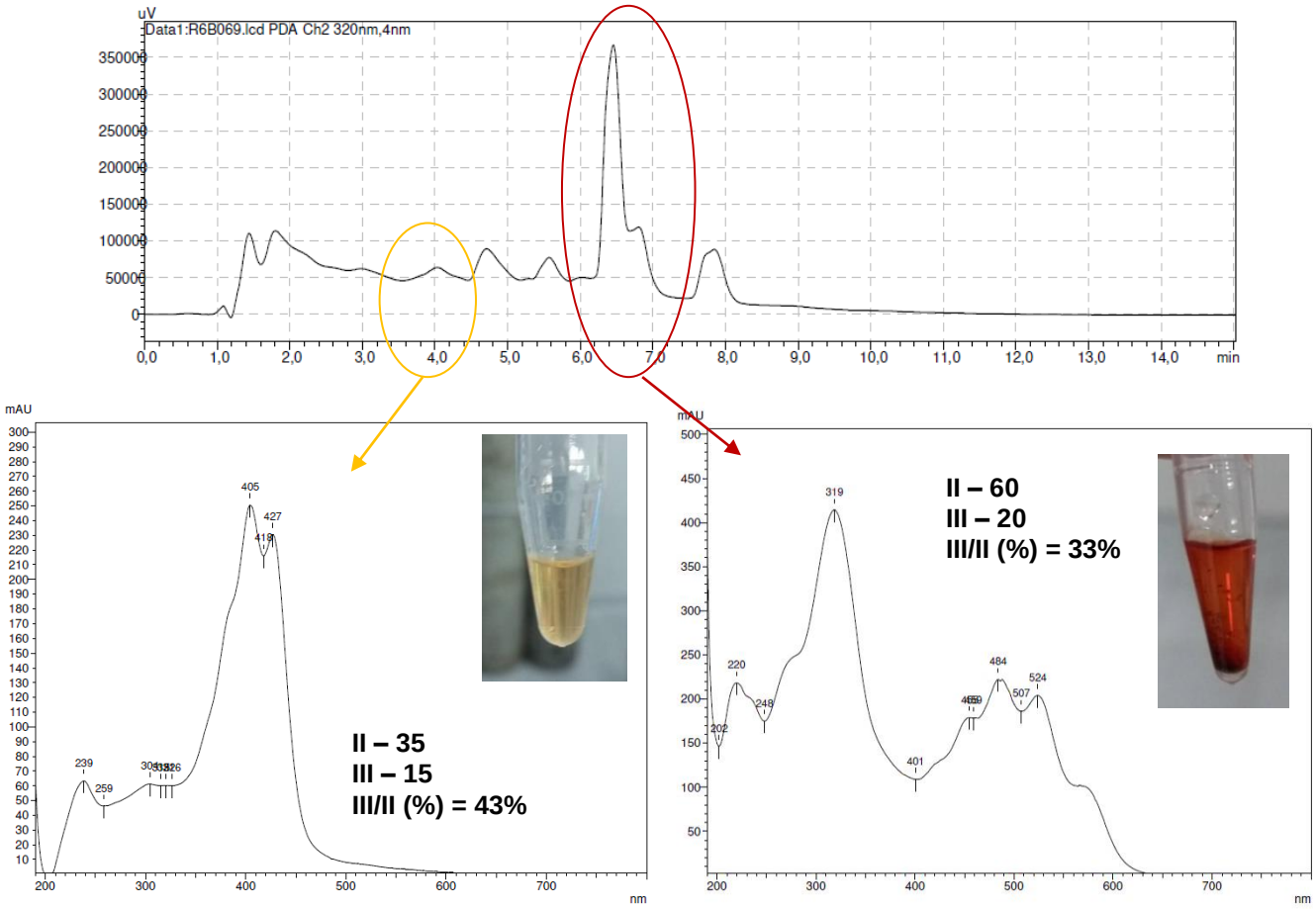
Sob ionização em MALDI-TOF, xantofilas podem formar uma combinação de íons precurssores: radical $[M]^{+\bullet}$, protonado $[M + H]^{+}$ ou aduto de sódio $[M + Na]^{+}$. Para a identificação de carotenoides utiliza-se a fragmentação TOF/TOF, porém a ocorrência de múltiplos íons precurssores não somente dilui a intensidade dos sinais, mas também dificulta a interpretação desses espectros. Em geral, não é claro se os comportamentos de fragmentação descritos para os íons gerados por ionização química à pressão atmosférica (APCI) ou ESI são aplicáveis para MALDI-TOF F(WEESEPOEL et al., 2013).

Os padrões de fragmentação dos extratos foram semelhantes, porém nesta análise não é possível afirmar se se trata do mesmo composto, visto que não é possível distinguir isômeros estruturais. No entanto, comparando-se com a astaxantina, verifica-se um íon produto em *m/z* 190, o que difere dos espectros das amostras, mostrando que o pigmento presente nas amostras não é astaxantina. Isso já era esperado, pois a massa molar da astaxantina é aproximadamente 596,8 g mol^{-1}, diferente do composto presente nas amostras, cuja massa molar é aproximadamente 568 g mol^{-1}.

6.3.1.4 Análise da composição de carotenoides por HPLC analítico

Para avaliar os carotenoides presentes nas amostras, utilizou-se o extrato metanólico da amostra R6B. O extrato foi analisado em HPLC analítico com detector PDA, o qual permitiu verificar o perfil de absorção na região do UV-Vis relacionado a cada pico do cromatograma, e assim identificar aqueles que possuíam grupos cromóforos (com absorção na região do visível do espectro luminoso) (Figura 6.8).

Figura 6.8 Cromatograma da amostra R6B em HPLC analítico com detector PDA e espectros de absorção na região do UV-Vis referentes aos picos que apresentaram absorção na região do visível, com as respectivas imagens das frações coletadas após serem concentradas

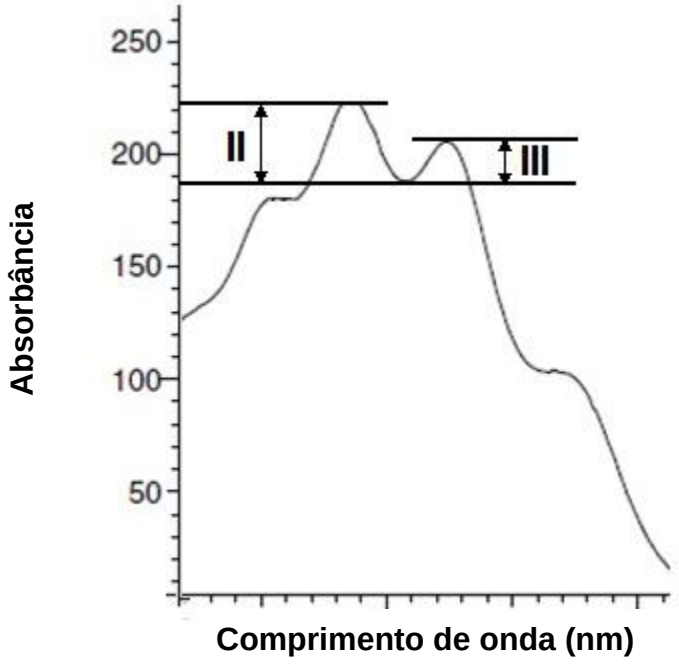


Dos picos observados no cromatograma, o pico em aproximadamente t = 4 min apresentou um espectro de absorção na região do UV-Vis com dois picos adjacentes com forte absorção em 405 e 427 nm. Da mesma forma, o pico com maior intensidade, em aproximadamente t = 6,5 min, apresentou um espectro de absorção na região do UV-Vis com máximos em aproximadamente 320 nm e outros em 455, 484 e 524 nm. Os outros picos do cromatograma não apresentaram espectros com absorção na região do visível, portanto não

foram considerados. Foi adaptado um modo para a coleta de ambas as frações no HPLC analítico, as quais, após concentradas, apresentaram coloração amarelada e avermelhada, respectivamente.

A Figura 6.8 também incluiu uma análise que ajuda na identificação dos carotenoides, que é o cálculo de III/II (%), ou seja, a razão (multiplicada por 100) entre a altura do pico de comprimento de onda mais longo (III) e o pico de absorção do meio (II), tomando como linha de base o ponto de mínimo entre os dois picos (Figura 6.9). Esse parâmetro, juntamente com o λ_{max}, fornece indícios da estrutura fina espectral do carotenoide, porém pode variar com o solvente utilizado. Em alguns casos, como o ζ-caroteno, III é maior do que II, então o valor de III/II (%) é um pouco maior do que 100. Outros carotenoides, como a cantaxantina e a equinenona, possuem espectros com um único máximo de absorção, não possuindo estrutura fina espectral definida, e então III/II (%) é 0 (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Figura 6.9 Cálculo de III/II (%) como indicativo de estrutura fina espectral



Fonte: Adaptado de RODRIGUEZ-AMAYA (2001)

Os espectros das frações de carotenoides, mostrados na Figura 6.8, apresentaram valores de III/II (%) de aproximadamente 43% e 33%, respectivamente para a fração amarela e vermelha. Somente com esta informação não é possível identificar os compostos, porém ela será útil ao ser combinada com os dados das outras análises.

6.3.2 Caracterização das frações de carotenoides por espectrometria de massas sequencial

As amostras dos pigmentos isolados foram injetadas no equipamento LC-MS/MS IT-TOF a fim de verificar os espectros de massa e padrões de fragmentação MS/MS dos pigmentos analisados (Figuras 6.10 e 6.11).

Figura 6.10 Cromatograma com detector PDA (a), espectro de massas ESI (b) e espectros de massas MS/MS (c) do pigmento amarelo

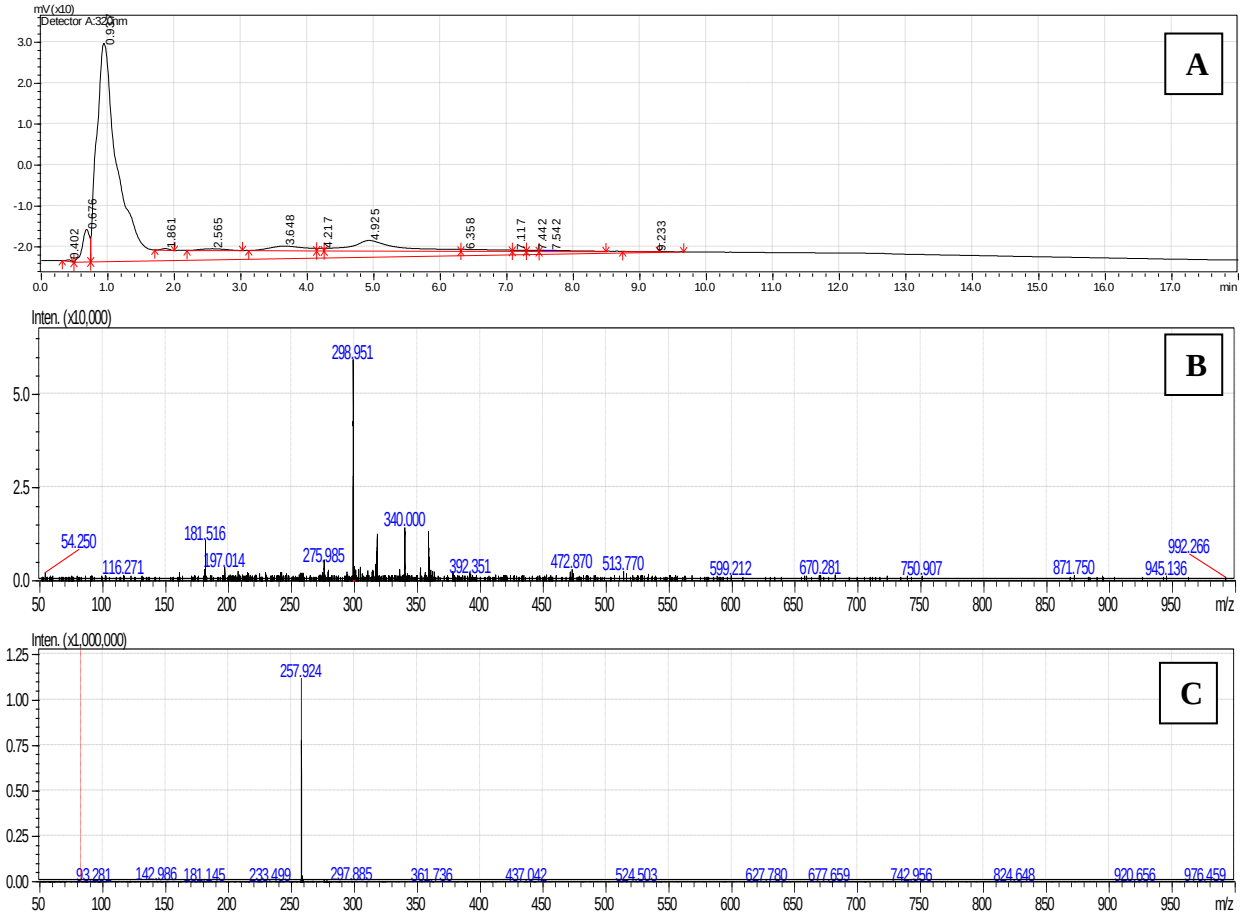
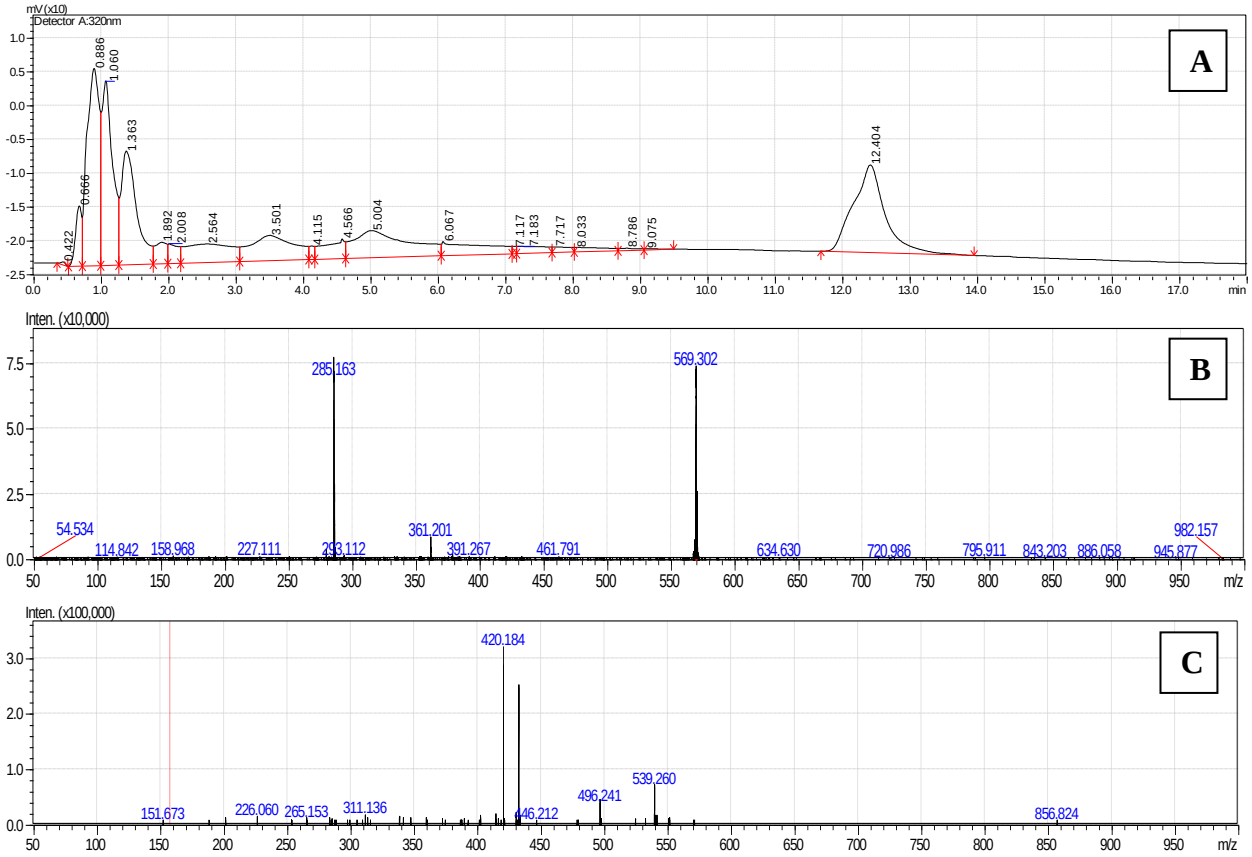


Figura 6.11 Cromatograma com detector PDA (a), espectro de massas ESI (b) e espectros de massas MS/MS (c) do pigmento vermelho



O espectro de massas do pigmento amarelo em modo íon positivo (ESI) apresentou um íon mais abundante em aproximadamente *m/z* 299 e outros menos abundantes, o que mostra que a amostra ainda não estava pura. A fragmentação MS/MS do íon em *m/z* 299 apresentou somente um íon produto em aproximadamente *m/z* 258. Alguns carotenoides podem apresentar a forma éster, a qual pode ser confirmada pela presença do íon protonado do ácido graxo ao qual está ligado, como o ácido palmítico (*m/z* 257) e oleico (*m/z* 283) (SOARES et al., 2019). No entanto, a presença de ácidos graxos nas amostras não foi confirmada.

O espectro de massas do pigmento vermelho apresentou dois íons abundantes, em aproximadamente *m/z* 285 e em *m/z* 569, o que confirma que a fração separada no HPLC semi-preparativo não estava totalmente pura. No entanto, a molécula protonada em *m/z* 569 ($[M+H]^+$) corresponde a um carotenoide com massa molar de 568 g mol^{-1}. Uma análise criteriosa avaliando todos os intermediários do metabolismo de xantofilas de microalgas utilizando a plataforma Kegg (https://www.genome.jp/kegg/) forneceu que os únicos possíveis carotenoides com essa massa molar são os isômeros zeaxantina e luteína, com

fórmula molecular $C_{40}H_{56}O_2$ (568,88 g mol^{-1}). Ainda assim, somente a massa molar não é suficiente para identificar o composto, sendo necessário também avaliar o padrão de fragmentação MS/MS, comparar com os dados reportados na literatura e combinar com as informações das outras análises.

A fragmentação MS/MS do íon em *m/z* 569 do pigmento vermelho apresentou os íons produto descritos na Tabela 6.2. Na tabela, os mais abundantes estão em negrito e os menos abundantes na fileira abaixo.

Tabela 6.2 Padrão de fragmentação MS/MS, com possíveis perdas de unidades de massas, λ_{max} (nm) e III/II (%) do pigmento vermelho

Carotenoide	λ_{max} (nm)	III/II (%)	$[M + H]^+$ (*m/z*)	Íons produto MS/MS (*m/z*)
Pigmento vermelho	320, 455, 485, 524	33	569,3	**539,3 $[M+H-30]^+$; 496,2 $[M+H-18-56]^+$; 432,2 $[M+H-137]^+$; 420,2 $[M+H-149]^+$** 551 $[M+H-18]^+$; 533 $[M+H-18-18]^+$; 477 $[M+H-92]^+$; 443 $[M+H-18-18-106]^+$; 311; 265; 226; 151

Em modo positivo ESI, carotenoides podem produzir ambos íons moleculares $M^{\bullet+}$ e moléculas protonadas $[M+H]^+$, o que pode tornar a elucidação estrutural muito complexa (GUARATINI et al., 2005). Vários íons produto estão presentes na análise MS/MS de carotenoides, especificamente em regiões de menor massa (*m/z* < 300). Esses íons produto têm sido propostos como resultantes de diversas clivagens da cadeia de polieno, acompanhadas de transferência de hidrogênio (NETO et al., 2016).

As rotas de fragmentações sugeridas são iniciadas pela eliminação de moléculas de água dos grupos oxigenados nas xantofilas. Perdas de grupos hidroxila podem ser explicadas via eliminação 1,4-, exceto pela luteína, onde os grupos hidroxila estão em posição alílica. Eliminações neutras de ácido acético ou CO também podem ocorrer. Eliminação eletrocíclica foi proposta como mecanismo para perdas neutras de 92 e 106 u (eliminação de tolueno e xileno, respectivamente), características de carotenoides (GUARATINI et al., 2005; NETO et al., 2016). Carotenoides 5,6-epóxidos formam fragmentos característicos em *m/z* 221 e 181,

os quais têm sido utilizados como diagnóstico para grupos terminais epóxidos (NETO et al., 2016).

A análise dos íons produto (Tabela 6.2) forneceu os íons mais e menos abundantes. Dentre os mais abundantes, nenhum apresentou as perdas de 18, 92 e 106 u, características de carotenoides. Moléculas protonadas $[M + H]^+$ não formam fragmentos de tolueno e xileno utilizando ESI com armadilha de íons (IT- '*ion trap*') (WEESEPOEL et al., 2013). No entanto, estes fragmentos foram observados em menor abundância, além de íons em regiões de baixa *m/z*.

Em geral, a literatura descrevendo a análise de íons produto na espectrometria de massas sequencial utiliza APCI como fronte de ionização. Nos trabalhos discutidos a seguir, todos os estudos foram realizados com APCI.

DELGADO-PELAYO e HORNERO-MENDEZ (2012) identificaram a composição de carotenoides de bagas de salsaparrilha (*Smilax aspera L.*) por LC/MS. Nos cromaogramas, o pico identificado como *all-trans* zeaxantina apresentou máximos de absorção no UV-Vis em 428, 455 e 481 nm, com uma baixa estrutura fina espectral (III/II (%) = 18). A molécula protonada $[M+H]^+$ detectada em *m/z* 569, a qual pareceu ser o fragmento mais abundante, foi consistente com a fórmula $C_{40}H_{56}O_2$ (568,4280 g mol^{-1}). A ocorrência de fragmentos em *m/z* 551 $[M+H-18]^+$ e em 533 $[M+H-18-18]^+$ confirmaram a presença de dois grupos hidroxila. Outro pico no cromatograma foi identificado como *all-trans*-luteína. O espectro de UV-Vis foi semelhante ao da zeaxantina, porém com comprimentos de onda máximos em 423, 450 e 476 nm e uma estrutura fina espectroscópica bem definida (III/II (%) = 62).

Em outro estudo, a determinação estrutural da luteína foi deduzida do espectro de LC/MS. O espectro de massas mostrou um padrão de fragmentação característico, o qual já foi utilizado para distinguir luteína de outras xantofilas (ATIENZA et al., 2007). Sob modo íon positivo, o espectro de massas de luteína é caracterizado pela presença de uma molécula protonada ($[M+H]^+$) em *m/z* 569 com baixa abundância e um íon em *m/z* 551 sendo o fragmento mais abundante, correspondendo à perda de uma molécula de água ($[M+H - 18]^+$). Outra perda de água produziu outro fragmento, menos abundante, em *m/z* 533 ($[M+H-18-18]^+$). Ao contrário, para a zeaxantina o íon mais abundante correspondeu à molécula protonada em *m/z* 569, seguido pelo fragmento em *m/z* 551 e pelo fragmento em *m/z* 533.

RODRIGUES, MARIUTTI e MERCADANTE (2016) analisaram o padrão de fragmentação dos isômeros *cis* e *trans* de luteína e zeaxantina, mostrados na Tabela 6.3. A

única semelhança em relação aos íons mais abundantes da Tabela 6.2 foi o íon em *m/z* 496,2 observado em luteína.

Tabela 6.3 Padrão de fragmentação MS/MS, λ_{max} (nm) e III/II (%) dos isômeros *cis* e *trans* da luteína e da zeaxantina

Carotenoide	λ_{max} (nm)	III/II (%)	$[M + H]^+$ (*m/z*)	Íons produto MS/MS (*m/z*)
13-*cis*-luteína ou 13´-*cis*-luteína	330, 413, 438, 466	25	nd	551,5 $[M+H-18]^+$; 533,5 $[M+H-18-18]^+$; 496,2 $[M+H-18-56]^+$; 477,4 $[M+H-92]^+$; 459,5 $[M+H-18-92]^+$, 429,3
all-trans-luteína	420, 445, 473	65	569,5	551,5 $[M+H-18]^+$; 533,5 $[M+H-18-18]^+$; 495,4 $[M+H-18-56]^+$; 476,4 $[M+H-92]^+$; 459,4 $[M+H-18-92]^+$, 430,4
all-trans-zeaxantina	425, 450, 477	28	569,6	551,5 $[M+H-18]^+$; 533,5 $[M+H-18-18]^+$; 476,4 $[M+H-92]^+$
9-*cis*-luteína	325, 418, 440, 467	55	nd	551,5 $[M+H-18]^+$; 533,5 $[M+H-18-18]^+$; 429,8
9´-*cis*-luteína	330, 417, 441, 468	30	nd	551,5 $[M+H-18]^+$; 533,5 $[M+H-18-18]^+$; 495,4 $[M+H-18-56]^+$; 477,5 $[M+H-92]^+$; 459,4 $[M+H-18-92]^+$, 429,6

nd – não detectado

Fonte: RODRIGUES; MARIUTTI; MERCADANTE (2016)

6.4 CONCLUSÃO

Os pigmentos produzidos extracelularmente pela microalga *P. kessleri* apresentaram maior solubilidade em metanol, e um método relativamente simples de pré-purificação em coluna de sílica foi proposto. Os extratos resultantes de cada cultivo (em diferentes condições de CO_2), aproximadamente 10 vezes concentrados, foram caracterizados. Todos apresentaram atividade antioxidante e tiveram o mesmo perfil de absorbância no UV-Vis e espectros de massas MALDI semelhantes. Os extratos foram analisados em HPLC, e duas frações, uma amarela e outra vermelha, foram identificadas com forte absorção na região do visível, característica de carotenoides. Volumes significativos dessas frações foram separados em HPLC em escala semi-preparativa para subsequente caracterização. A análise de fragmentação MS/MS da fração amarela não foi conclusiva com os dados obtidos, porém a fração vermelha apresentou um íon abundante em *m/z* 569, cujos íons produtos foram característicos de carotenoides. Carotenoides com essa massa molar (aproximadamente 568 g mol^{-1}) possuem a fórmula molecular $C_{40}H_{56}O_2$, e uma busca na base de dados Kegg forneceu os possíveis isômeros: zeaxantina e luteína. No entanto, a combinação dos dados obtidos e da literatura não foi conclusiva para identificar o principal composto dos extratos.

CAPÍTULO 7

7.1 DISCUSSÕES GERAIS

No contexto de mudanças climáticas e diversas estratégias de mudanças da matriz energética para soluções mais sustentáveis, este trabalho apresenta a sua contribuição. Dentre os projetos do RCGI, em que este trabalho está inserido, que apontam o gás natural como uma transição para fontes renováveis de energia, este trabalho contribui com uma abordagem biotecnológica da conversão de CO_2 em correntes gasosas com alto teor (até 30% v/v) desse gás, como ocorre no gás natural, cujo teor de CO_2 pode variar de aproximadamente 8 até 30%, dependendo da fonte. Os processos de captura, armazenamento e utilização de CO_2 representam um desafio tecnológico, principalmente pelo risco associado ao armazenamento de CO_2 por longos períodos geológicos e às condições normalmente severas para produção de catalisadores para a conversão química, além da especificidade necessária e outros fatores. A proposta de conversão biológica de CO_2 levou em consideração que esses processos já ocorrem naturalmente por organismos fototróficos, como as microalgas. Em geral, os microrganismos podem ser considerados "micro-reatores", os quais podem converter diversos compostos em produtos de interesse comercial. Alguns desses produtos podem ser muito difíceis de serem sintetizados por rotas químicas, como os estereoespecíficos, e essa representa uma das principais vantagens da bioconversão, além da especificidade por um determinado substrato (como o CO_2, por exemplo) e condições brandas de cultivo (temperatura na faixa de 30°C, dependendo do microrganismo, e pressão atmosférica) (DEMAIN, 2007).

O primeiro desafio do trabalho foi encontrar microalgas que pudessem fazer essa conversão em correntes gasosas com alto teor de CO_2, visto que altos níveis de CO_2 podem inibir o crescimento de microalgas. Uma busca na literatura forneceu possíveis candidatas tolerantes a altas concentrações de CO_2 (ONO; CUELLO, 2003), porém linhagens comerciais já demonstraram menor adaptabilidade às condições laboratoriais. Dessa forma, recorreu-se à microbiota de locais com condições ambientais extremas, visto que nesses locais os microrganismos já estão adaptados a essas condições e provavelmente apresentam maior robustez em cultivos em laboratório e em maior escala. A bioprospecção de microalgas em regiões de mangues próximos a Cubatão, município conhecido por altos índices de poluição,

foi a estratégia utilizada. O próprio mangue apresenta altos níveis de CO_2, por ser um local com grande quantidade de matéria orgânica em decomposição.

Essa estratégia foi essencial para as etapas seguintes. Utilizou-se as técnicas de enriquecimento, a qual em si já é uma técnica de seleção, já que seleciona as espécies que cresceram num determinado meio de cultura (no caso, o meio WC), seguida da pré-seleção a 30% de CO_2. A última resultou em consórcios de microalgas tolerantes a altas concentrações de CO_2, a partir dos quais foram isoladas 4 microalgas diferentes, como descrito no Capítulo 3. Todo esse processo, desde o recebimento das amostras coletadas até o isolamento de espécies, foi laborioso e durou em torno de um ano. Uma das principais dificuldades foi a verificação do isolamento, necessária para se trabalhar com culturas puras. A confirmação ocorreu após uma avaliação criteriosa das culturas por microscopia óptica e pela identificação utilizando técnicas de biologia molecular. A combinação dessas técnicas confirmou o isolamento de 4 espécies diferentes, das quais 3 foram identificadas: *Parachlorella kessleri*, *Scenedesmus* sp. e *Chlorella vulgaris*. A pesquisa bibliográfica sobre essas espécies corroborou com os resultados dessa seleção, visto que essas espécies já foram reportadas por crescerem sob condições de níveis de CO_2 elevados (SALIH, 2011). Não obstante, os relatos indicaram o potencial para obtenção de produtos de alto valor agregado, como ácidos graxos e carotenoides, através do cultivo dessas espécies (FU et al., 2019; MINHAS et al., 2016; PANCHA et al., 2014). Dessa forma, estabeleceu-se uma metodologia para a avaliação das cinéticas de crescimento e formação de produtos dessas espécies sob diferentes concentrações de CO_2, a fim de verficar potenciais aplicações biotecnológicas.

Um dos desafios da etapa de avaliação cinética foi estabelecer um sistema adequado. Cultivos com substratos gasosos exigem frascos com vedação para gases. Além disso, quando o gás é alimentado diretamente no meio líquido, a transferência de massa é melhorada, porém a sua vazão volumétrica passa a ser um parâmetro importante a ser controlado, pois esta interfere na quantidade de CO_2 e O_2 dissolvidos, alterando o perfil cinético das microalgas. Além disso, a alimentação contínua de gás nos cultivos não foi necessária, já que a corrente gasosa foi composta por CO_2 em excesso. Dessa forma, a metodologia mais adequada, e a que foi empregada, foi a saturação do *headspace* dos frascos com a mistrura gasosa, nas diferentes composições, e a renovação diária dessa atmosfera até o final do cultivo, garantindo que a concentração de CO_2 nos frascos fosse praticamente constante. O principal objetivo dessa etapa de avaliação cinética foi selecionar as microalgas que apresentassem melhor crescimento e maior produção de biomassa para os cultivos em fotobiorreator, além de

verificar o comportamento de cada uma em cultivos com diferentes concentrações de CO_2 (0,04, 5, 15 e 30%).

Outro desafio nessa etapa foi garantir a iluminação dos frascos de forma homogênea, já que a luz é fator determinante no crescimento de microalgas. Como o único parâmetro alterado entre os cultivos foi a concentração de CO_2, foi necessário medir a luminosidade em cada ponto da incubadora, onde os cultivos foram realizados, e selecionar os locais com mesma luminosidade. Um experimento utilizando a microalga *Scenedesmus* sp. avaliou o crescimento em cada ponto, e assim confirmou os locais cujo crescimento da microalga foi similar. O cultivo das microalgas isoladas nas quatro condições de CO_2 estipuladas representou uma vasta varredura e um grande número de experimentos. No entanto, os resultados foram determinantes para a etapa em fotobiorreator. A microalga *C. vulgaris* apresentou uma produção de biomassa de quase metade dos valores obtidos pelas outras avaliadas, no mesmo período de cultivo, e, portanto, não foi utilizada nos experimentos em fotobiorreator. Já a *P. kessleri*, em uma das repetições dos experimentos, apresentou um sobrenadante de cor avermelhada após a separação das células, uma curiosa situação que não havia ocorrido até o momento. A diferença entre esse experimento e os anteriores foi a "negligência" em não realizar a troca de atmosfera nos últimos 2 dias de cultivo. Essa condição foi, então, confirmada em um experimento com *P. kessleri* em frascos com atmosfera a 5% de CO_2, tendo como controle os frascos onde não houve a interrupção da troca de atmosfera. Como um dos objetivos do trabalho foi a investigação de potenciais bioprodutos, esta microalga foi a candidata à avaliação em fotobiorreator, onde foi possível monitorar, controlar e avaliar mais parâmetros, e assim obter uma maior compreensão das cinéticas de formação de bioprodutos.

Novamente, os principais desafios do cultivo de microalgas em fotobiorreator foram garantir iluminação homogênea em todos os pontos no interior do reator, e igual, quando trabalhando com mais de um reator ao mesmo tempo. Considerando o longo período de 14 dias de cultivo, e a grande quantidade de experimentos necessária para avaliar o desempenho da microalga em diferentes concentrações de CO_2, optou-se por realizar duplicatas simultaneamente, o que implicou em validar o sistema de iluminação, especialmente desenhado para essa finalidade, de dois reatores. Por isso, se fez necessário um experimento de actinometria, no qual foi possível medir a incidência de fótons no interior dos dois reatores e assim confirmar que ambos possuíam incidência de fótons similares, considerando os erros experimentais. Foi necessário validar também a forma de alimentação de gases nos reatores, a

fim de transpor o que foi feito nos ensaios em frascos. Duas formas de aeração (ar com 5% de CO_2) foram verificadas, uma contínua e outra intermitente, utilizando a microalga *Scenedesmus* sp.. Além de comprovar que o sistema experimental (iluminação, controle da temperatura, tipo de agitador, agitação) estava adequado para o cultivo de microalgas, estas se mostraram robustas. Pelo sistema de aeração contínua foi possível confirmar a concentração de 5% de CO_2 utilizando um analisador de gases na saída do reator, e também monitorar os perfis de pH e oxigênio dissolvido sem qualquer interferência na composição gasosa durante o cultivo, o que é particularmente interessante para entender o comportamento da microalga. No entanto, os resultados apresentaram parâmetros cinéticos muito similares entre as duas condições de aeração. Assim, o sistema de aeração intermitente foi mais adequado e utilizado nos experimentos seguintes, visto que minimiza o desperdício e as emissões de CO_2, principalmente considerando os cultivos a 30% de CO_2.

Uma vez validado o sistema de fotobiorreatores, os cultivos com *P. kessleri* foram executados em duas bateladas simultâneas nas mesmas condições, com concentrações de 5, 15 e 30% de CO_2. Nesses cultivos, o método consistiu em utilizar a aeração intermitente até o décimo dia de cultivo, quando esta foi interrompida até o final do cultivo (dia 14). Essa estratégia, até onde se conhece, não foi reportada na literatura, o que demonstrou seu caráter inovador. Como constatado previamente nos ensaios em frascos agitados, essa condição de operação foi imperativa para produção de pigmentos extracelulares pela microalga. Ao todo foram realizadas 4 repetições para a mesma concentração de CO_2, dois ensaios com duas bateladas simultâneas. Os resultados mostraram a reprodutibilidade do método, a robustez da microalga, e possibilitou uma análise estatística dos parâmetros fisiológicos avaliados.

As velocidades específicas de crescimento calculadas foram 0,74 ± 0,09, 0,74 ± 0,08 e 0,77 ± 0,11 dia^{-1} sob 5, 15 e 30% de CO_2, respectivamente, e as diferenças não foram estatisticamente significativas ($p>0,05$). As concentrações em massa seca das células no 14º dia de cultivo foram 1,09 ± 0,12, 1,24 ± 0,15 e 1,09 ± 0,25 g L^{-1}, lipídeos totais foram 241 ± 11, 208 ± 5 e 183 ± 14 mg g^{-1} (massa seca) e taxas de fixação de CO_2 foram 158 ± 7, 165 ± 5 e 141 ± 3 mg $L^{-1}d^{-1}$, sob 5, 15 e 30% de CO_2, respectivamente. Minhas e colaboradores (2016) relataram 21,42% (massa seca) de conteúdo lipídico em *P. kessleri* e De Morais e Costa, (2007) relataram 163 mg $L^{-1}d^{-1}$ de taxa de fixação de CO_2 a 18% de CO_2. Ambos os valores corroboram os resultados obtidos neste trabalho. A produção de carotenoides foi observada em todos os cultivos, com concentrações de aproximadamente 0,030 ± 0,005, 0,026 ± 0,006 e 0,011 ± 0,002 µg mL^{-1} sob 5, 15 e 30% de CO_2, e as diferenças foram estatisticamente

significativas ($p<0,05$). Dessa forma, a variação da concentração de CO_2 nos cultivos não provocou um efeito significativo nas cinéticas de crescimento, mas afetou drasticamente a produção de carotenoides totais. Nesse sentido, os cultivos com níveis de CO_2 até 15% foram mais efetivos para maximizar a formação de carotenoides extracelulares pela *P. kessleri*.

Um processo simplificado para a purificação dos carotenoides nos extratos obtidos foi proposto, utilizando inicialmente a separação por cromatografia em coluna de sílica C18 e eluição com metanol. Assim, foi possível concentrar o pigmento em aproximadamente 10 vezes. Um método mais refinado foi proposto, utilizando HPLC em escala semi-preparativa, para separar as frações de carotenoides nos extratos metanólicos. Com essa metodologia, duas frações foram separadas, uma amarela e outra vermelha, as quais apresentaram perfis de absorbância, na região visível do espectro de luz, característicos de carotenoides. A análise por LC-MS/MS da fração avermelhada apontou para um carotenoide com peso molecular 569 g mol^{-1}, que pode corresponder a zeaxantina ou luteína. A fragmentação MS/MS do íon molecular em *m/z* 569 apresentou as perdas de massa normalmente relatadas na maioria dos carotenoides, mas não foi conclusiva quanto à elucidação molecular deste carotenoide.

Outro objetivo do trabalho foi verificar a biomassa produzida, pelas diferentes microalgas nas diferentes condições de cultivo, e assim propor possíveis aplicações biotecnológicas. Diversos trabalhos têm sido orientados para a otimização da produção de lipídeos por microalgas e dos métodos de extração, principalmente visando à produção de biocombustíveis (CHISTI, 2007). Nesse sentido, partiu-se da hipótese que altas concentrações de CO_2 podem estimular a produção de lipídeos intracelulares, e assim, essa hipótese foi investigada nos cultivos com diferentes concentrações de CO_2 (KASSIM; MENG, 2017). Como método de extração, utilizou-se o método clássico Bligh & Dyer modificado, e posterior reação de transesterificação para a análise dos ácidos graxos. Essa forma de analisar somente os ácidos graxos afunilou as possibilidades, o que foi imprescindível para o trabalho, já que uma análise lipidômica de todas as microalgas em todas as condições de cultivos, apesar de interessante, seria um trabalho à parte. Os resultados mostraram diferentes perfis de ácidos graxos nas diferentes microalgas, porém, em geral, o ácido graxo presente em maior quantidade foi o ácido palmítico, o que está de acordo com outros trabalhos (ANDRADE et al., 2015). Outros ácidos graxos industrialmente relevantes, como 18:1(ω-9), 18:2 (ω-6) e 18:3 (ω-3) foram detectados.

O modo de operação influenciou a composição de ácidos graxos, e a principal diferença foi na concentração de ácido oleico (18:1), que foi maior nos cultivos com 15% de

CO_2. Efeitos similares foram reportados em cultivos com limitação de nitrogênio (VAN DER HA et al., 2012), um dos métodos mais utilizados para estimular a produção de lipídeos. Esses resultados confirmaram o potencial da utilização de altas concentrações de CO_2 como um método estratégico para melhorar a produção de lipídeos por microalgas. Os cultivos da *P. kessleri* em fotobiorreatores foram necessários para obter grandes quantidades de biomassa, e assim avaliar também a composição de ácidos graxos durante as fases de crescimento. A maior quantidade de ácido oleico após a fase de crescimento exponencial, em oposição ao início do cultivo, confirmou também a hipótese de mudança na composição lipídica quando o cultivo atinge alta densidade celular. As diferenças de ácidos graxos saturados e insaturados também foram avaliados durante as fases de crescimento e nas diferentes concentrações de CO_2. A este respeito, o presente trabalho sugeriu que os níveis de CO_2 nos cultivos impactaram na potencial aplicação biotecnológica da biomassa. Altas concentrações de CO_2 de 15 e 30% elevaram os ácidos graxos saturados e mono-insaturados em *P. kessleri*, tornando a biomassa mais adequada para a produção de biodiesel, enquanto diminuíram drasticamente ω-3. Em oposição, 5% de CO_2 pode ser uma estratégia para a produção de ácidos graxos poli-insaturados para um mercado de alto valor agregado.

7.2 CONCLUSÕES GERAIS

A bioprospecção em mangues, pré-seleção a 30% de CO_2 e isolamento de microalgas foram ferramentas eficientes para se obter consórcios de microalgas e culturas puras tolerantes a altas concentrações de CO_2, o que foi pré-requisito para o andamento do trabalho. Os ensaios cinéticos com os isolados de microalgas utilizando ar atmosférico (0,04% CO_2) e misturas gasosas com ar e CO_2 nas concentrações de 5, 15 e 30% forneceram parâmetros, como velocidade específica de crescimento, máxima concentração celular e composição de ácidos graxos, necessários para identificar microorganismos com potencial para aplicações biotecnológicas. Desse estudo, as microalgas *Scenedesmus* sp. e *P. kessleri* se destacaram pela robustez e rápido crescimento, principalmente em concentrações de CO_2 de 5 e 15%. Particularmente, *P. kessleri* foi avaliada por produzir carotenoides extracelulares, com propriedades antioxidantes, que representam um produto de alto valor agregado e uma opção mais viável nos processos *downstream* frente aos carotenoides intracelulares. O sistema de fotobiorreatores foi validado para garantir iluminação homogênea e aeração adequada para

uma avaliação criteriosa dos parâmetros fisiológicos nos cultivos de *P. kessleri* sob 5, 15 e 30% de CO_2. O método utilizado, no qual o suprimento de CO_2 foi interrompido no 10º dia de cultivo, foi condição imperativa para as microalgas liberarem o pigmento para o meio, ao final dos cultivos. Além dos resultados confirmarem a reprodutibilidade do método inovador, a concentração de carotenoides totais foi afetada pelos níveis de CO_2, sendo que provavelmente sob 30% a maior concentração de CO_2 no final do cultivo "retardou", ou não favoreceu, a formação do pigmento. A caracterização química dos extratos não foi conclusiva na composição exata, porém duas frações, com diferentes colorações e características de carotenoides, foram eficientemente separadas. A quantidade de CO_2 também afetou a composição de ácidos graxos na biomassa, favorecendo a produção dos poli-insaturados com 5% de CO_2, utilizados principalmente para aplicações farmacêuticas e nutracêuticas, e dos saturados e mono-insaturados, normalmente utilizados como matéria-prima para a produção de biodiesel, com 15 e 30%. Assim, para o uso de outras fontes de CO_2 que não o ar atmosférico no cultivo de microalgas, a concentração de CO_2 deve ser avaliada de acordo com a aplicação desejada.

7.3 PERSPECTIVAS FUTURAS

Algumas sugestões de trabalhos futuros podem ser feitas:

- Neste trabalho, optou-se por utilizar culturas puras nos ensaios cinéticos. Porém, a utilização de consórcios, tanto de diferentes microalgas ou de microalgas e outros microrganismos (como bactérias e fungos), que podem realizar alguma atividade específica, tem sido amplamente estudada (COOPER; SMITH, 2015; SUBASHCHANDRABOSE et al., 2011) e é muito promissora, pois é o que já normalmente ocorre na natureza. A etapa de pré-seleção resultou em consórcios com grande potencial para serem estudados em aplicações utilizando misturas gasosas com elevado teor de CO_2. O desafio dos consórcios é, principalmente, mantê-los com a mesma composição durante longos períodos, como ocorre nas culturas puras;
- Uma vez estabelecido o método para a formação de pigmentos extracelulares por *P. kessleri* e a concentração de CO_2 que forneceu os melhores rendimentos (5%), outros parâmetros e métodos podem ser avaliados para aumentar a produtividade de biomassa e os rendimentos de carotenoides e ácidos graxos poli-insaturados. Primeiro, sugere-se

realizar uma análise de viabilidade técnico-econômica para produção de lipídeos e carotenoides desses cultivos a fim de identificar os gargalos.

- A alteração da composição do meio de cultura (com nutrientes oriundos de resíduos agroindustriais) e a limitação por nutrientes (com fatores de diluição) após a fase de crescimento exponencial são estratégias amplamente descritas e que podem ser efetivas. Além disso, iniciar o cultivo com maior densidade de células pode aumentar a produtividade de biomassa e a fixação de CO_2;
- Outra possibilidade para aumentar rendimentos é avaliar diferentes formas de iluminação, podendo alterar o fotoperíodo e a incidência de fótons. Sabe-se que uma alta incidência de fótons pode estimular a produção de carotenoides e lipídeos, porém esta deve ser abaixo do ponto de saturação para não causar um efeito inibidor;
- O monitoramento do pH e do oxigênio dissolvido mostraram o comportamento da microalga nos cultivos com diferentes concentrações de CO_2. Uma vez bem estudado esse comportamento, é possível propor estratégias para o controle desses parâmetros no fotobiorreator. O pH controlado na faixa entre 7 e 8 é considerado ideal para o cultivo de microalgas. Já o oxigênio dissolvido pode produzir efeitos variados no crescimento e formação de produtos. Dessa forma, esses efeitos podem ser avaliados e um sistema adequado proposto, como uma coluna de separação para reter o oxigênio (o que já foi relatado na literatura), se constatado que esse parâmetro causa um efeito inibidor;
- Caracterização química completa, por exemplo utilizando as técnicas de RMN ^{1}H e ^{13}C para a elucidação da composição do extrato de carotenoides, e ensaios de estabilidade e toxicidade, para verificar o potencial para aplicações farmacêuticas e nutracêuticas.

7.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMINI, H.; HASHEMISOHI, A.; WANG, L. J.; SHAHBAZI, A. *et al.* Numerical and experimental investigation of hydrodynamics and light transfer in open raceway ponds at various algal cell concentrations and medium depths. **Chemical Engineering Science**, 156, p. 11-23, Dec 2016.

AMOROSO, G.; SULTEMEYER, D.; THYSSEN, C.; FOCK, H. P. Uptake of HCO_3^- and CO_2 in cells and chloroplasts from the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Dunaliella tertiolecta*. **Plant Physiology**, 116, n. 1, p. 193-201, Jan 1998.

ANDERSEN, R. A.; BERGES, J. A.; HARRISON, P. J.; WATANABE, M. M. Appendix A - recipes for freshwater and seawater media. *In*: Academic Press, 2004. p. 429-538.

ANDERSEN, R. A. & KAWACHI, M. Traditional microalgae isolation techniques. In: ANDERSEN, R. A. (ed.) Algal Culturing Techniques. San Diego: Elsevier, 2005.

ANDRADE, L. M.; MENDES, M. A.; KOWALSKI, P.; NASCIMENTO, C. A. O. Comparative study of different matrix/solvent systems for the analysis of crude lyophilized microalgal preparations using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 29, n. 3, p. 295-303, Feb 2015.

ATIENZA, S. G.; BALLESTEROS, J.; MARTIN, A.; HORNERO-MENDEZ, D. Genetic variability of carotenoid concentration and degree of esterification among tritordeum (xTritordeum Ascherson et Graebner) and durum wheat accessions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55, n. 10, p. 4244-4251, May 2007.

BADGER, M. R.; ANDREWS, T. J.; WHITNEY, S. M.; LUDWIG, M. *et al.* The diversity and coevolution of Rubisco, plastids, pyrenoids, and chloroplast-based CO_2-concentrating mechanisms in algae. **Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique**, 76, n. 6, p. 1052-1071, Jun 1998.

BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. **Annual Review of Plant Biology**, 59, p. 89-113, 2008.

BALCOMBE, P.; ANDERSON, K.; SPEIRS, J.; BRANDON, N. *et al.* Methane and CO_2 emissions from the natural gas supply chain - an evidence assessment. p. 1-105, 2015.

BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, 25, n. 2, p. 207-210, Mar-Apr 2007.

BEIJERINCK, M. W. Kulturversuche mit Zoochlorellen Lichenogonidien und anderen Niederen. **Alg. Bot. Z**, 48, p. 725, 1890.

BERENGUEL, M.; RODRIGUEZ, F.; ACIEN, F. G.; GARCIA, J. L. Model predictive control of pH in tubular photobioreactors. **Journal of Process Control**, 14, n. 4, p. 377-387, Jun 2004.

BHAKTA, J. N.; LAHIRI, S.; PITTMAN, J. K.; JANA, B. B. Carbon dioxide sequestration in wastewater by a consortium of elevated carbon dioxide-tolerant microalgae. **Journal of CO2 Utilization**, 10, p. 105-112, Jun 2015.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil (chave para identificação e descrições)** São Carlos: RiMa Editora, 2006. 502 p.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method for total lipid extraction and purification. ***Can J Biochem Physiol***, 37, p. 911–917, 1959.

BORGES, A. V.; DJENIDI, S.; LACROIX, G.; THEATE, J. *et al.* Atmospheric CO_2 flux from mangrove surrounding waters. **Geophysical Research Letters**, 30, n. 11, Jun 2003.

BOROWITZKA, M. A. High-value products from microalgae-their development and commercialisation. **Journal of Applied Phycology**, 25, n. 3, p. 743-756, Jun 2013.

BORRERO-SANTIAGO, A. R.; DELVALLS, T. A.; RIBA, I. Carbon Capture and Storage (CCS): Risk assessment focused on marine bacteria. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 131, p. 157-163, Sep 2016.

BRAUN, A. M.; MAURETE, M. T.; OLIVEROS, E. **Photochemical Technology**. Chichester: John Wiley and Sons Ltd, 1991.

BREUER, G.; EVERS, W. A. C.; DE VREE, J. H.; KLEINEGRIS, D. M. M. *et al.* Analysis of Fatty Acid Content and Composition in Microalgae. **Jove-Journal of Visualized Experiments**, n. 80, Oct 2013.

BRITTON, G. (ed.). **General carotenoids methods**. Academic Press, 1985. 113-149 p. (Methods in Enzimology.

BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN , S.; PFANDER , H. **Carotenoids - *Handbook*** Springer Basel AG, 2004.

BROSSI, M.; MENDES, L. W.; GERMANO, M. G.; LIMA, A. B. *et al.* Assessment of Bacterial bph Gene in Amazonian Dark Earth and Their Adjacent Soils. **Plos One**, 9, n. 6, Jun 2014.

BUDINIS, S.; KREVOR, S.; MACDOWELL, N.; BRANDON, N. *et al.* Can technology unlock 'unburnable carbon'?, 2016.

BUESSELER, K. O.; ANDREWS, J. E.; PIKE, S. M.; CHARETTE, M. A. The effects of iron fertilization on carbon sequestration in the Southern Ocean. **Science**, 304, n. 5669, p. 414-417, Apr 2004.

CEZARE-GOMES, E. A.; MEJIA-DA-SILVA, L. D.; PEREZ-MORA, L. S.; MATSUDO, M. C. *et al.* Potential of Microalgae Carotenoids for Industrial Application. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 188, n. 3, p. 602-634, Jul 2019.

CHEKANOV, K.; SCHASTNAYA, E.; SOLOVCHENKO, A.; LOBAKOVA, E. Effects of CO_2 enrichment on primary photochemistry, growth and astaxanthin accumulation in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, 171, p. 58-66, Jun 2017.

CHEN, C. Y.; YEH, K. L.; AISYAH, R.; LEE, D. J. *et al.* Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. **Bioresour Technol**, 102, n. 1, p. 71-81, Jan 2011.

CHEN, Z. J.; ZHANG, X. R.; JIANG, Z. Y.; CHEN, X. H. *et al.* Light/dark cycle of microalgae cells in raceway ponds: Effects of paddlewheel rotational speeds and baffles installation. **Bioresource Technology**, 219, p. 387-391, Nov 2016.

CHENG, J.; LI, K.; YANG, Z. B.; ZHOU, J. H. *et al.* Enhancing the growth rate and astaxanthin yield of Haematococcus pluvialis by nuclear irradiation and high concentration of carbon dioxide stress. **Bioresource Technology**, 204, p. 49-54, Mar 2016.

CHENG, P. F.; OKADA, S.; ZHOU, C. X.; CHEN, P. *et al.* High-value chemicals from *Botryococcus braunii* and their current applications - A review. **Bioresource Technology**, 291, Nov 2019.

CHI, Z. Y.; LIU, Y.; FREAR, C.; CHEN, S. L. Study of a two-stage growth of DHA-producing marine algae *Schizochytrium limacinum* SR21 with shifting dissolved oxygen level. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 81, n. 6, p. 1141-1148, Jan 2009.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, 25, n. 3, p. 294-306, May-Jun 2007.

CHIU, S. Y.; KAO, C. Y.; CHEN, C. H.; KUAN, T. C. *et al.* Reduction of CO_2 by a high-density culture of *Chlorella* sp in a semicontinuous photobioreactor. **Bioresource Technology**, 99, n. 9, p. 3389-3396, Jun 2008.

CHOWDHURY, H.; LOGANATHAN, B. Third-generation biofuels from microalgae: a review. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, 20, p. 39-44, Dec 2019.

COAT, R.; MONTALESCOT, V.; LEON, E. S.; KUCMA, D. *et al.* Unravelling the matrix effect of fresh sampled cells for in vivo unbiased FTIR determination of the absolute concentration of total lipid content of microalgae. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 37, n. 11, p. 2175-2187, Nov 2014.

COLMAN, B.; HUERTAS, I. E.; BHATTI, S.; DASON, J. S. The diversity of inorganic carbon acquisition mechanisms in eukaryotic microalgae. **Functional Plant Biology**, 29, n. 2-3, p. 261-270, 2002.

COOPER, M. B.; SMITH, A. G. Exploring mutualistic interactions between microalgae and bacteria in the omics age. **Current Opinion in Plant Biology**, 26, p. 147-153, Aug 2015.

CORDEIRO, C.; COSTA, T. M. Evaluation of solid residues removed from a mangrove swamp in the Sao Vicente Estuary, SP, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, 60, n. 10, p. 1762-1767, Oct 2010.

DA CRUZ, R. V. A.; DO NASCIMENTO, C. A. O. Emergy analysis of oil production from microalgae. **Biomass & Bioenergy**, 47, p. 418-425, Dec 2012.

DA SILVEIRA, C. A. **Modelagem e simulação de reator de cultivo de microalgas tipo "open pond"**. Orientador: NASCIMENTO, C. A. O. D. 2015. 118 f. (Ph.D) - Departamento de Engenharia Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

DE CARVALHO, C.; CARAMUJO, M. J. The Various Roles of Fatty Acids. **Molecules**, 23, n. 10, Oct 9 2018.

DE CARVALHO, C. C. C. R.; CARAMUJO, M. J. Carotenoids in Aquatic Ecosystems and Aquaculture: A Colorful Business with Implications for Human Health. **Frontiers in Marine Science**, 4, 2017.

DE MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. **Energy Conversion and Management**, 48, n. 7, p. 2169-2173, Jul 2007.

DEMAIN, A. L. The business of biotechnology. Industrial Biotechnology, 3, n. 3, p. 269-283, 2007.

DELGADO-PELAYO, R.; HORNERO-MENDEZ, D. Identification and Quantitative Analysis of Carotenoids and Their Esters from Sarsaparilla (Smilax aspera L.) Berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 60, n. 33, p. 8225-8232, Aug 2012.

DUONG, V. T.; LI, Y.; NOWAK, E.; SCHENK, P. M. Microalgae Isolation and Selection for Prospective Biodiesel Production. **Energies**, 5, n. 6, p. 1835-1849, Jun 2012.

ELRAYIES, G. M. Microalgae: Prospects for greener future buildings. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, 81, p. 1175-1191, Jan 2018.

FERNANDES, B.; TEIXEIRA, J.; DRAGONE, G.; VICENTE, A. A. *et al.* Relationship between starch and lipid accumulation induced by nutrient depletion and replenishment in the microalga *Parachlorella kessleri*. **Bioresource Technology**, 144, p. 268-274, Sep 2013.

FU, Q.; CHANG, H. X.; HUANG, Y.; LIAO, Q. *et al.* A novel self-adaptive microalgae photobioreactor using anion exchange membranes for continuous supply of nutrients. **Bioresource Technology**, 214, p. 629-636, Aug 2016.

FU, W. Q.; GUDMUNDSSON, S.; WICHUK, K.; PALSSON, S. *et al.* Sugar-stimulated CO_2 sequestration by the green microalga *Chlorella vulgaris*. **Science of the Total Environment**, 654, p. 275-283, Mar 2019.

FUKUZAWA, H.; MIURA, K.; ISHIZAKI, K.; KUCHO, K. et al. Ccm1, a regulatory gene controlling the induction of a carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii* by sensing CO_2 availability. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98, n. 9, p. 5347-5352, Apr 2001.

GAO, K.; ORR, V.; REHMANN, L. Butanol fermentation from microalgae-derived carbohydrates after ionic liquid extraction. **Bioresource Technology**, 206, p. 77-85, Apr 2016.

GAO, Y. F.; LV, J. P.; FENG, J.; LIU, Q. *et al.* Morphology, phylogeny and lipid components of an oil-rich microalgal strain. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, 90, p. 298-+, 2017.

GIBSON, R. A.; NEUMANN, M. A.; LIEN, E. L.; BOYD, K. A. *et al.* Docosahexaenoic acid synthesis from alpha-linolenic acid is inhibited by diets high in polyunsaturated fatty acids. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, 88, n. 1, p. 139-146, Jan 2013.

GONG, Y. M.; JIANG, M. L. Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel. **Biotechnology Letters**, 33, n. 7, p. 1269-1284, Jul 2011.

GOOLD, H.; BEISSON, F.; PELTIER, G.; LI-BEISSON, Y. Microalgal lipid droplets: composition, diversity, biogenesis and functions. **Plant Cell Rep**, 34, n. 4, p. 545-555, Apr 2015.

GUARATINI, T.; VESSECCHI, R.; PINTO, E.; COLEPICOLO, P.; LOPES, N.P., Balance of xanthophylls molecular and protonated molecular ions in electrospray ionization, **Journal of Mass Spectrometry**, 40, p. 963–968, 2005.

GUPTA, P. L.; LEE, S. M.; CHOI, H. J. A mini review: photobioreactors for large scale algal cultivation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 31, n. 9, p. 1409-1417, Sep 2015.

HANAGATA, N.; TAKEUCHI, T.; FUKUJU, Y.; BARNES, D. J. *et al.* Tolerance of microalgae to high CO_2 and high temperature. **Phytochemistry**, 31, n. 10, p. 3345-3348, Oct 1992.

HARDER, R.; VON WITSCH, H. Die Massenkultur von Diatomeen. **Ber Deutsch Bot Ges** 60, p. 146–152, 1942.

HATCHARD, C. G.; PARKER, C. A. A new sensitive chemical actinometer. 2. Potassium ferrioxalate as a standard chemical actinometer. **Proceedings of the Royal Society of London Series a-Mathematical and Physical Sciences**, 235, n. 1203, p. 518-536, 1956.

HEILMANN, S. M.; DAVIS, H. T.; JADER, L. R.; LEFEBVRE, P. A. *et al.* Hydrothermal carbonization of microalgae. **Biomass & Bioenergy**, 34, n. 6, p. 875-882, Jun 2010.

HERRMANN, C.; KALITA, N.; WALL, D.; XIA, A. *et al.* Optimised biogas production from microalgae through co-digestion with carbon-rich co-substrates. **Bioresource Technology**, 214, p. 328-337, Aug 2016.

HERZOG, H.; GOLOMB, D. Carbon capture and storage from fossil fuel use Encyclopedia of Energy. 1**:** 1-11 p. 2004.

HILL, J.; NELSON, E.; TILMAN, D.; POLASKY, S. *et al.* Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 103, n. 30, p. 11206-11210, Jul 2006.

HIRATA, S.; HAYASHITANI, M.; TAYA, M.; TONE, S. Carbon dioxide fixation in batch culture of Chlorella sp using a photobioreactor with a sunlight-collection device. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 81, n. 5, p. 470-472, 1996.

HUESEMANN, M.; CROWE, B.; WALLER, P.; CHAVIS, A. *et al.* A validated model to predict microalgae growth in outdoor pond cultures subjected to fluctuating light intensities and water temperatures. **Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts**, 13, p. 195-206, Jan 2016.

HUNTLEY, M. E.; REDALJE, D. G. CO_2 Mitigation and Renewable Oil from Photosynthetic Microbes: A New Appraisal. ***Mitig Adapt Strat Glob Change***, 12, p. 35, 2007.

ILUZ, D.; ABU-GHOSH, S. A novel photobioreactor creating fluctuating light from solar energy for a higher light-to-biomass conversion efficiency. **Energy Conversion and Management**, 126, p. 767-773, Oct 2016.

IPCC. Climate Change and Land: an IPCC special report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems [P.R. Shukla, J. Skea, E. Calvo Buendia, V. Masson-Delmotte, H.-O. Pörtner, D. C. Roberts, P. Zhai, R. Slade, S. Connors, R. van Diemen, M. Ferrat, E. Haughey, S. Luz, S. Neogi, M. Pathak, J. Petzold, J. Portugal Pereira, P. Vyas, E. Huntley, K. Kissick, M. Belkacemi, J. Malley, (eds.)]. 2019.

ISHIGURO, S.; UPPALAPATI, D.; GOLDSMITH, Z.; ROBERTSON, D. *et al.* Exopolysaccharides extracted from Parachlorella kessleri inhibit colon carcinoma growth in mice via stimulation of host antitumor immune responses. **Plos One**, 12, n. 4, Apr 2017.

KASSIM, M. A.; MENG, T. K. Carbon dioxide (CO_2) biofixation by microalgae and its potential for biorefinery and biofuel production. **Science of the Total Environment**, 584, p. 1121-1129, Apr 2017.

KATHREIN, H. R. Production of carotenoids by the cultivation of algae USA. US3142135 1964.

KATIVU, E.; HILDEBRANDT, D.; MATAMBO, T.; GLASSER, D. Effects of CO_2 on South African fresh water microalgae growth. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, 31, n. 1, p. 24-28, Apr 2012.

KAUTSKY, H.; HIRSCH, A. Neue Versuche zur Kohlensaureassimilation. **Naturwissenschaften**, 19, n. 48, 1931.

KAZBAR, A.; COGNE, G.; URBAIN, B.; MAREC, H. *et al.* Effect of dissolved oxygen concentration on microalgal culture in photobioreactors. **Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts**, 39, May 2019.

KENARSARI, S. D.; YANG, D. L.; JIANG, G. D.; ZHANG, S. J. *et al.* Review of recent advances in carbon dioxide separation and capture. **Rsc Advances**, 3, n. 45, p. 22739-22773, 2013.

KHOZIN-GOLDBERG, I.; COHEN, Z. Unraveling algal lipid metabolism: Recent advances in gene identification. **Biochimie**, 93, n. 1, p. 91-100, Jan 2011.

KISHIMOTO, M.; OKAKURA, T.; NAGASHIMA, H.; MINOWA, T. *et al.* CO_2 fixations and oil production using microalgae. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 78, n. 6, p. 479-482, 1994.

KLINTHONG, W.; YANG, Y. H.; HUANG, C. H.; TAN, C. S. A Review: Microalgae and Their Applications in CO_2 Capture and Renewable Energy. **Aerosol and Air Quality Research**, 15, n. 2, p. 712-742, Apr 2015.

KOPEC, R. E.; COOPERSTONE, J. L.; CICHON, M. J.; SCHWARTZ, S. J. **Analysis Methods of Carotenoids**. John Wiley & Sons, Ltd, 2012. (Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals.

KRENAK, A. Ideias para adiar o fim do mundo, 1ª ed., São Paulo, Companhia das Letras, 2019.

KRIENITZ, L.; HEGEWALD, E. H.; HEPPERLE, D.; HUSS, V. A. R. *et al.* Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov (*Chlorophyta, Trebouxiophyceae*). **Phycologia**, 43, n. 5, p. 529-542, Sep 2004.

KRINSKY, N. I.; LANDRUM, J. T.; BONE, R. A. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. **Annual Review of Nutrition**, 23, p. 171-201, 2003.

KUMAR, G.; MUDHOO, A.; SIVAGURUNATHAN, P.; NAGARAJAN, D. *et al.* Recent insights into the cell immobilization technology applied for dark fermentative hydrogen production. **Bioresource Technology**, 219, p. 725-737, Nov 2016.

KURAMOCHI, T.; RAMIREZ, A.; TURKENBURG, W.; FAAIJ, A. Comparative assessment of CO_2 capture technologies for carbon-intensive industrial processes. **Progress in Energy and Combustion Science**, 38, n. 1, p. 87-112, Feb 2012.

LEUNG, D. Y. C.; CARAMANNA, G.; MAROTO-VALER, M. M. An overview of current status of carbon dioxide capture and storage technologies. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, 39, p. 426-443, Nov 2014.

LI, D. J.; WANG, L.; ZHAO, Q. Y.; WEI, W. *et al.* Improving high carbon dioxide tolerance and carbon dioxide fixation capability of *Chlorella* sp by adaptive laboratory evolution. **Bioresource Technology**, 185, p. 269-275, Jun 2015.

LI, H. B.; CHENG, K. W.; WONG, C. C.; FAN, K. W. *et al.* Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. **Food Chemistry**, 102, n. 3, p. 771-776, 2007.

LI, X. L.; PRIBYL, P.; BISOVA, K.; KAWANO, S. *et al.* The microalga *Parachlorella kessleri*: A novel highly efficient lipid producer. **Biotechnology and Bioengineering**, 110, n. 1, p. 97-107, Jan 2013.

LI, Y.; NAGHDI, F. G.; GARG, S.; ADARME-VEGA, T. C. *et al.* A comparative study: the impact of different lipid extraction methods on current microalgal lipid research. **Microbial Cell Factories**, 13, Jan 2014.

LIANG, Y. N.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, 31, n. 7, p. 1043-1049, Jul 2009.

LIAO, J. C.; MI, L.; PONTRELLI, S.; LUO, S. S. Fuelling the future: microbial engineering for the production of sustainable biofuels. **Nature Reviews Microbiology**, 14, n. 5, p. 288-304, May 2016.

LICHTENTHALER, H. K.; AC, A.; MAREK, M. V.; KALINA, J. *et al.* Differences in pigment composition, photosynthetic rates and chlorophyll fluorescence images of sun and shade leaves of four tree species. **Plant Physiology and Biochemistry**, 45, n. 8, p. 577-588, Aug 2007.

LIM, D. K.; GARG, S.; TIMMINS, M.; ZHANG, E. S. *et al.* Isolation and evaluation of oil-producing microalgae from subtropical coastal and brackish waters. **PLoS One**, 7, n. 7, p. e40751, 2012.

LIU, B. S.; BENNING, C. Lipid metabolism in microalgae distinguishes itself. **Current Opinion in Biotechnology**, 24, n. 2, p. 300-309, Apr 2013.

LORENZ, R. T.; CYSEWSKI, G. R. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. **Trends in Biotechnology**, 18, n. 4, p. 160-167, Apr 2000.

LUBIANA, K. M. F. **Culturas como alternativa para elucidação de biodiversidade críptica do fitoplâncton: ocaso das águas costeiras do estado de São Paulo**. Orientador: GIANESELLA, S. M. F. 2013. 93 f. (Mestrado) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MACHADO, I. M. P.; ATSUMI, S. Cyanobacterial biofuel production. **Journal of Biotechnology**, 162, n. 1, p. 50-56, Nov 2012.

MAEDA, K.; OWADA, M.; KIMURA, N.; OMATA, K. *et al.* CO_2 fixation from the flue-gas on coal-fired thermal power-plant by microalgae. **Energy Conversion and Management**, 36, n. 6-9, p. 717-720, Jun-Sep 1995.

MAHBOOB, S.; RAUF, A.; ASHRAF, M.; SULTANA, T. *et al.* High-density growth and crude protein productivity of a thermotolerant *Chlorella vulgaris*: production kinetics and thermodynamics. **Aquaculture International**, 20, n. 3, p. 455-466, Jun 2012.

MAO, X. M.; WU, T.; SUN, D. Z.; ZHANG, Z. *et al.* Differential responses of the green microalga *Chlorella zofingiensis* to the starvation of various nutrients for oil and astaxanthin production. **Bioresource Technology**, 249, p. 791-798, Feb 2018.

MATSUMOTO, H.; SHIOJI, N.; HAMASAKI, A.; IKUTA, Y. *et al.* Carcon-dioxide fixation by microalgae photosynthesis using actual flue-gas discharged from a boiler. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 51-2, p. 681-692, Spr 1995.

MCGINN, P. J.; PRICE, G. D.; MALESZKA, R.; BADGER, M. R. Inorganic carbon limitation and light control the expression of transcripts related to the CO_2-concentrating mechanism in the cyanobacterium *Synechocystis* sp strain PCC6803. **Plant Physiology**, 132, n. 1, p. 218-229, May 2003.

MEIER, L.; PEREZ, R.; AZOCAR, L.; RIVAS, M. *et al.* Photosynthetic CO_2 uptake by microalgae: An attractive tool for biogas upgrading. **Biomass & Bioenergy**, 73, p. 102-109, Feb 2015.

METOLINA, P. **Degradação do Antibiótico Bacitracina Zíncica em Meio Aquoso através de Processos Oxidativos Avançados**. Orientador: TEIXEIRA, P. D. A. C. S. C. 2018. 197 f. (Mestrado) - Departamento de Engenharia Química, Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MINHAS, A. K.; HODGSON, P.; BARROW, C. J.; SASHIDHAR, B. *et al.* The isolation and identification of new microalgal strains producing oil and carotenoid simultaneously with biofuel potential. **Bioresource Technology**, 211, p. 556-565, Jul 2016.

MIURA, Y.; YAMADA, W.; HIRATA, K.; MIYAMOTO, K. *et al.* Stimulation of hydrogen-production in algal cells grown under CO_2 concentration and low temperature. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 39, p. 753-761, Spr 1993.

MIYAIRI, S. CO_2 assimilation in a thermophilic cyanobacterium. **Energy Conversion and Management**, 36, n. 6-9, p. 763-766, Jun-Sep 1995.

MONTEIRO, M. P. D.; LUCHESE, R. H.; ABSHER, T. M. Effect of three different types of culture conditions on *Spirulina* maxima growth. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 53, n. 2, p. 369-373, Mar-Apr 2010.

MONTINGELLI, M. E.; TEDESCO, S.; OLABI, A. G. Biogas production from algal biomass: A review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, 43, p. 961-972, Mar 2015.

MORONEY, J. V.; YNALVEZ, R. A. Proposed carbon dioxide concentrating mechanism in Chlamydomonas reinhardtii. **Eukaryotic Cell**, 6, n. 8, p. 1251-1259, Aug 2007.

MULDERS, K. J. M.; LAMERS, P. P.; MARTENS, D. E.; WIJFFELS, R. H. Phototrophic pigment production with microalgae: biological constraints and opportunities. **Journal of Phycology**, 50, n. 2, p. 229-242, Apr 2014.

MURAKAMI, M.; IKENOUCHI, M. The biological CO_2 fixation and utilization project by RITE .2. Screening and breeding of microalgae with high capability in fixing CO_2. **Energy Conversion and Management**, 38, p. S493-S497, 1997.

MURUGAIYAN, J.; AHRHOLDT, J.; KOWBEL, V.; ROESLER, U. Establishment of a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry database for rapid identification of infectious achlorophyllous green microalgae of the genus *Prototheca*. **Clinical Microbiology and Infection**, 18, n. 5, p. 461-467, May 2012.

MUSSAGY, C.U.; WINTERBURN, J.; SANTOS-EBINUMA, V.C.; PEREIRA, J.F.B. Production and extraction of carotenoids produced by microorganisms, **Applied Microbiology and Biotechnology**, 103, p.1095–1114, 2019.

MUTANDA, T.; RAMESH, D.; KARTHIKEYAN, S.; KUMARI, S. *et al.* Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. **Bioresource Technology**, 102, n. 1, p. 57-70, Jan 2011.

NAGASE, H.; EGUCHI, K.; YOSHIHARA, K.; HIRATA, K. *et al.* Improvement of microalgal NOx removal in bubble column and airlift reactors. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 86, n. 4, p. 421-423, 1998.

NAKANO, Y.; MIYATAKE, K.; OKUNO, H.; HAMAZAKI, K. *et al.* Growth of photosynthetic algae *Euglena* in high CO_2 conditions and its photosynthetic characteristics. **International Symposium on Plant Production in Closed Ecosystems - Automation, Culture, and Environment**, n. 440, p. 49-54, 1997.

NASCIMENTO, I. A.; CABANELAS, I. T. D.; DOS SANTOS, J. N.; NASCIMENTO, M. A. *et al.* Biodiesel yields and fuel quality as criteria for algal-feedstock selection: Effects of CO_2-supplementation and nutrient levels in cultures. **Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts**, 8, p. 53-60, Mar 2015.

NEGORO, M.; SHIOJI, N.; MIYAMOTO, K.; MIURA, Y. Growth of microalgae in high CO_2 gas and effects of SOx and NOx. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 28-9, p. 877-886, Spr 1991.

NETO, F.C.; GUARATINI, T.; COSTA-LOTUFO, L.; COLEPICOLO, P.; GATES, P.J.; LOPES, N.P. Re-investigation of the fragmentation of protonated carotenoids by electrospray

ionization and nanospray tandem mass spectrometry, **Rapid Commun. Mass Spectrom**., 30, 1540–1548, 2016.

ONO, E.; CUELLO, J. L. Selection of optimal microalgae species for CO_2 sequestration. *In*: Proceedings 2nd Annual Conference on Carbon Sequestration, 2003, Alexandria. p. 1-7.

PACHIAPPAN, P.; PRASATH, B. B.; PERUMAL, S.; ANANTH, S. *et al.* Isolation and culture of microalgae. *In*: **Advances in Marine and Brackishwater Aquaculture**, 2015. cap. Chapter 1, p. 1-15.

PAGANO, M. C.; RIBEIRO-SOARES, J.; CANCADO, L. G.; FALCAO, N. P. S. *et al.* Depth dependence of black carbon structure, elemental and microbiological composition in anthropic Amazonian dark soil. **Soil & Tillage Research**, 155, p. 298-307, Jan 2016.

PALMQVIST, K.; SULTEMEYER, D.; BALDET, P.; ANDREWS, T. J. *et al.* Characterization of inorganic carbon fluxes, carbonic anhydrase(s) and ribulose-1,5-biphosphate carboxylase-oxygenase in the green unicellular alga *Coccomyxa* - Comparisons with low-CO_2 cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Planta**, 197, n. 2, p. 352-361, Sep 1995.

PANCHA, I.; CHOKSHI, K.; GEORGE, B.; GHOSH, T. *et al.* Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp CCNM 1077. **Bioresource Technology**, 156, p. 146-154, Mar 2014.

PARK, K. C.; WHITNEY, C. G. E.; KOZERA, C.; O'LEARY, S. J. B. *et al.* Seasonal isolation of microalgae from municipal wastewater for remediation and biofuel applications. **Journal of Applied Microbiology**, 119, n. 1, p. 76-87, Jul 2015.

PARK, Y.; LIN, K. Y. A.; PARK, A. H. A.; PETIT, C. Recent advances in anhydrous solvents for CO_2 capture: ionic liquids, switchable solvents, and nanoparticle organic hybrid materials. **Frontiers in Energy Research**, 2015.

PATTERSON, R. K. Automated Pregl-Dumas technique for determining total carbon, hydrogen, and nitrogen in atmospheric aerosols. **Analytical Chemistry**, 45, n. 3, p. 605-609, 1973.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia - Tradução da 5ª Edição norte-americana**. Cengage, 2016. 733 p.

PERUMAL, P.; PRASATH, B. B.; SANTHANAM, P.; ANANTH, S. *et al.* Isolation and culture of microalgae. *In*: Workshop on Advances in Aquaculture Technology, 2012.

PESHEVA, I.; KODAMA, M.; DIONISIOSESE, M. L.; MIYACHI, S. Changes in photosynthetic characteristics induced by transferring air-grown cells of *Chlorococcum littorale* to high CO_2 conditions. **Plant and Cell Physiology**, 35, n. 3, p. 379-387, Apr 1994.

PESHEVABONEVA, I.; KODAMA, M.; MIYACHI, S. The effects of high CO_2 concentrations on photosynthesis of *Chlorococcum littorale* (*Chlorophyceae*). **Photosynthesis Research**, 34, n. 1, p. 151-151, Oct 1992.

POLYAKOV, N. E.; MAGYAR, A.; KISPERT, L. D. Photochemical and optical properties of water-soluble xanthophyll antioxidants: aggregation vs complexation. **Journal of Physical Chemistry B**, 117, n. 35, p. 10173-10182, Sep 2013.

POSADA, J. A.; BRENTNER, L. B.; RAMIREZ, A.; PATEL, M. K. Conceptual design of sustainable integrated microalgae biorefineries: Parametric analysis of energy use, greenhouse gas emissions and techno-economics. **Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts**, 17, p. 113-131, Jul 2016.

PRUVOST, J.; VAN VOOREN, G.; LE GOUIC, B.; COUZINET-MOSSION, A. *et al.* Systematic investigation of biomass and lipid productivity by microalgae in photobioreactors for biodiesel application. **Bioresource Technology**, 102, n. 1, p. 150-158, Jan 2011.

PÉREZ-GÁLVEZ, A.; ROCA , M. Recent developments in the analysis of carotenoids by mass spectrometry. *In*: ZEPKA, L. Q.;JACOB-LOPES, E., *et al* (Ed.). **Progress in Carotenoid Research**: Intech Open, 2018. cap. 2.

PINHEIRO, M.J.; BONTURI, N.; BELOUAH, I.; MIRANDA, E.A.; LAHTVEE, P.J. Xylose Metabolism and the Effect of Oxidative Stress on Lipid and Carotenoid Production in *Rhodotorula toruloides*: Insights for Future Biorefinery, **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 2020.

RADAKOVITS, R.; JINKERSON, R. E.; DARZINS, A.; POSEWITZ, M. C. Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. **Eukaryotic Cell**, 9, n. 4, p. 486-501, Apr 2010.

RAPOSO, M. F. D.; DE MORAIS, R.; DE MORAIS, A. Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae. **Marine Drugs**, 11, n. 1, p. 233-252, Jan 2013.

RAVEN, J. A. Inorganic carbon acquisition by marine autotrophs. **Advances in Botanical Research, Vol 27: Classic Papers**, 27, p. 85-209, 1997.

RAVEN, J. A.; BEARDALL, J.; GIORDANO, M. Energy costs of carbon dioxide concentrating mechanisms in aquatic organisms. **Photosynthesis Research**, 121, n. 2-3, p. 111-124, Sep 2014.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, 26, n. 9-10, p. 1231-1237, May 1999.

RENAUD, S. M.; ZHOU, H. C.; PARRY, D. L.; THINH, L. V. *et al.* Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis* sp, *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea*, and commercial species *Isochrysis* sp (clone T ISO). **Journal of Applied Phycology**, 7, n. 6, p. 595-602, Dec 1995.

RITCHIE, R. J. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. **Photosynthesis Research**, 89, n. 1, p. 27-41, Jul 2006.

RODRIGUES, D. B.; MARIUTTI, L. R. B.; MERCADANTE, A. Z. Two-step cleanup procedure for the identification of carotenoid esters by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1457, p. 116-124, Jul 2016.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods**. 2001.

SALIH, F. M. Microalgae tolerance to high concentrations of carbon dioxide: A Review. **Journal of Environmental Protection**, 2, p. 648-654, 2011.

SASSO, S.; POHNERT, G.; LOHR, M.; MITTAG, M. *et al.* Microalgae in the postgenomic era: a blooming reservoir for new natural products. **Fems Microbiology Reviews**, 36, n. 4, p. 761-785, Jul 2012.

SAYRE, R. Microalgae: The Potential for Carbon Capture. **Bioscience**, 60, n. 9, p. 722-727, Oct 2010.

SCHADEL, C.; BADER, M. K. F.; SCHUUR, E. A. G.; BIASI, C. *et al.* Potential carbon emissions dominated by carbon dioxide from thawed permafrost soils. **Nature Climate Change**, 6, n. 10, p. 950-+, Oct 2016.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. Edgard Blucher LTDA, 2001.

SCRAGG, A. H.; ILLMAN, A. M.; CARDEN, A.; SHALES, S. W. Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor. **Biomass & Bioenergy**, 23, n. 1, p. 67-73, 2002.

SECKBACH, J.; GROSS, H.; NATHAN, M. B. Growth and photosynthesis of *Cyanidium caldarium* cultured under pure CO_2. **Israel Journal of Botany**, 20, n. 2, p. 87-&, 1971.

SHARMA, A. K.; PARUL; THIYAM, G. Variation of both chemical composition and antioxidant properties of newly isolated *Parachlorella kessleri* GB1, by growing in different culture conditions. **Lwt-Food Science and Technology**, 112, Sep 2019.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 56, n. 8, p. 365-379, Oct 2002.

SINGH, D.; MCMILLAN, J. M.; LIU, X. M.; VISHWASRAO, H. M. *et al.* Formulation design facilitates magnetic nanoparticle delivery to diseased cells and tissues. **Nanomedicine**, 9, n. 3, p. 469-485, Mar 2014.

SITEPU, I. R.; GARAY, L. A.; SESTRIC, R.; LEVIN, D. *et al.* Oleaginous yeasts for biodiesel: Current and future trends in biology and production. **Biotechnology Advances**, 32, n. 7, p. 1336-1360, Nov 2014.

SOARES, A. T.; DA COSTA, D. C.; VIEIRA, A. A. H.; ANTONIOSI, N. R. Analysis of major carotenoids and fatty acid composition of freshwater microalgae. **Heliyon**, 5, n. 4, p. 20, Apr 2019. Article.

SOEDER, C. J.; PABST, W. Gesichtspunkte fur die Verwendung von Mikroalgen in der Ernahrung von Mensch und Tier **Ber Deutsch Bot Ges** 83, p. 607–625, 1970.

SOLETTO, D.; BINAGHI, L.; LODI, A.; CARVALHO, J. C. M. *et al.* Batch and fed-batch cultivations of Spirulina platensis using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. **Aquaculture**, 243, n. 1-4, p. 217-224, Jan 2005.

SPIJKERMAN, E. The expression of a carbon concentrating mechanism in *Chlamydomonas acidophila* under variable phosphorus, iron, and CO_2 concentrations. **Photosynthesis Research**, 109, n. 1-3, p. 179-189, Sep 2011.

STEPHENSON, A.L.; DENNIS, J.S.; HOWE, C.J.; SCOTT, S.A.; SMITH, A.G. Influence of Nitrogen-limitation Regime on the Production by Chlorella vulgaris of Lipids for Biodiesel Feedstocks. Biofuels, 1, p. 47–58, 2010.

STORMS, Z. J.; CAMERON, E.; DE LA HOZ SIEGLER, H.; MCCAFFREY, W. C. A simple and rapid protocol for measuring neutral lipids in algal cells using fluorescence. **J Vis Exp**, n. 87, May 30 2014.

SUBASHCHANDRABOSE, S. R.; RAMAKRISHNAN, B.; MEGHARAJ, M.; VENKATESWARLU, K. *et al.* Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: Biotechnological potential. **Biotechnology Advances**, 29, n. 6, p. 896-907, Nov-Dec 2011.

SUN, H.; MAO, X. M.; WU, T.; REN, Y. Y. *et al.* Novel insight of carotenoid and lipid biosynthesis and their roles in storage carbon metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Bioresource Technology**, 263, p. 450-457, Sep 2018.

SUN, Z. L.; CHEN, Y. F.; DU, J. C. Elevated CO_2 improves lipid accumulation by increasing carbon metabolism in *Chlorella sorokiniana*. **Plant Biotechnology Journal**, 14, n. 2, p. 557-566, Feb 2016.

SYDNEY, E. B.; STURM, W.; DE CARVALHO, J. C.; THOMAZ-SOCCOL, V. *et al.* Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. **Bioresource Technology**, 101, n. 15, p. 5892-5896, Aug 2010.

TALE, M.; GHOSH, S.; KAPADNIS, B.; KALE, S. Isolation and characterization of microalgae for biodiesel production from Nisargruna biogas plant effluent. **Bioresour Technol**, 169, p. 328-335, Oct 2014.

TANG, D. H.; HAN, W.; LI, P. L.; MIAO, X. L. *et al.* CO_2 biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO_2 levels. **Bioresource Technology**, 102, n. 3, p. 3071-3076, Feb 2011.

THI, T. Y. D.; SIVALOGANATHAN, B.; OBBARD, J. P. Screening of marine microalgae for biodiesel feedstock. **Biomass & Bioenergy**, 35, n. 7, p. 2534-2544, Jul 2011.

TOLEDO-CERVANTES, A.; MORALES, M.; NOVELO, E.; REVAH, S. Carbon dioxide fixation and lipid storage by *Scenedesmus obtusiusculus*. **Bioresource Technology**, 130, p. 652-658, Feb 2013.

TOMASELLI, L. The Microalgal Cell. *In*: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**: Blackwell Science Ltd., 2004. cap. 1, p. 588.

TSUZUKI, M.; GANTAR, M.; AIZAWA, K.; MIYACHI, S. Ultrastructure of *Dunaliella tertiolecta* cells grown under low and high CO_2 concentrations. **Plant and Cell Physiology**, 27, n. 4, p. 737-739, Jun 1986.

UEMURA, K.; ANWARUZZAMAN; MIYACHI, S.; YOKOTA, A. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from thermophilic red algae with a strong specificity for CO_2 fixation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 233, n. 2, p. 568-571, Apr 1997.

VAN DER HA, D.; NACHTERGAELE, L.; KERCKHOF, F. M.; RAMEIYANTI, D. *et al.* Conversion of biogas to bioproducts by algae and methane oxidizing bacteria. **Environmental Science & Technology**, 46, n. 24, p. 13425-13431, Dec 2012.

VENDRUSCOLO, R. G.; FAGUNDES, M. B.; MARONEZE, M. M.; DO NASCIMENTO, T. C. *et al. Scenedesmus obliquus* metabolomics: effect of photoperiods and cell growth phases. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 42, n. 5, p. 727-739, May 2019.

VENKATARAMAN, L. V.; BECKER, W. E.; SHAMALA, T. R. Studies on the cultivation of the alga *Scenedesmus acutus* as a single cell protein **Life Sci**, 20, p. 223–234, 1977.

VESSECCHI, R.; LOPES, N.P.; GOZZO, F.C.; DORR, F.A.; MURGU, M.; LEBRE, D.T.; ABREU, R.; BUSTILLOS, O.V.; RIVEROS, J.M. Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa, **Química Nova**, 34, n. 10, 1875-1887, 2011.

VIDAL, M. C. I. **Enhancing the production of lipids and antioxidants in heterotrophic cultures of *Auxenochlorella protothecoides***. Orientador: SIEGLER, H. D. L. H. 2016. (Master of Science) - Chemical Engineering, University of Calgary, Calgary.

VILA, E.; HORNERO-MÉNDEZ, D.; AZZIZ, G.; LAREO, C.; SARAIVA, V. Carotenoids from heterotrophic bacteria isolated from Fildes Peninsula, King George Island, Antarctica, **Biotechnology Reports**, v. 21, 2019.

WANG, Y. J.; STESSMAN, D. J.; SPALDING, M. H. The CO_2 concentrating mechanism and photosynthetic carbon assimilation in limiting CO2: how Chlamydomonas works against the gradient. **Plant Journal**, 82, n. 3, p. 429-448, May 2015.

WEESEPOEL, Y.; VINCKEN, J.P.; POP, R.M.; LIU, K.; GRUPPEN, H. Sodiation as a tool for enhancing the diagnostic value of MALDI-TOF/TOF-MS spectra of complex astaxanthin ester mixtures from *Haematococcus pluvialis*, **Journal of Mass Spectrometry**, 48, p. 862–874, 2013.

WILSON, M. H.; MOHLER, D. T.; GROPPO, J. G.; GRUBBS, T. *et al.* Capture and recycle of industrial CO_2 emissions using microalgae. **Applied Petrochemical Research**, 6, n. 3, p. 279-293, Sep 2016.

YADAV, G.; KAREMORE, A.; DASH, S. K.; SEN, R. Performance evaluation of a green process for microalgal CO2 sequestration in closed photobioreactor using flue gas generated in-situ. **Bioresource Technology**, 191, p. 399-406, Sep 2015.

YAMANO, T.; MIURA, K.; FUKUZAWA, H. Expression analysis of genes associated with the induction of the carbon-concentrating mechanism in Chlamydomonas reinhardtii. **Plant Physiology**, 147, n. 1, p. 340-354, May 2008.

YAN, C.; MUNOZ, R.; ZHU, L. D.; WANG, Y. X. The effects of various LED (light emitting diode) lighting strategies on simultaneous biogas upgrading and biogas slurry nutrient reduction by using of microalgae *Chlorella* sp. **Energy**, 106, p. 554-561, Jul 2016.

YANG, H. Q.; XU, Z. H.; FAN, M. H.; GUPTA, R. *et al.* Progress in carbon dioxide separation and capture: A review. **Journal of Environmental Sciences**, 20, n. 1, p. 14-27, 2008.

YUN, Y. S.; LEE, S. B.; PARK, J. M.; LEE, C. I. *et al.* Carbon dioxide fixation by algal cultivation using wastewater nutrients. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 69, n. 4, p. 451-455, Aug 1997.

ZHEN, G. Y.; LU, X. Q.; KOBAYASHI, T.; KUMAR, G. *et al.* Anaerobic co-digestion on improving methane production from mixed microalgae (*Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp.) and food waste: Kinetic modeling and synergistic impact evaluation. **Chemical Engineering Journal**, 299, p. 332-341, Sep 2016.

ZIMMERMANN, A.; LUTHY, J.; PAULI, U. Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food samples. **Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung a-Food Research and Technology**, 207, n. 2, p. 81-90, 1998.

APÊNDICE A - Sequências de DNA das microalgas isoladas

SL1B

CGAAGGTTTGGTTGCCCTTTACAGGGTTTCCTGCTGGCCCCCAGCAAGGTCCACAGGCGTCAACTTC
GTGTAGTCGGTGCGCAAAGCTCCGGTGCTACCTATCCAGTTGAGCCCATAACGGGTCCTTGCTCAA
GCCTCTGTACTTCAGCCAACCCAATTGCGAACAATTGGGAGAGCCAGATCCACTCCACGGCCCGCA
GTATTAGCAGGCGCTCCATCACAAGGATGGTGGGGTGAGGGGATAAACCGACGCTGAGGCAGACA
TGCCGTTGGCCGAAGCCTTCGGCGCAATATGCGTTCAAAGATTCGATGGTTCACGGAATTCTGCAA
TTCACACTACGTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGTTGCGAGAGCCAAGATATCCGTTGTTGAG
AGTTGTCTTGGTTATTGACCGCCGTTATGGCAAGCCATTGATCTTAGATTTAGGTTTTGTGTGTTGA
AAAACACGGGTGAAAAGGACGCAACCAGTGAGCGGGGGCAGCCACCTTGCGGTGGCCCCCGGGGC
GCAAGCCAATGTGCCCCAAGCCGCAGCGCTGGCGCGGGTAAATGAGGTTCGCGTTGTGGTTTTGAT
AATTCAATGATCCTTCCGCAGGTTCACCT

SL2C – *Chlorella vulgaris*

TGAAGAGTTTCGGTGTCGGGGGGTGCCCAAGCATCCGAATTCCTGCTAGGTCTCCAGCAAAGTCCC
CTCGGGCAACGGCAGGATGCGTAGGGAATGCCTACCTACCAAGCCATTACCCTGCGAACGGGGTC
CATGCTCATACCTCTGAGCTTCAACCGACCCGGCGCCAATCACGAGTGACCGGCGGAACCGGGAA
GGTCAGATCCGCCTTCCCAATCAAAGGAGATGGGGAGGCGAGGGGGTGAGCCGACGCTGAGGCAG
ACATGCCTTTGGCCGAAGCCTCAGGCGCAAGTTGCGTTCAAAGATTCGATGGTTCACGGAATTCTG
CAATTCACACTACGTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATACGGGAGCCAAGATATCCGTTGTT
GAGAGTTGTATTTGGTTTGGAGTGGACGGCAGACGAGCTGCCAACCACAAGGTGCTTTAGAATAAG
TTTCAGTTTGGGGTGGGTTGAGTTGAGTTGGAATTTCCGACGTCGGATCCTCCAAAGGGGAGTGTC
CCCTCAAAAAGAAGGGGTCCCACATGTGAAGGGACGCCCGCCGGACCTGAGCAACAGCTCGGGGG
GAGCCACAGCCAGGGGACCGACGCTCGC

L3 – *Parachlorella kessleri*

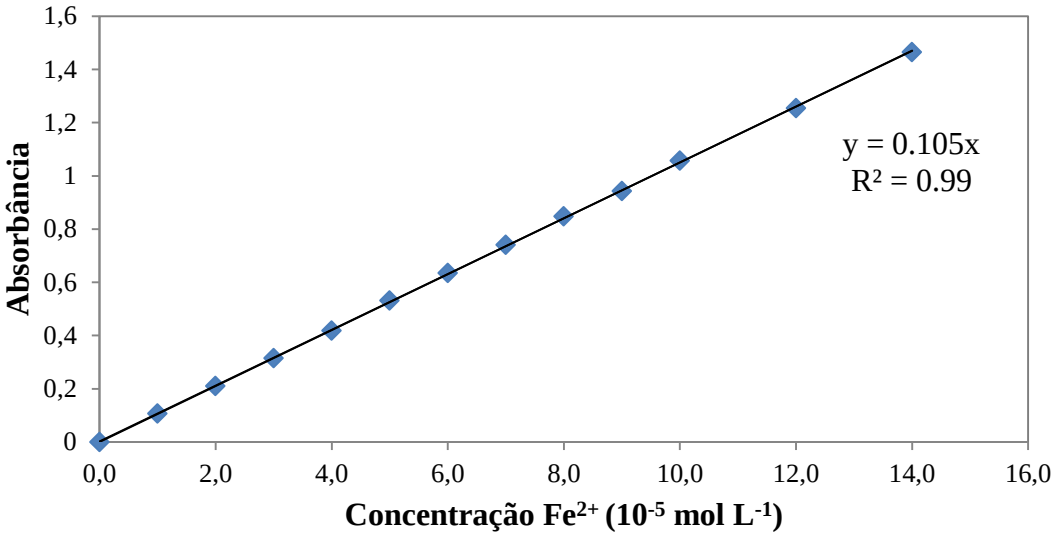
AAGGGTGGGAGGTCGACGAATCGGCTCCCGGCGGGCTCCCAGCAAAGTCCCCTCGGGTACCGGCA
GGCGGGGTGCAGGCTGACGCCTACCTACCAAGCCGGTGCCCTGCAAACGGGGTCCATGCTCAAGC
CTCTGAACTTCAGCAGACCCGGGCCGGCAGTCGGAGGGTTTCCGACAGCAGCCCGAGGGTGCCAG
GTCCGCTCCCACTACCCACAAGGGGGTGGGGGCGAGGGGGTGTAAACCGACGCTGAGGCAGGCAT
GCCCTCGGCCGGAGCCTCGGGCGCAAGTTGCGTTCAAAGATTCGATGGTTCACGGAATTCTGCAAT
TCACACTACGTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATACGGGAGCCAAGATATCCGTTGTTGAGA
GTTGTCATTGGTTCGTGGCCGTCGGGGTTTCCCCCTCCGACTCGATTGGCTTCAGTTTGGTTTACAG
GTTTGGGGTGTGTTGAGGTTAGGTATAAGAGATTACCAGGCGGAGGGGCAGCCGAGGCCGCCCCC
CACCCCGCCAGACCTGGACACCGGGGCACGGATGTGGCCCGGGCCAGGGGACTGGCGCCCCTTGG
GGGTTAGGCAAAG

C4 – *Scenedesmus* sp.

AAATGAGGTTAGTTTCCTGATTGAGGGTTGGATGCACTGCCCAAGCCAACAACTAGAAATTAGCAA
ATGAATGCCTACCCAGTTGCGGCCCGTATAGGGTCCATACATCAACCTCTGCGCTTCAGCAGACCC
ACCCCTTGCGGAGTGGGACTGCCAGATCCGCCGTGTGCCAACACATGTGTTGGTTTGGGCGAGTAT
TAACCCGACGCTGAGGCAGACATGCTCTTGGCCGAGGCCTCGAGCGCAATATGCGTTCAAAGATTC
GATGGTTCACGGTTTCTGCAATTCACACTACGTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGTTGCGAGA
GCCAAGATATCCGTTGTTGAGAGTTGTCTTGGTTAAGTGCAACGGCAATGCCGATTGCATTCATACT
TTAGAAGTTTTGGTTTGGTGTTAAAGGTTAGACAAGAGACCAACCCAGGGCCCGCACCTTGTTAGG
GATTGGGTTGTCCTGGACCCGCCCAACGCGACCGAACGAACGGAAGCGAGGGCGCCGCGCGCACC
AAAAGAGGTGCGCATGGGGCCAGACGAATTGGTTCACGTGTTGGTATTGATAGATTCAATGATCCT
TCCGCAGGTTCACCTACGGAAAC

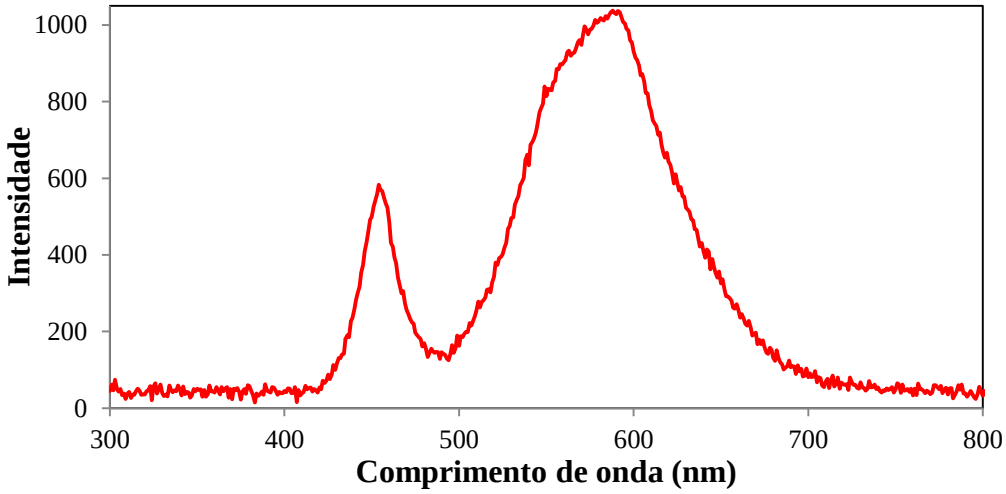
APÊNDICE B – Gráficos de curva padrão de concentração de íons Fe^{2+} e espectro de emissão da lâmpada de LED utilizados para a determinação actinométrica da taxa de emissão de fótons nos fotobiorreatores

Curva padrão de concentração de íons Fe^{2+}



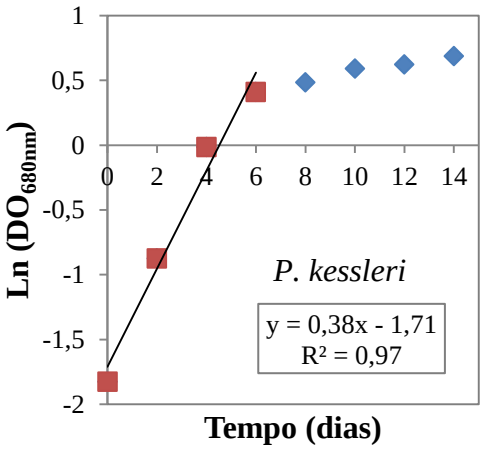
Fonte: (METOLINA, 2018)

Espectro de emissão da lâmpada de LED 3.000 K 1,7 W

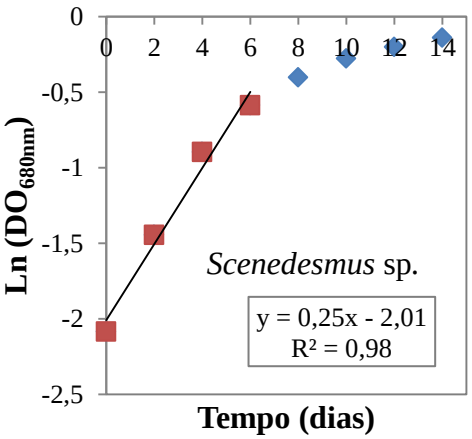


APÊNDICE C - Gráficos para cálculo das velocidades máximas específicas dos ensaios em frascos agitados

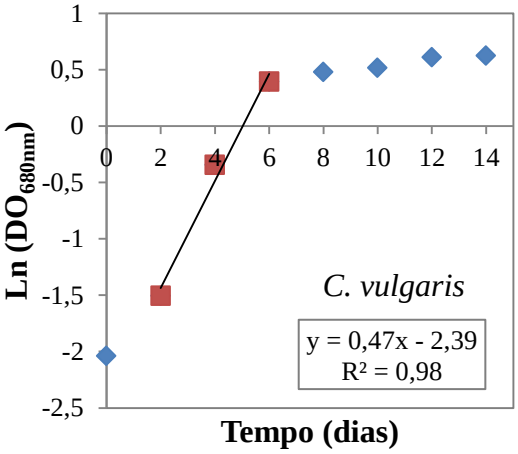
Gráficos de Ln(DO_{680nm}) em função do tempo para as cinéticas de crescimento de microalgas cultivadas sob **0,04% de CO_2**: a) *P. kessleri*, b) *Scenedesmus* sp. e c) *C. vulgaris*



a)

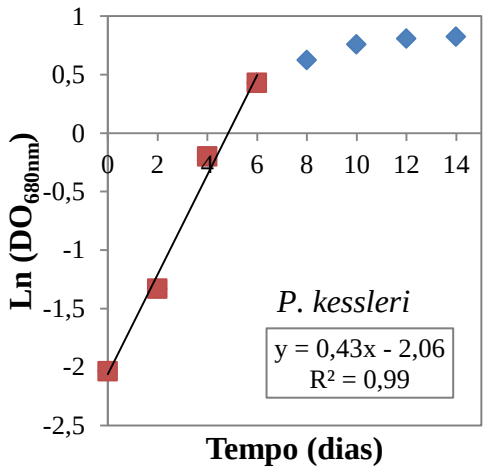


b)

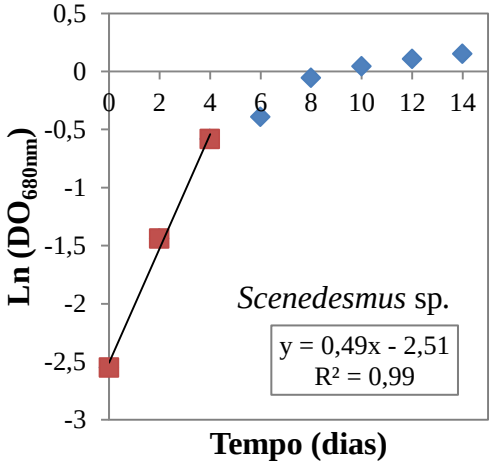


c)

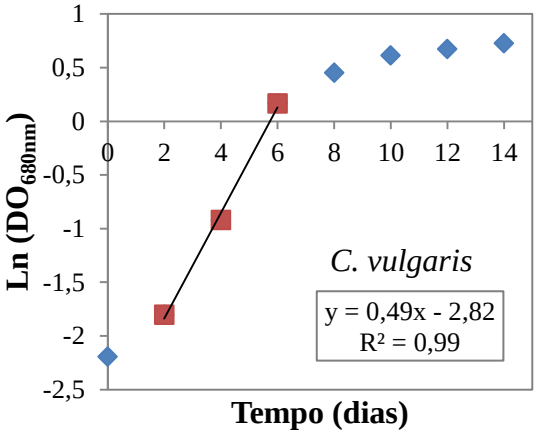
Gráficos de Ln(DO_{680nm}) em função do tempo para as curvas de crescimento de microalgas cultivadas sob **5% de CO_2**: a) *P. kessleri*, b) *Scenedesmus* sp. e c) *C. vulgaris*



a)

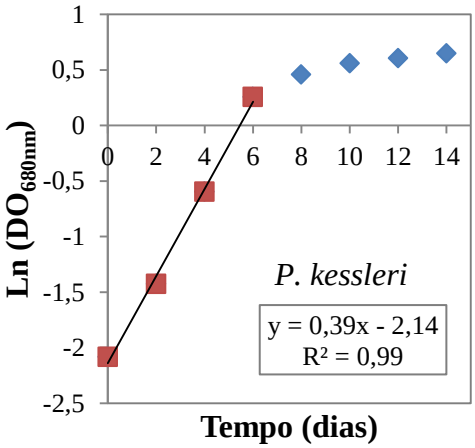


b)

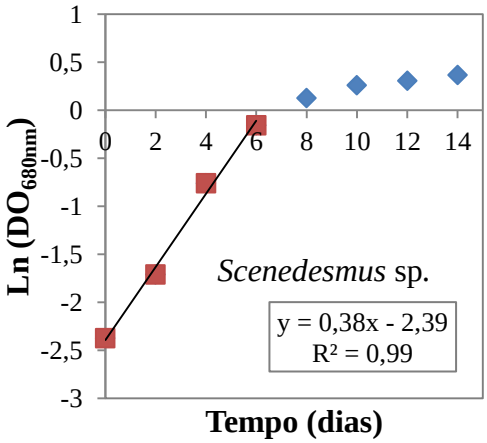


c)

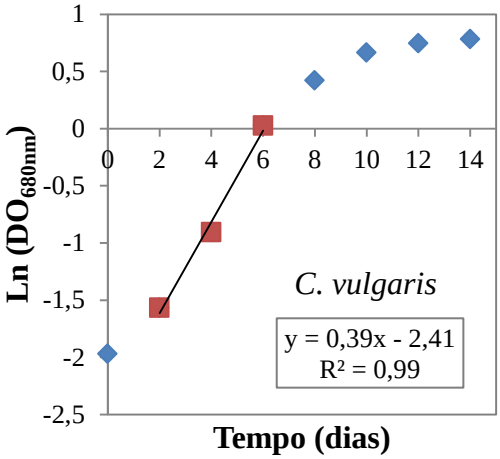
Gráficos de Ln(DO_{680nm}) em função do tempo para as curvas de crescimento de microalgas cultivadas sob **15% de CO_2** a) *P. kessleri*, b) *Scenedesmus* sp. e c) *C. vulgaris*



a)

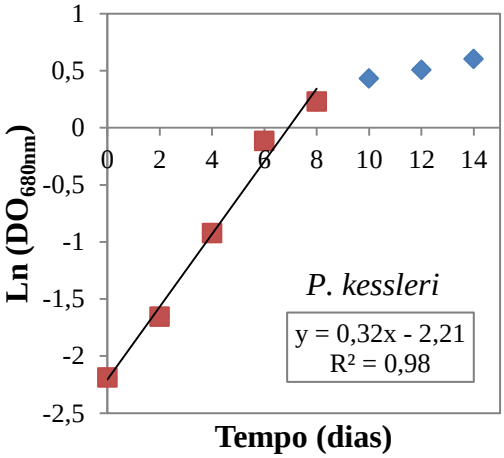


b)

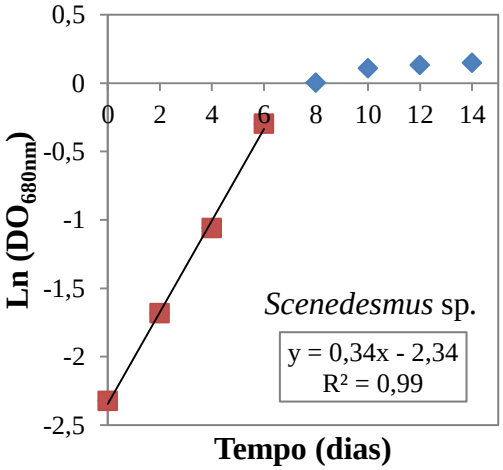


c)

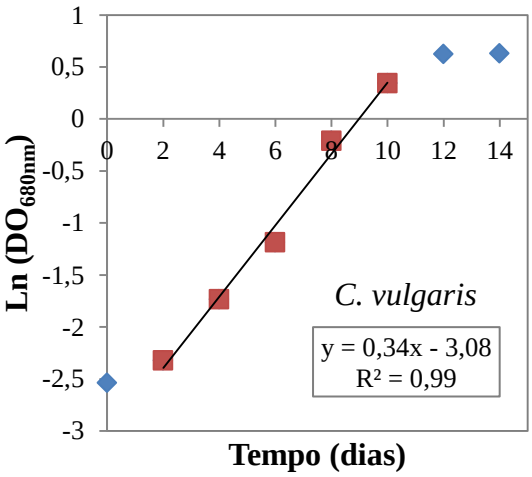
Gráficos de Ln(DO_{680nm}) em função do tempo para as curvas de crescimento de microalgas cultivadas sob **30% de CO_2**: a) *P. kessleri*, b) *Scenedesmus* sp. e c) *C. vulgaris*



a)



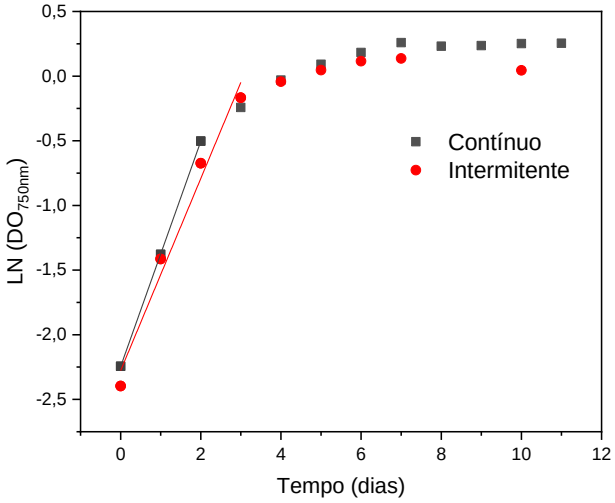
b)



c)

APÊNDICE D - Gráficos para cálculo das velocidades máximas específicas dos ensaios cinéticos de *Scenedesmus* sp. em reator e análise elementar para os mesmos cultivos

Gráfico de ln(DO_{750nm}) em função do tempo para cálculo das velocidades específicas máximas de crescimento do cultivo de *Scenedesmus* sp. sob aeração contínua a 5% CO_2 ou aeração intermitente

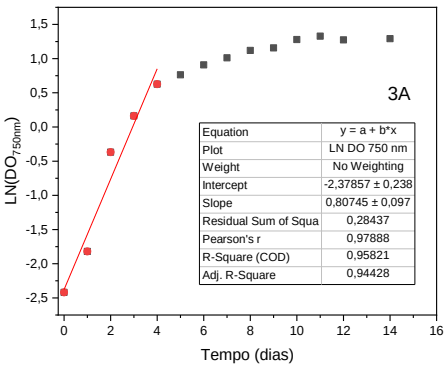


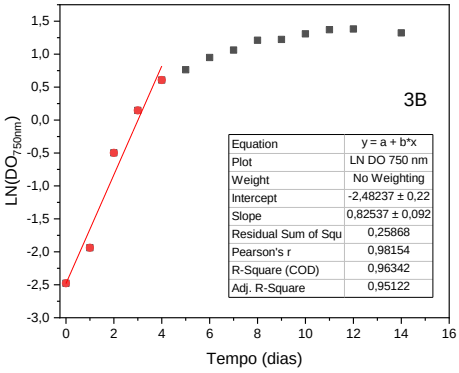
Análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio nos diferentes dias de cultivo de *Scenedesmus* sp. sob aeração contínua ou intermitente a 5% CO_2

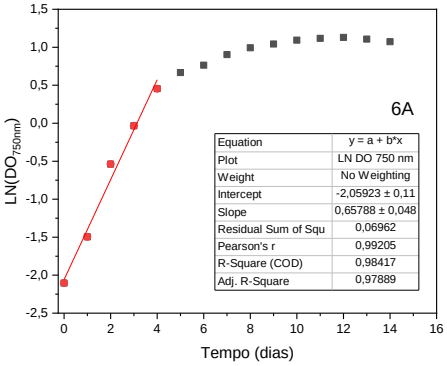
	Elemento (%)	Dia 0	Dia 3	Dia 6	Dia 10	Dia 11
Modo contínuo	**C**	42,27	45,65			42,57
	H	7,08	7,17			7,19
	N	2,13	5,12			2,22
Modo intermitente	**C**		45,83	42,23	42,13	
	H		6,88	6,54	6,91	
	N		5,97	3,52	2,06	

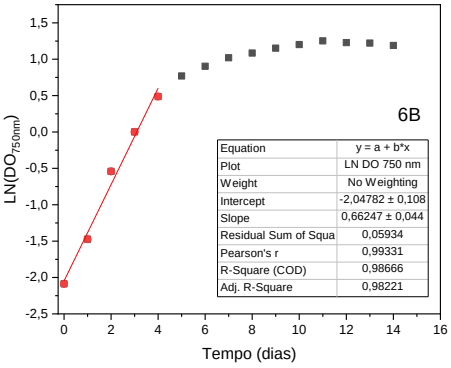
APÊNDICE E - Gráficos para cálculo das velocidades máximas específicas dos ensaios cinéticos de *P. kessleri* em reator e análise elementar para os mesmos cultivos

Gráficos de Ln(DO_{750nm}) em função do tempo dos cultivos de *P. kessleri* sob aeração intermitente a **5% CO_2**

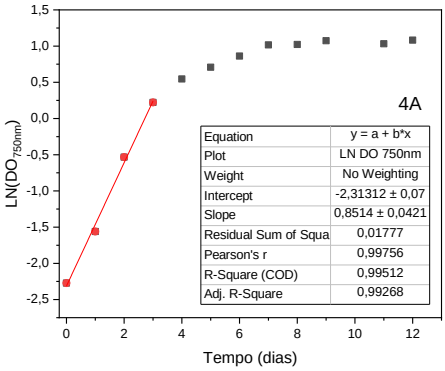


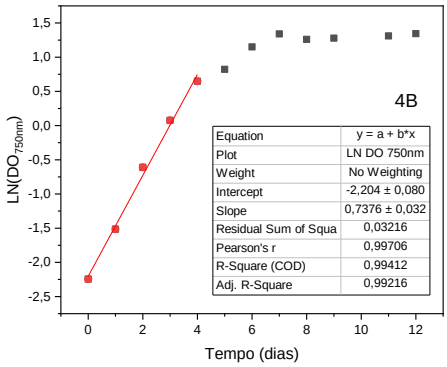


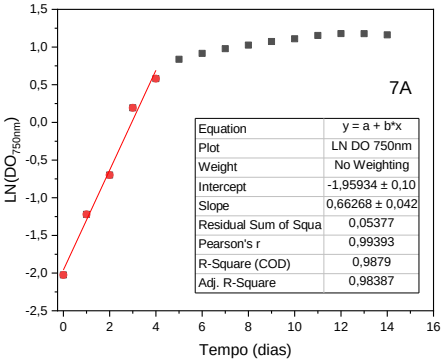


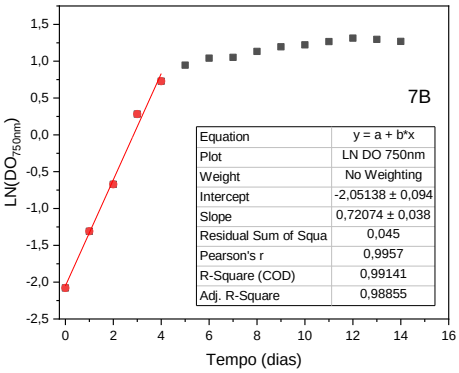


Gráficos de Ln(DO_{750nm}) em função do tempo dos cultivos de *P. kessleri* sob aeração intermitente a **15% CO_2**

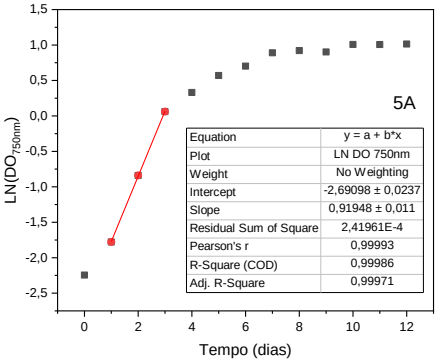


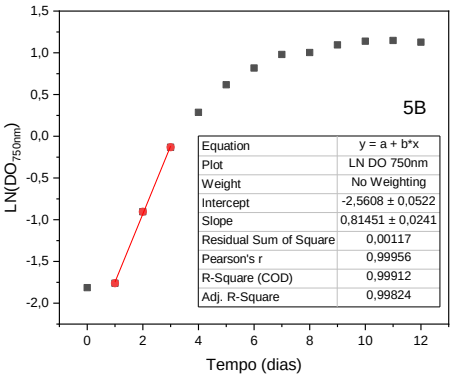


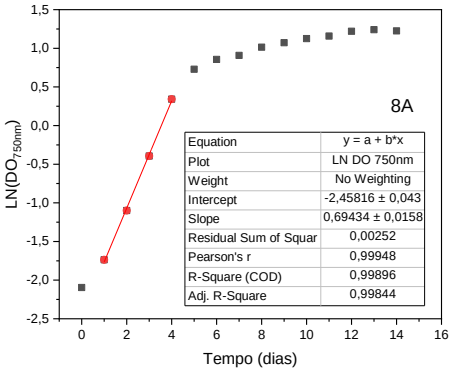


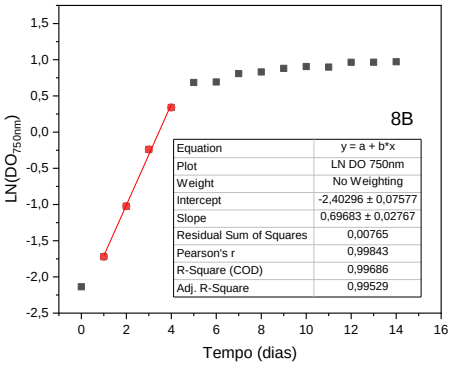


Gráficos de ln(DO_{750nm}) em função do tempo dos cultivos de *P. kessleri* sob aeração intermitente a **30% CO_2**







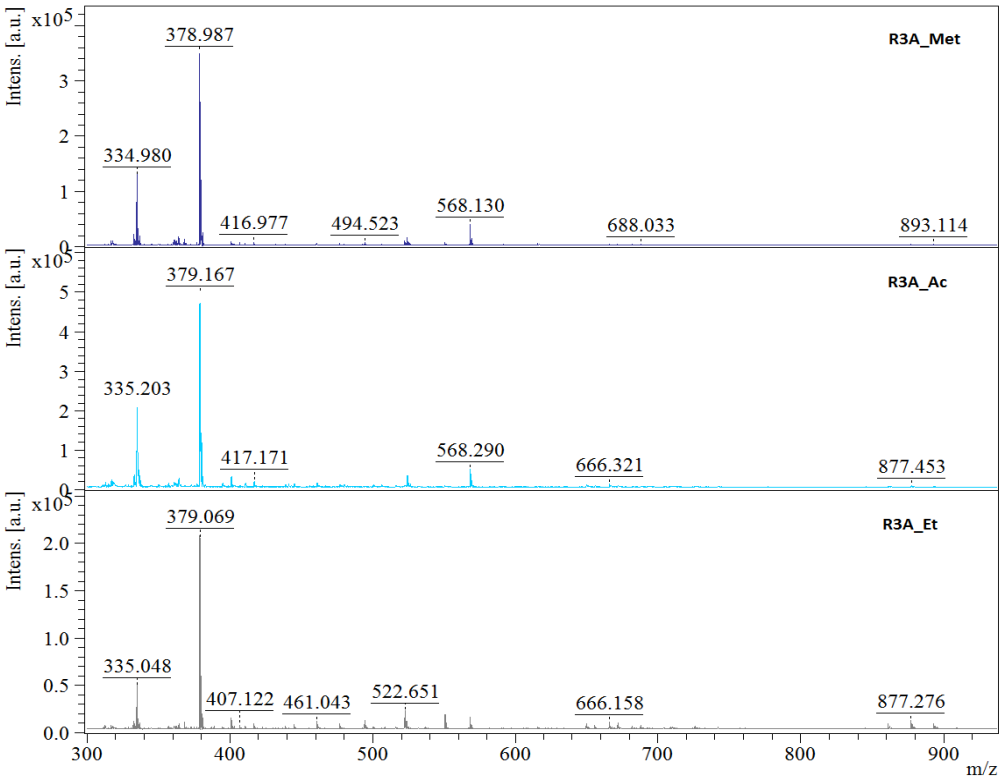


Análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio nos diferentes dias de cultivo de *P. kessleri* sob aeração intermitente a 5, 15 e 30% de CO_2

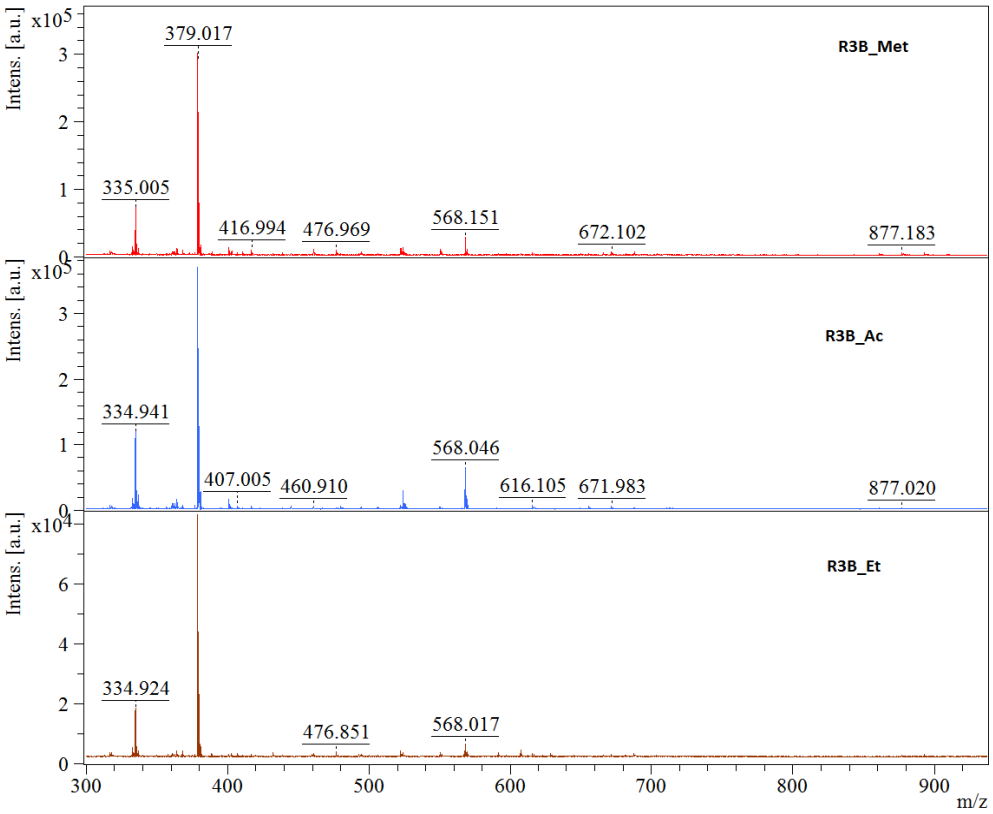
Concentração de CO_2 (%)	**Elemento (%)**	**Dia 3**		**Dia 12**		**Dia 14**	
		A	**B**	**A**	**B**	**A**	**B**
5	**C**	43,72	45,59			52,17	51,76
	H	6,99	7,19			8,30	8,07
	N	4,77	6,35			1,08	1,39
15	**C**	42,06	44,75	46,59	48,55		
	H	6,14	6,53	7,91	7,44		
	N	3,61	5,7	0,92	1,09		
30	**C**	40,96	45,83	48,82	48,2		
	H	6,53	6,62	7,61	7,46		
	N	3,96	7,19	1,06	1,54		

APÊNDICE F - Espectros de massas MALDI-TOF dos extratos de pigmentos em diferentes solventes puros (Et – Etanol / Met – Metanol / Ac – Acetona)

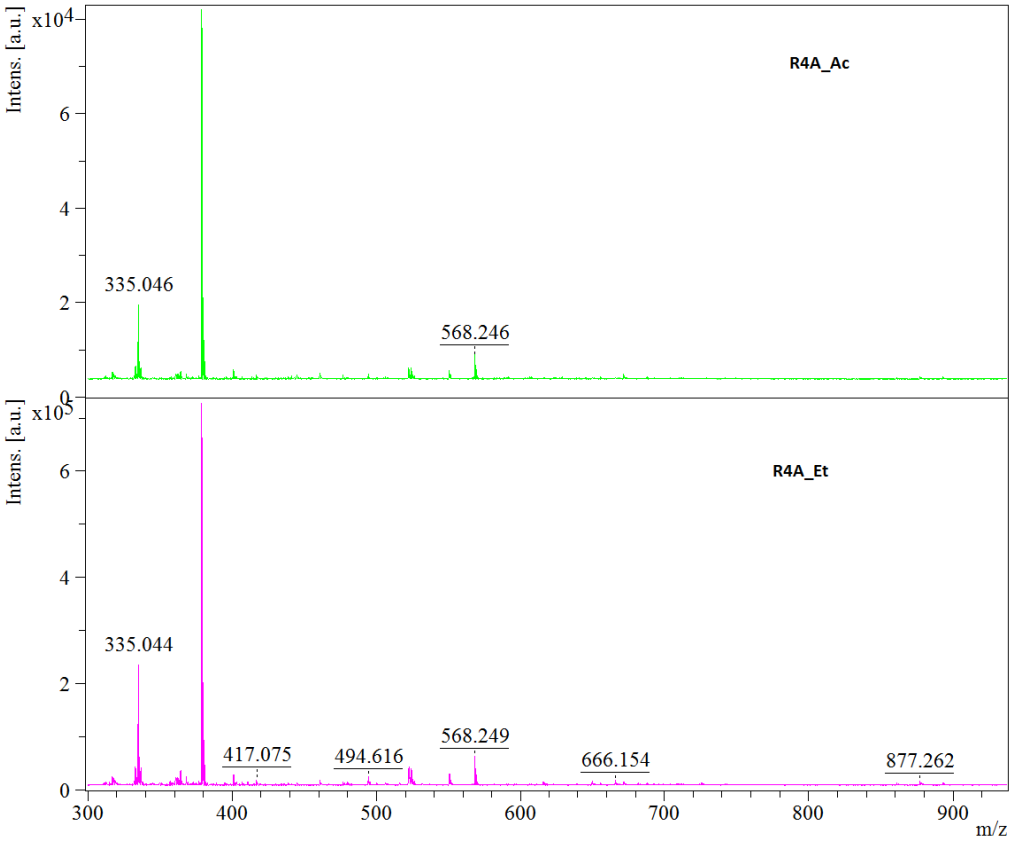
Amostra R3A



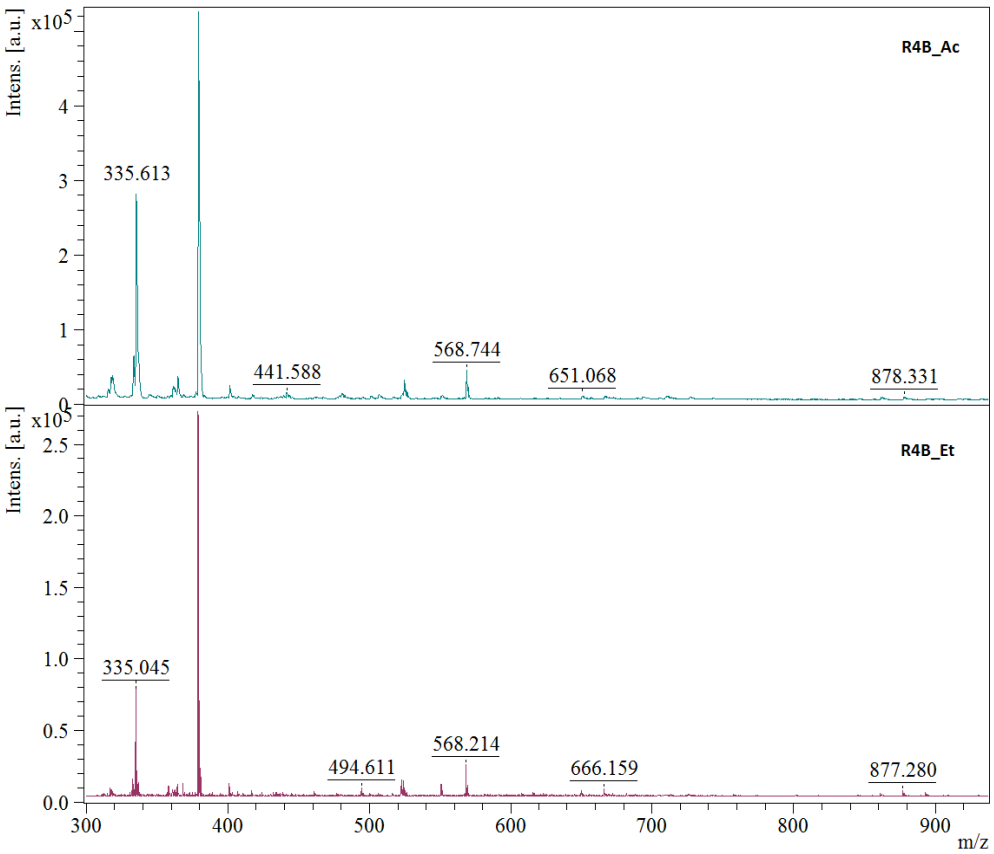
Amostra R3B



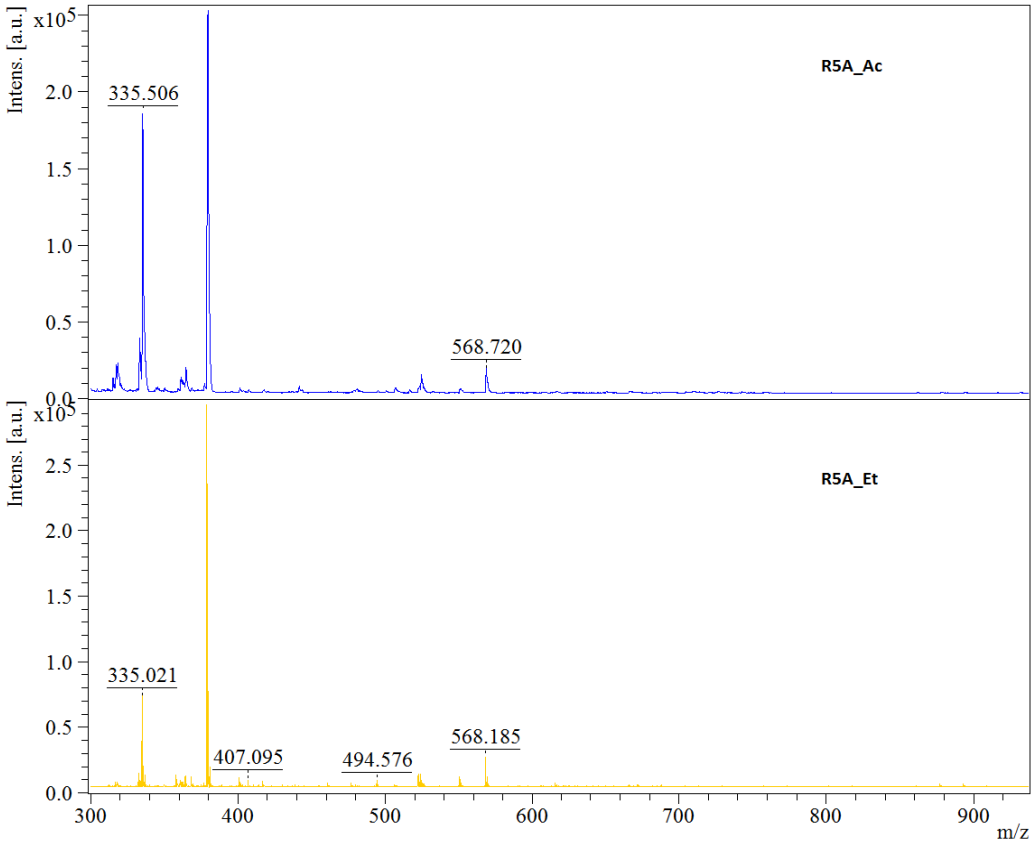
Amostra R4A



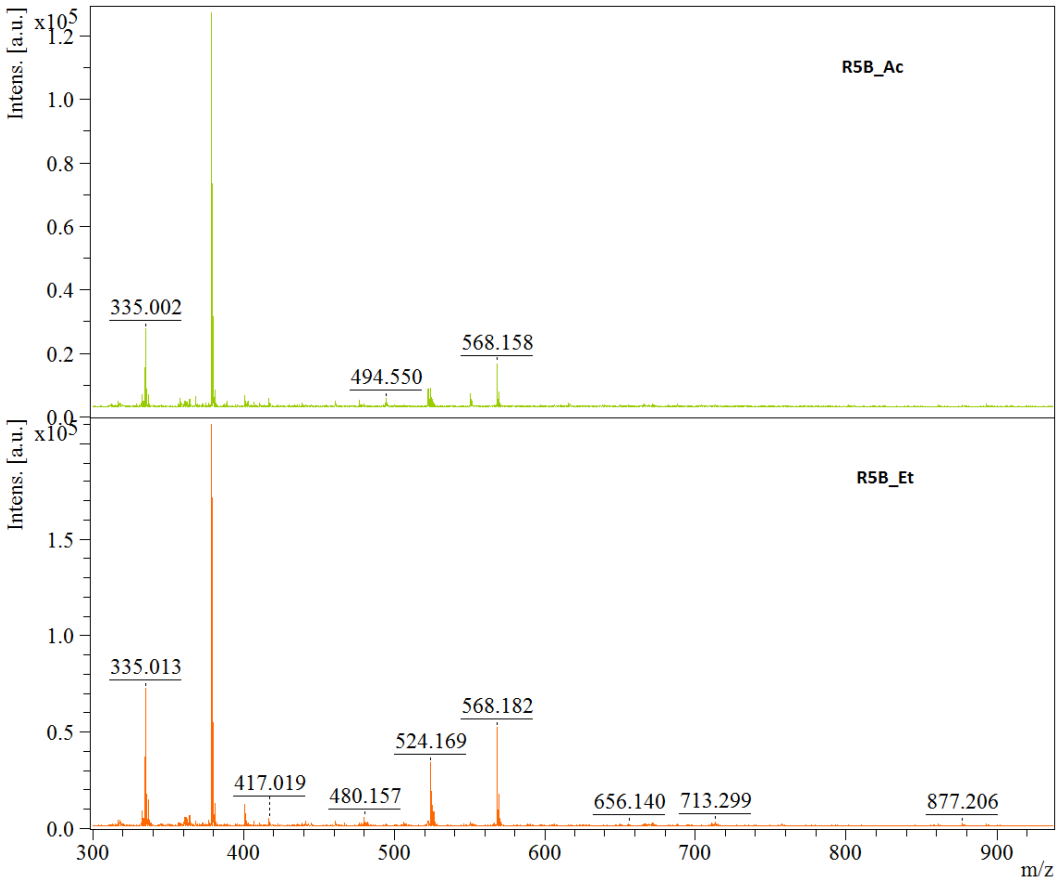
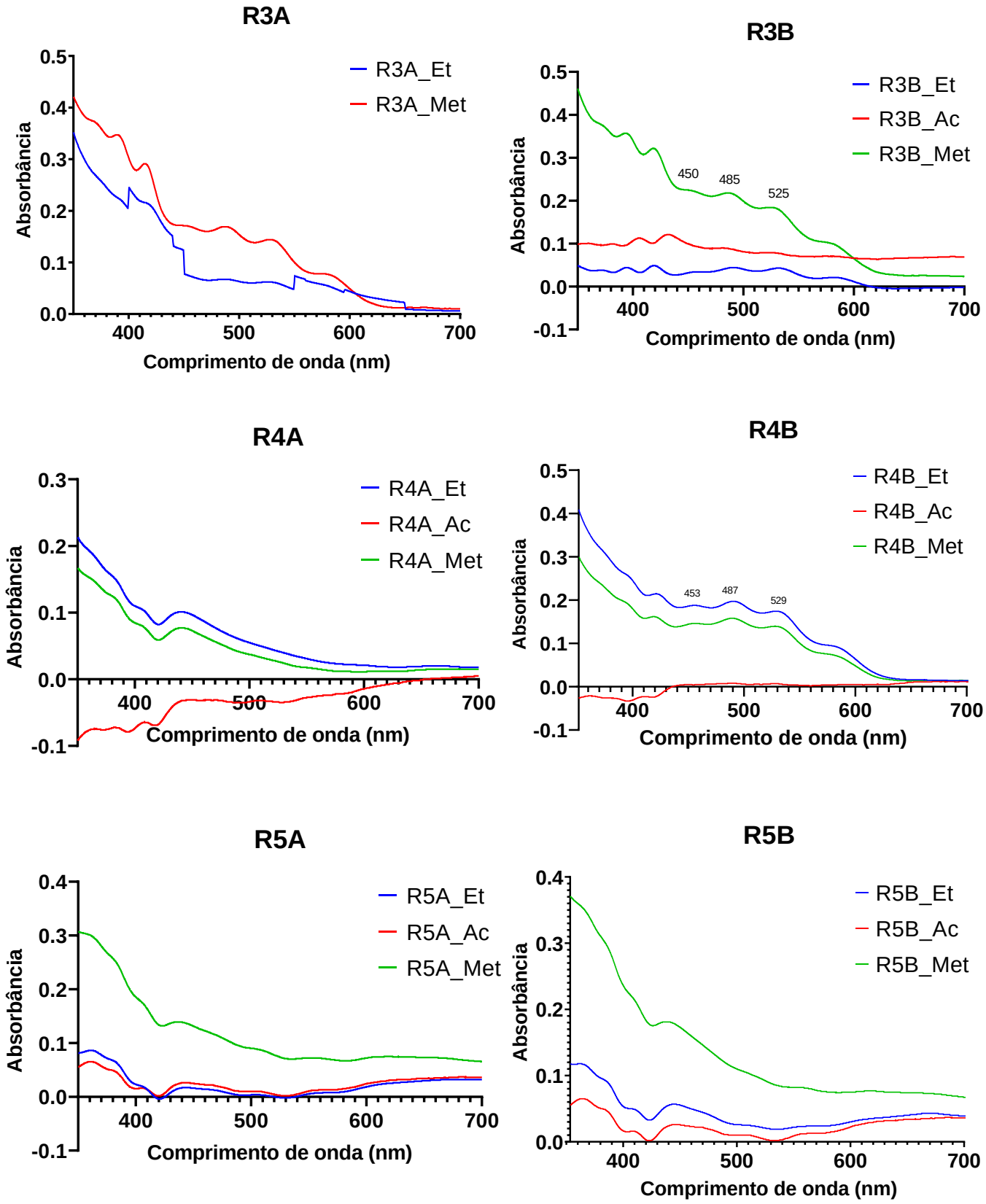
Amostra R4B



Amostra R5A



Amostra R5B



APÊNDICE G - Espectros de absorção no UV-Vis dos extratos de pigmentos em diferentes solventes puros (Et – Etanol / Met – Metanol / Ac – Acetona)