

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Produção da Microalga *Nannochloropsis*
oculata em Fotobiorreator *Airlift***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Lara Regina Soccol Gris

Porto Alegre

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Produção da Microalga *Nannochloropsis
oculata* em Fotobiorreator *Airlift***

Lara Regina Soccol Gris

Dissertação de Mestrado apresentada como
requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Engenharia

Área de concentração: Pesquisa e
Desenvolvimento de Processos

Orientadores:

Prof. Dr. Jorge Otávio Trierweiler

Prof. Dr. Marcelo Farenzena

Porto Alegre

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação *Produção da Microalga Nannochloropsis oculata em Fotobiorreator Airlift*, elaborada por Lara Regina Soccol Gris, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia.

Comissão Examinadora:



Dr^a. Luciane Ferreira Trierweiler



Prof. Dr. Nilo Sérgio Medeiros Cardozo



Prof. Dr. Paulo Cesar Oliveira Vergne de Abreu

Agradecimentos

Em primeiro lugar a Deus, pela vida e por sempre guiar meus caminhos.

Ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e à CAPES, pela bolsa concedida, e à FAPERGS pelos recursos para realização do projeto.

Aos meus orientadores, Professor Jorge Otávio Trierweiler e Professor Marcelo Farenzena, pela amizade, apoio, por me motivarem e auxiliarem no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Laboratório de Ecologia do Fitoplâncton e de Microorganismos Marinhos, da Universidade Federal do Rio Grande, por ceder a microalga isolada para este estudo.

Aos meus pais, Vera e Casemiro, pelos valores transmitidos, pelo apoio e amor.

Ao meu querido irmão Marcelo, pelo seu amor, carinho e compreensão.

Ao meu namorado, Filipe, por todo amor, companheirismo, paciência e pelo apoio em todos os momentos.

Aos amigos e colegas do Departamento de Engenharia Química, Aline Bernardi, Ana Cardinale, Anderson Paim, Carolina Kechinski, Cassiano Ranzan, Cleiton da Porciúncula, Cristiane Redaelli, Cauã Borges, Dalciana Waller, Débora Rosa, Elis Domeneghini, Fernanda Borges, Franck Souza, Giovana Mercali, Jordana Spada, Júlia Sarkis, Juliana Paranhos, Juliana Espíndola, Letícia Corbini, Liliana Dutra, Luciane Trierweiler, Matheus Escobar, Patrick Grau, Rafael Busato, Rafael Costa, Rodolfo Rodrigues, Rodrigo Mejía, Rodrigo Silveira, Sara Masiero, Thiéli

Mortari e Viviane Botelho, pela amizade, pelos momentos de convivência, por seu apoio e contribuição.

Em especial ao Me. Eng. Anderson Paim, às bolsistas de iniciação científica e alunas de graduação Aline Bernardi e Elis Domeneghini e ao mestrando Cauã Borges, pela fundamental participação no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores do Departamento de Engenharia Química, em especial à Professora Rosane Rech, pela sua contribuição.

Aos funcionários do Departamento de Engenharia Química, em especial Eduardo, Marcos, Patrício e Tatiana, pela sua disponibilidade e contribuição.

Aos membros da Comissão Examinadora pelas sugestões para melhoria desta dissertação.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação e para o desenvolvimento dessa dissertação, meus sinceros agradecimentos.

Resumo

Microalgas são micro-organismos fotossintetizantes que convertem CO_2 majoritariamente em lipídios, proteínas e carboidratos. A produção de microalgas é indicada atualmente como alternativa para biomitigação de CO_2 e para geração de biocombustíveis, a partir da conversão da biomassa através de processos químicos e biotecnológicos. As vantagens das microalgas estão na sua maior velocidade de crescimento em relação a vegetais oleaginosos superiores e em seu teor lipídico, que para algumas espécies pode chegar a valores maiores que 50%. Apesar do potencial envolvendo as microalgas, muitos desafios ainda precisam ser superados para tornar viável a aplicação desses micro-organismos para fins energéticos. São necessários desenvolvimentos nas mais diversas áreas, abordando os seguintes aspectos: seleção e melhoramento genético de espécies, alcance de maior eficiência fotossintética, desenvolvimento de sistemas de produção e de seu escalonamento, desenvolvimento de sistemas e processos de colheita, extração e processamento, aproveitamento de nutrientes provenientes de resíduos, otimização de condições operacionais, dentre outros. Este trabalho teve por objetivo determinar as melhores condições de crescimento da microalga marinha *Nannochloropsis oculata* em um fotobiorreator *airlift*. Os experimentos foram realizados seguindo um delineamento composto central rotacional com temperatura, (19 a 29 °C), concentração de nitrato no meio de cultivo ($f/2$) (25 a 125 mg.l^{-1}) e intensidade luminosa (3636 a 10364 lux) como variáveis de estudo. Uma planta laboratorial com 12 fotobiorreatores foi construída, permitindo realizar os experimentos do referido planejamento em dois blocos. As variáveis de resposta estudadas e os respectivos melhores resultados experimentais obtidos foram de 482,7 mg.l^{-1} para a máxima concentração de biomassa, nas condições de 21 °C, 105 mg.l^{-1} de NaNO_3 e 9000 lux, taxa instantânea de crescimento no período exponencial de 0,5624 d^{-1} , nas condições de 24 °C, 75 mg.l^{-1} de NaNO_3 e 7000 lux e percentual de lipídios em biomassa liofilizada de 30,36%, nas condições de 21 °C, 45 mg.l^{-1} de NaNO_3 e 5000 lux.

Palavras-chave: microalgas, *Nannochloropsis oculata*, fotobiorreator *airlift*, biocombustíveis, biomitigação de CO_2 .

Abstract

Microalgae are photosynthetic microorganisms that convert CO₂ mainly into lipids, proteins and carbohydrates. Microalgae production is currently pointed out as an alternative for CO₂ biomitigation and generation of renewable biofuels, from biomass conversion by chemical and biotechnological processes. Microalgae advantages are fastest growth comparing with oil crops and their higher lipid content, which for some species can reach values above 50%. Despite the potential involving microalgae, many challenges remain to be overcome to make feasible the application of these microorganisms for energy purposes. We need to develop several areas, addressing the following issues: selection and genetic improvement of species, reaching higher photosynthetic efficiency, development of production systems and their scale up, development of systems and procedures for harvest, extraction and processing, use of nutrients from flue gases and wastewater, optimization of operating conditions, etc. This study aimed to determine the best conditions for growth of the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* in airlift photobioreactor. Experiments were carried out following a central composite design of the following variables: temperature (19 to 29 °C), nitrate concentration in the culture medium (f/2) (25 to 125 mg.l⁻¹) and irradiance (3636 to 10364 lux). A laboratory plant was built with 12 photobioreactors, allowing perform the central composite design in two blocks. The response variables studied and the best experimental results obtained were 482,7 mg.l⁻¹ for maximum biomass concentration under conditions of 21 °C, NaNO₃ concentration 105 mg.l⁻¹ and 9000 lux, instantaneous rate of increase in exponential period equal to 0.5624 d⁻¹ under the conditions of 24 °C, NaNO₃ concentration 75 mg.l⁻¹ and 7000 lux and percentual lipid content in lyophilized biomass of 30.36% under the conditions of 21 °C, NaNO₃ concentration 45 mg.l⁻¹ and 5000 lux.

Keywords: *microalgae, Nannochloropsis oculata, airlift photobioreactor, biofuels, CO₂ biomitigation.*

Sumário

Introdução	1
1.1 Motivação	1
1.2 Objetivos da Dissertação	2
1.3 Estrutura da Dissertação	3
Revisão Bibliográfica	5
2.1 Microalgas	5
2.1.1 Contextualização	5
2.1.2 Mitigação de CO ₂ e Potencial para Aplicações com Fins Energéticos	8
2.1.3 Classificação Quanto ao Metabolismo e Regime de Cultivo	12
2.1.4 Reprodução e Medidas de Crescimento.....	14
2.1.5 Influência de Fatores Ambientais	18
2.1.6 <i>Nannochloropsis oculata</i>	20
2.1.7 Meios de Cultivo	26
2.2 Sistemas de Cultivo	27
2.2.1 Sistemas Abertos	28
2.2.2 Sistemas Fechados	30
2.2.3 Fotobiorreatores <i>Airlift</i> e Coluna de Bolhas.....	35
2.3 Colheita e Processamento de Biomassa de Microalgas.....	38
2.4 Delineamento Composto Central Rotacional	42
Materiais e Métodos	45
3.1 Material de Laboratório, Esterilização, Manipulação e Armazenamento	45
3.2 Meio de Cultura	46
3.3 Manutenção do Banco de Células de <i>Nannochloropsis oculata</i>	47
3.4 Fotobiorreator <i>Airlift</i> Utilizado nos Experimentos	48
3.5 Montagem e Operação da Planta de Fotobiorreatores.....	51
3.6 Planejamento Experimental	56
3.6.1 Experimento 1	56
3.6.2 Experimento 2	58
3.7 Análises Realizadas	60
3.7.1 Espectrofotometria Visível	60
3.7.2 Determinação de Peso Seco	60
3.8 Análise de Lipídios.....	61
3.8.1 Método Soxhlet	62
3.8.2 Método de Folch com Ultrassom	63
3.8.3 Método de Bligh & Dyer com Ultrassom	65
3.9 Análise Estatística dos Resultados	65
3.10 Método Dinâmico de Determinação do k_{La}	66
Resultados e Discussão	69

4.1 Experimento 1	69
4.2 Experimento 2A	70
4.3 Experimento 2B	71
4.3.1 Máxima Concentração de Biomassa.....	77
4.3.2 Taxa Instantânea de Crescimento	82
4.3.3 Teor de Lipídios em Biomassa Liofilizada	84
4.3.4 Biomassa <i>versus</i> Lipídios - Uma Abordagem Qualitativa.....	91
4.4 Determinação do k_{LA} do Fotobiorreator <i>Airlift</i>	93
Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros	95
Referências Bibliográficas	99
Apêndice A - Informações Adicionais	105
Apêndice B - Resultados Complementares	129
Lista de Figuras.....	xv
Lista de Tabelas	xvii

Lista de Figuras

Figura 2.1:	Representação esquemática do desenvolvimento de microalgas em um cultivo em batelada	13
Figura 2.2:	Imagem ampliada da microalga <i>Nannochloropsis oculata</i>	22
Figura 2.3:	Alguns sistemas utilizados no cultivo de <i>Nannochloropsis oculata</i>	24
Figura 2.4:	Alguns exemplos de sistemas abertos para produção de microalgas	29
Figura 2.5:	Geometrias comuns na construção de fotobiorreatores	30
Figura 2.6:	Interações entre fluidodinâmica, reações bioquímicas e transferência de luz em fotobiorreatores	33
Figura 2.7:	Configurações usuais para reatores <i>airlift</i>	37
Figura 2.8:	Processos utilizados no processamento de biomassa algácea	41
Figura 2.9:	Delineamento composto central para três variáveis de estudo.....	44
Figura 3.1:	Fotobiorreator <i>airlift</i> plano de circulação interna utilizado nesse estudo.....	50
Figura 3.2:	Planta de fotobiorreatores.....	52
Figura 3.3:	Representação esquemática do sistema de aeração da planta de fotobiorreatores	53
Figura 3.4:	Representação esquemática do sistema de troca térmica da planta de fotobiorreatores	55
Figura 3.5:	Fotobiorreator <i>airlift</i>	55
Figura 3.6:	Extrator Soxhlet utilizado.	63
Figura 3.7:	Análise de lipídios pelo método de Folch com ultrassom	64
Figura 3.8:	Determinação do k_{LA} pelo método dinâmico.	67
Figura 4.1:	Curva do inóculo utilizado nos experimentos da batelada 1 do Experimento 2B	72
Figura 4.2:	Curva do inóculo utilizado nos experimentos da batelada 2 do Experimento 2B	72
Figura 4.3:	Relação entre absorvância e peso seco determinada para os experimentos da batelada 1 do Experimento 2B.....	73
Figura 4.4:	Relação entre absorvância e peso seco determinada para os experimentos da batelada 2 do Experimento 2B.....	73
Figura 4.5:	Curvas de crescimento obtidas no Experimento 2B.	74
Figura 4.6:	Diagrama de Pareto da máxima concentração de biomassa do Experimento 2B.	80
Figura 4.7:	Valores experimentais e valores estimados do modelo reduzido de máxima concentração de biomassa do Experimento 2B.....	80
Figura 4.8:	Superfície de resposta para o modelo reduzido de máxima concentração de biomassa do Experimento 2B	81
Figura 4.9:	Diagrama de Pareto do teor de lipídios do Experimento 2B.....	88
Figura 4.10:	Valores experimentais e valores estimados do modelo reduzido do teor de lipídios do Experimento 2B	89
Figura 4.11:	Superfície de resposta para o modelo reduzido do teor de lipídios do Experimento 2B.	90
Figura 4.12:	Superfície de resposta para o modelo reduzido da máxima concentração de lipídios do Experimento 2B.	93

Figura 4.13:	Relação entre k_{La} e vazão de ar determinada para o fotobiorreator <i>airlift</i> utilizado nessa dissertação.	94
Figura A.1:	Câmara incubadora utilizada para manutenção do banco de células e inóculos.	117
Figura A.2:	Rotâmetro utilizado na medição de vazão do fotobiorreator P1-1.	119
Figura A.3:	Rotâmetro utilizado na medição de vazão do fotobiorreator P1-2.	119
Figura A.4:	Rotâmetro utilizado na medição de vazão do fotobiorreator P1-3.	120
Figura A.5:	Rotâmetro utilizado na medição de vazão do fotobiorreator P2-1.	120
Figura A.6:	Rotâmetro utilizado na medição de vazão do fotobiorreator P2-2.	121
Figura A.7:	Rotâmetro utilizado na medição de vazão do fotobiorreator P2-3.	121
Figura A.8:	Rotâmetro utilizado na medição de vazão do fotobiorreator P2-4.	122
Figura A.9:	Rotâmetro utilizado na medição de vazão do fotobiorreator P3-1.	122
Figura A.10:	Rotâmetro utilizado na medição de vazão do fotobiorreator P3-2.	123
Figura A.11:	Rotâmetro utilizado na medição de vazão do fotobiorreator P3-3.	123
Figura A.12:	Rotâmetro utilizado na medição de vazão do fotobiorreator P3-4.	124
Figura A.13:	Rotâmetros utilizados para dosagem de CO ₂ na mistura 1.	125
Figura A.14:	Rotâmetros utilizados para dosagem de CO ₂ na mistura 2.	126
Figura A.15:	Rotâmetros utilizados para dosagem de CO ₂ na mistura 3.	127
Figura B.1:	Curva típica do inóculo utilizado nos experimentos do Experimento 1 ..	132
Figura B.2:	Relação entre absorvância e peso seco para os experimentos do Experimento 1.	132
Figura B.3:	Curvas de crescimento obtidas nos experimentos do Experimento 1	133
Figura B.4:	Curva do inóculo utilizado nos experimentos da batelada 1 do Experimento 2A.	136
Figura B.5:	Curva do inóculo utilizado nos experimentos da batelada 2 do Experimento 2A.	136
Figura B.6:	Relação entre absorvância e peso seco utilizada para os experimentos da batelada 1 do Experimento 2A.	137
Figura B.7:	Relação entre absorvância e peso seco utilizada para os experimentos da batelada 2 do Experimento 2A.	137
Figura B.8:	Curvas de crescimento obtidas nos experimentos do Experimento 2A. ..	138
Figura B.9:	Diagrama de pareto para a máxima concentração de biomassa do Experimento 2A.	142
Figura B.10:	Valores experimentais e valores experimentais para o modelo reduzido de máxima concentração de biomassa do Experimento 2A.	143
Figura B.11:	Replicata 1 da determinação do k_{La} com vazão de ar de 500 ml.min ⁻¹ a 19° C.	145
Figura B.12:	Replicata 2 da determinação do k_{La} com vazão de ar de 500 ml.min ⁻¹ a 19° C.	145
Figura B.13:	Replicata 1 da determinação do k_{La} com vazão de ar de 750 ml.min ⁻¹ a 19° C.	146
Figura B.14:	Replicata 2 da determinação do k_{La} com vazão de ar de 750 ml.min ⁻¹ a 19° C.	146
Figura B.15:	Replicata 1 da determinação do k_{La} com vazão de ar de 1000 ml.min ⁻¹ a 19° C.	147
Figura B.16:	Replicata 2 da determinação do k_{La} com vazão de ar de 1000 ml.min ⁻¹ a 19° C.	147

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Potencial de fontes lipídicas na produção de biodiesel.	10
Tabela 2.2: Microalgas potenciais na produção de biocombustíveis.	21
Tabela 2.3: Composição típica da microalga <i>Nannochloropsis oculata</i>	22
Tabela 2.4: Comparação entre sistemas de produção de microalgas.....	32
Tabela 3.1: Composição do meio f/2.	47
Tabela 3.2: Matriz de planejamento experimental do Experimento 1.....	57
Tabela 3.3: Matriz de planejamento experimental do Experimento 2.....	59
Tabela 4.1: Resultados obtidos no Experimento 2B.....	76
Tabela 4.2: Análise de variância da máxima concentração de biomassa do Experimento 2B.	78
Tabela 4.3: Coeficientes de regressão estimados para a máxima concentração de biomassa do Experimento 2B.	79
Tabela 4.4: Análise de variância da taxa instantânea de crescimento do Experimento 2B.	83
Tabela 4.5: Análise de lipídios de uma amostra teste por diferentes metodologias.	84
Tabela 4.6: Análise de variância do teor de lipídios do Experimento 2B.....	87
Tabela 4.7: Coeficientes de regressão estimados para o teor de lipídios do Experimento 2B.	87
Tabela 4.8: Máxima concentração de lipídios do Experimento 2B.....	92
Tabela B.1: Resultados obtidos nas análises cromatográficas das correntes de aeração do Experimento 1.	130
Tabela B.2: Resultados obtidos no Experimento 1.....	134
Tabela B.3: Análise de variância da máxima concentração de biomassa do Experimento 1.....	135
Tabela B.4: Análise de variância da taxa instantânea de crescimento do Experimento 1.....	135
Tabela B.5: Resultados obtidos nos experimentos do Experimento 2A.....	139
Tabela B.6: Análise de variância da máxima concentração de biomassa do Experimento 2A.	141
Tabela B.7: Coeficientes de regressão estimados para a máxima concentração de biomassa do Experimento 2A.	142
Tabela B.8: Análise de variância da taxa instantânea de crescimento do Experimento 2A.	144
Tabela B.9: Análise de variância do teor de lipídios do Experimento 2A.....	144

Lista de Abreviações e Símbolos

AA	Ácido aracdônico
AGIPs	Ácidos graxos poliinsaturados
DHA	Ácido docosahexaenóido
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EPA	Ácido eicopentanóico
IPCC	<i>Intergovernmental Panel on Climate Change</i>
k_{La}	Coeficiente volumétrico de transferência de massa da fase líquida
NREL	<i>National Renewable Energy Laboratory</i>
v.v.m	Volume de ar por volume de meio de cultivo por minuto

Capítulo 1

Introdução

1.1 Motivação

A procura por fontes energéticas renováveis e viáveis economicamente cresce cada vez mais na sociedade atual, devido às tendências no aumento de emissões de gases provenientes de combustíveis fósseis. Nesse contexto, destacam-se as microalgas, microorganismos movidos à energia solar que convertem dióxido de carbono majoritariamente em lipídios, proteínas e carboidratos. O cultivo de microalgas é indicado atualmente como uma alternativa importante na biomitigação de CO₂, pois cada quilograma de biomassa algal representa aproximadamente a fixação de 1,83 quilograma de CO₂¹. (AMIN, 2009; CHISTI, 2007; IPCC, 2007; WANG *et al.*, 2008).

A maioria das microalgas são fonte rica de ácidos graxos ω-3 e ω-6 e aminoácidos essenciais, como a leucina, isoleucina, valina, etc. Seu óleo é rico principalmente em triglicerídeos (maior que 80%), com um perfil de ácidos graxos ricos em cadeias carbônicas

¹ Dado apresentado por CHISTI (2007), baseado na fórmula molecular aproximada de uma microalga, CO_{0,48}H_{1,83}N_{0,11}P_{0,01}, estimada a partir de dados de GROBBELAAR (2004) e em dados de análise elementar de *Phaeodactylum tricornutum* (MIRÓN *et al.*, 2003), que apresentou teor de C de 49,2%. Considerando a fórmula molecular proposta, estima-se a fixação de 1,87 quilogramas de CO₂ por quilograma de biomassa algácea, valor próximo de 1,80, quando o cálculo é baseado na análise elementar de MIRÓN *et al.* (2003).

com 16 e 18 carbonos, comparável com óleo de sementes de plantas, contendo ácidos esteárico, oléico, linoléico e palmítico. Através de processos químicos, termoquímicos ou biológicos, como transesterificação, gaseificação, liquefação, pirólise, hidrogenação e fermentação, a biomassa pode ser convertida a potenciais biocombustíveis renováveis, incluindo o metano, biodiesel e biohidrogênio (AMIN, 2009; CHISTI, 2007; LOURENÇO, 2006; MENG *et al.*, 2009).

Apesar do potencial energético envolvendo as microalgas, muitos autores são categóricos a respeito da necessidade de mais estudos para tornar a biofixação de CO₂ e a produção da biomassa em biocombustíveis viável economicamente. As pesquisas devem abordar, dentre outros, os seguintes aspectos: seleção de espécies, alcance de maior eficiência fotossintética, desenvolvimento de sistemas de produção, aperfeiçoamento do balanço energético após a contabilização de operações no bombeamento de água, transferência de CO₂, colheita, extração e processamento, mais pesquisas com plantas em larga escala, aproveitamento de gases de combustão, dentre outros. (BRENNAN & OWENDE, 2010; CHISTI, 2007; MATA, MARTINS & CAETANO, 2010).

1.2 Objetivos da Dissertação

Para que as microalgas possam se tornar viáveis economicamente como fonte de energia e biocombustíveis, uma série de desafios em diversas áreas ainda precisam ser vencidos. Exemplificando, existe a necessidade de: (a) otimizar a produção de microalgas, (b) aumentar a eficiência de biofixação de CO₂, (c) aumentar a seletividade dos componentes precursores dos biocombustíveis e dos produtos de alto valor agregado, (d) aprimorar as tecnologias visando o processamento adequado da biomassa gerada, (e) melhorar os processos de separação, dentre outros. Ingressar nessa área é uma tarefa multidisciplinar e certamente há muito para ser desenvolvido e otimizado por profissionais da área de engenharia. Esta dissertação teve por objetivo estudar o crescimento de uma microalga em fotobiorreator para determinação das melhores condições operacionais de crescimento e acúmulo de lipídios.

1.3 Estrutura da Dissertação

Esta dissertação apresenta-se dividida em cinco capítulos, conforme descritos a seguir. O Capítulo 1 trata da introdução ao tema a ser abordado na tese. No Capítulo 2 é feita uma descrição dos principais conceitos e publicações relacionados ao escopo dessa dissertação, abordando algumas aplicações comerciais e potencial energético das microalgas, características dos cultivos, sistemas de cultivo e estudos envolvendo a espécie *Nannochloropsis oculata*, escolhida como microorganismo modelo para desse trabalho.

O Capítulo 3 descreve as metodologias utilizadas, incluindo a concepção e construção de uma planta laboratorial com 12 fotobiorreatores, controle de temperatura, dosagem de CO₂ e luminosidade. O Capítulo 4 apresenta e discute os principais resultados. No Capítulo 5, estão apresentadas de forma reduzida as principais conclusões acerca do estudo realizado, bem como sugestões de trabalhos futuros na área.

São também apresentados dois Apêndices, o A com informações adicionais relativas aos materiais utilizados na dissertação, e o Apêndice B com resultados complementares, antecessores aos resultados principais, discutidos no Capítulo 5.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2.1 Microalgas

2.1.1 Contextualização

O termo microalga, sinônimo de fitoplâncton, engloba micro-organismos procarióticos (cianobactérias) e eucarióticos (algas de dimensões microscópicas) fotossintéticos (dotados de clorofila *a*) que podem crescer rapidamente e viver em condições rigorosas devido à sua estrutura unicelular. O interesse por esses micro-organismos reside no seu potencial de utilização de sua biomassa para alimentação, rações, produtos químicos finos, tratamento de resíduos e aplicações energéticas. As microalgas podem ser encontradas em todo mundo, principalmente distribuídas nas águas, mas podem também ser encontradas na superfície de alguns tipos de solos. Os diversos organismos fitoplânctônicos podem se apresentar como células isoladas, agrupadas formando colônias ou encadeadas sob a forma de segmentos lineares de células. Em todos os casos ocorre pouca ou nenhuma diferenciação das funções ou especialização das células, ou seja, cada célula realiza todas as funções vitais. (LOURENÇO, 2006; MATA, MARTINS & CAETANO, 2010; TOMASELLI, 2004).

Os primeiros estudos envolvendo cultivo de microalgas no Brasil foram realizados no início da década de 70, com a criação de um laboratório com algumas dezenas de cepas na Universidade de São Paulo. A partir de 1980, esses cultivos começaram a se difundir no Brasil, com envolvimento de pesquisadores e universidades de vários Estados. Atualmente, os estudos envolvendo microalgas têm ampla participação de pesquisadores no Brasil, integrando profissionais que produzem literatura nas mais diversas áreas, como fisiologia, ecologia, bioquímica, ecotoxicologia e aquicultura. (LOURENÇO, 2006).

Os sistemas atuais de classificação das algas são baseados nos seguintes critérios principais: tipo de pigmentos, natureza química dos produtos de armazenamento e constituintes da parede celular. Critérios adicionais levam em consideração alguns aspectos citológicos e morfológicos, como a ocorrência de células flageladas, a estrutura dos flagelos, a forma de divisão nuclear e celular, a presença de um envelope de retículo endoplasmático em torno do cloroplasto, e possível conexão entre o retículo endoplasmático e a membrana nuclear (TOMASELLI, 2004). Em termos de abundância, se destacam as seguintes classes de algas (OHSE *et al.*, 2007):

- a) Diatomáceas (Bacillariophyceae): São dominantes nos oceanos, sendo também encontradas em água salobra e doce. Aproximadamente 100.000 espécies são conhecidas. Possuem paredes celulares impregnadas com sílica polimerizada. Todas as células armazenam carbono, seja na forma de óleo natural ou de um polímero de carboidratos conhecido como crisolaminarina. Suas células são eucarióticas, sua forma de vida é unicelular cocóide, de colônias filamentosas e outras formas. Fazem parte de seu complexo coletor de luz clorofilas *a*, *b* e *c*, β -caroteno e xantofilas, conferindo-lhes uma coloração dourado-amarronzada.
- b) Algas verdes (Chlorophyceae): especialmente abundantes em água doce. Sua forma é unicelular ou formando colônias. Sua principal forma de reserva é o amido, porém sob certas condições podem armazenar óleo. Sua coloração é verde, devido aos pigmentos clorofila *a* e *b*, β -caroteno e xantofilas. Sua parede celular geralmente é celulósica.
- c) Algas verde-azuladas (Cyanophyceae): suas células são procarióticas, sendo muito semelhantes em estrutura e organização às bactérias. Sua forma de vida é unicelular,

colonial e filamentosa. Apresentam como reserva o amido das cianofíceas, glicogênio e cianoficina. Sua coloração é verde-azulada, verde, violeta, vermelho e castanho, o que se deve à composição de pigmentos que possui: clorofila *a*, ficocianina, aloficocianina, ficoeritrina, β -caroteno e xantofila. Estas algas apresentam papel muito importante na fixação do nitrogênio atmosférico. Aproximadamente 2.000 espécies são conhecidas e encontradas nos mais variados habitats.

- d) Algas douradas (Chrysophyceae): grupo similar às diatomáceas, principalmente pela pigmentação e composição bioquímica. Possuem um sistema de pigmentos mais complexo, podendo ser de coloração amarela, marrom ou laranja. Suas células são eucarióticas, sendo a maioria dos gêneros unicelulares flagelados (monodal) ou coloniais; suas substâncias de reserva são constituídas de óleos naturais e crisolaminarina. Aproximadamente 1.000 espécies são conhecidas, principalmente em sistemas de água doce.

As aplicações mais simples das microalgas estão na alimentação direta ou indireta de animais de interesse econômico, como moluscos, crustáceos e peixes, e na alimentação do homem, por seu conteúdo rico em proteínas, vitaminas e corantes naturais, incluindo os gêneros *Chlorella*, *Dunaliella* e *Scenedesmus*. Algumas microalgas, como *Porphyridium cruentum*, *Nannochloropsis spp.* e *Phaedactylum tricornutum* apresentam altas concentrações de lipídios e de ácidos graxos poliinsaturados (AGIPs) de cadeia longa. Três AGIPs em especial, os ácidos eicopentaenóico (EPA), docosaheptaenóico (DHA) e araquidônico (AA), são particularmente interessantes por apresentarem alto valor nutritivo (BRENNAN & OWENDE, 2010; LOURENÇO, 2006; MATA, MARTINS & CAETANO, 2010).

Outras aplicações envolvem a utilização de microalgas como indicadores ambientais, biofertilizantes, a extração de produtos com importância farmacêutica, produção de cosméticos e de corantes de alimentos a partir de carotenóides. Como exemplo pode ser citada a produção de β -caroteno e astaxantina pelos gêneros *Dunaliella* e *Haematococcus*, respectivamente. Aplicações ainda em desenvolvimento incluem o uso de microalgas em testes de toxicologia e aproveitamento de moléculas bioativas de uso terapêutico, e ainda, na área biotecnológica, estão a bioconservação de energia solar, captação de CO₂ atmosférico e

proveniente de gases de combustão e o tratamento de águas residuais (BRENNAN & OWENDE, 2010; LOURENÇO, 2006; MATA, MARTINS & CAETANO, 2010).

Dentre os países de maior expressão em produção e/ou pesquisas com microalgas estão Estados Unidos, Japão, China, Taiwan, Indonésia, Tailândia, Austrália, Israel, República Tcheca, Alemanha, Itália, Bulgária e Chile. Entre as empresas de destaque no cenário mundial estão a *Cyanotech*, no Havaí, Estados Unidos e a *Alga Technologies*, em Israel. Tratando-se de sistemas fechados de produção, em escala comercial várias empresas já desenvolveram projetos para produção de microalgas, como por exemplo: Photo Bioreactors Ltd (Espanha, década de 1980), Sagdiana PGT (Tadjiquistão, 1991), Hidrobiologica SA (Argentina, 1996), Inalco S.p.A (Itália, 1996) e Microalgae S.p.A (Itália, 1997). As plantas dessas empresas foram fechadas após poucos meses de operação, principalmente por motivos associados a baixa produtividade, instabilidade, contaminação, bioacúmulo de biomassa, dificuldades no controle de temperatura e nos níveis de oxigênio dissolvido (LOURENÇO, 2006; PEDRONI *et al.*, 2001; TREDICI, 2004).

Mais recentemente, também desenvolveram sistemas em escala comercial as empresas Micro Gaia Inc (EUA), Aquasearch Inc (EUA) e Ökologische Produkte Altmark GmbH . Infelizmente, não há informações disponíveis a respeito da produtividade desses sistemas (TREDICI, 2004).

2.1.2 Mitigação de CO₂ e Potencial para Aplicações com Fins Energéticos

Os problemas relacionados ao aquecimento global são tema de estudos e discussões por todo o mundo. Em 2007, foi divulgado pelo *IPCC* um estudo que trata das bases científicas das mudanças climáticas, concluindo que o aquecimento global dos últimos 50 anos é causado pelas atividades humanas. A taxa de crescimento das emissões entre 1995 e 2004 foi de 0,92 GtCO₂-eq/ano. Somente em 2004, 38 Gt de CO₂-eq foram emitidas no mundo por atividades humanas (*IPCC*, 2007). O CO₂ é o principal gás causador do efeito

estufa, sendo responsável por cerca de 77% das emissões totais em base CO₂-eq¹.

Conceitualmente, a atenuação da concentração de CO₂ na atmosfera pode ser feita de três formas: (1) através da redução da queima de combustíveis fósseis, (2) de sua captura na atmosfera, ou de (3) seu uso, captura ou sequestro antes que ele entre na atmosfera. Em condições naturais, as microalgas assimilam CO₂ do ar, que contem em média 0,036% em volume de CO₂, porém a maioria pode tolerar e utilizar níveis substancialmente maiores, normalmente até 15% em volume. Espera-se que a biofixação de CO₂ e a produção de energia de biomassa serão medidas que servirão atenuar o acréscimo de CO₂ atmosférico e evitar futuras crises de energia (AMIN, 2009; BRENNAN & OWENDE, 2010; WANG *et al.*, 2008).

A seleção de cepas de microalgas adequadas para biomitigação de CO₂ tem efeito significativo sobre a eficácia e a competitividade dos custos do processo de biomitigação. Atributos desejáveis para a fixação de CO₂ incluem altas taxas de crescimento e utilização de CO₂, alta tolerância a vestígios de constituintes dos gases de combustão, tais como SO_x e NO_x, possibilidade de obtenção de valiosos subprodutos e coprodutos, como biodiesel e biomassa para combustíveis sólidos, facilidade de colheita, associados a sedimentação espontânea ou características de biofloculação, tolerância a altas temperaturas de água para minimizar o custo de resfriamento de gases de combustão e capacidade de utilizar águas residuais. Nenhuma cepa atualmente pode satisfazer todos os requisitos descritos (BRENNAN & OWENDE, 2010).

Segundo BRENNAN & OWENDE (2010), a produção de biocombustíveis a partir de microalgas em conjunto com tratamento de resíduos é a área biotecnológica com potencial de aplicação comercial mais plausível em curto prazo. Em condições propícias, as microalgas crescem rapidamente, geralmente dobrando sua biomassa em um período de um dia. Entre as biomassas, devido à sua estrutura ser mais simples, as microalgas têm geralmente uma maior

¹ Emissão de CO₂-equivalente é a quantidade de CO₂ emitido que causaria a mesma força radioativa, integrada em um horizonte de tempo determinado, que uma quantidade emitida de gases causadores de efeito estufa de vida longa ou uma mistura de gases causadores do efeito estufa. A emissão de CO₂ equivalente é obtida multiplicando a emissão do gás causador de efeito estufa pelo seu potencial de aquecimento global para o dado horizonte de tempo. Para uma mistura de gases, o parâmetro é obtido somando-se as emissões de CO₂ equivalentes de cada gás. Nos dados referenciados os gases causadores de efeito estufa considerados foram CO₂, CH₄, N₂O, SF₆, hidrofluorcarbonos e perfluorcarbonos (IPCC, 2007).

eficiência fotossintética em relação a vegetais superiores, como as oleaginosas e as árvores, chegando a fixar de 10 a 50 vezes mais CO₂. A biomassa formada apresenta teores de lipídios entre de até 50%, podendo atingir valores superiores sob determinadas condições operacionais. (AMIN, 2009; CHISTI, 2007; MATA, MARTINS & CAETANO, 2010; MENG *et al.*, 2009).

Para exemplificar o potencial energético das microalgas, apresenta-se o estudo realizado por CHISTI (2007), que projeta a produção de lipídios a partir de microalgas em relação a outras oleaginosas, avaliando os rendimentos teóricos e a área necessária para produção, considerando 50% da demanda por combustível nos Estados Unidos, nesse caso representada por biodiesel. Os rendimentos teóricos de uma alga com 30% de lipídios em peso seco chegam a ser 130 vezes superiores ao rendimento da soja, por exemplo, com base em dados experimentais de produção em fotobiorreatores tubulares. É necessário salientar que a base de comparação adotada é relacionada à área utilizada e em nada diz respeito a fatores econômicos, o que deve ser observado atentamente para que conclusões tendenciosas não sejam tomadas em relação às microalgas. Os dados são apresentados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Potencial de fontes lipídicas na produção de biodiesel.

Cultura	Rendimento em óleo (L/ha)	Área necessária (M ha) ^a	Percentual necessário da área de cultivo existente nos EUA
Milho	172	1540	846
Soja	446	594	326
Canola	1190	223	122
Jatropha	1892	140	77
Coco	2689	99	54
Palma	5950	45	24
Microalga ^b	136.900	2	1,1
Microalga ^c	58.700	4.5	2,5

^a Para atender 50% da demanda por combustíveis nos EUA.

^b 70% de óleo em peso seco.

^c 30% de óleo em peso seco.

(Fonte: CHISTI, 2007).

As vantagens da produção de microalgas como fonte de biomassa e lipídios para fins energéticos estão embasadas na maior produtividade em biomassa e na biofixação de CO₂,

mas também em outros aspectos importantes. É possível produzir durante todo ano em regiões com boa disponibilidade de luz e temperatura adequada; além disso, muitas espécies de microalgas crescem em meio aquoso salobro e salino, o que diminui a demanda por fontes de água doce; a produção pode ser feita em terras não-aráveis, diminuindo os impactos ambientais associados ao uso de terras cultiváveis e não concorrendo com produção de alimentos, forragens, etc. (BRENNAN & OWENDE, 2010; MATA, MARTINS & CAETANO, 2010).

Os nutrientes necessários ao cultivo de microalgas, principalmente nitrogênio e fósforo, podem ser obtidos a partir de águas residuais; portanto, além do fornecimento de meio de crescimento, existe um potencial para o tratamento de efluentes orgânicos da indústria agro-alimentar. Após a extração de óleo, a biomassa das algas resultante pode ser transformada em etanol, metano, ração animal ou ser usada como adubo orgânico devido a seu alto teor de N e P, ou simplesmente utilizada para a cogeração de energia (eletricidade e calor). A composição bioquímica das microalgas pode ser otimizada variando as condições experimentais, dependendo dos produtos de interesse (BRENNAN & OWENDE, 2010; MATA, MARTINS & CAETANO, 2010).

No contexto envolvendo biocombustíveis, tem destaque o programa desenvolvido pelo Departamento de Energia dos Estados Unidos entre 1978 e 1996, voltado para espécies aquáticas potenciais na produção de matérias-primas para produção de biodiesel. Embora o programa tenha feito avanços, esteve distante de alcançar a viabilidade econômica, em função de problemas tecnológicos de cultivo em grande escala e separação da biomassa. No momento ainda não há tecnologia que permita a produção de biomassa algácea em grandes quantidades e com facilidade de separação do meio. Em 2002 foram iniciadas as atividades de uma rede internacional de pesquisa sobre biofixação de CO₂ por microalgas, composta por diversas empresas e organizações não governamentais que compartilham experiências. Uma das metas é demonstrar a viabilidade do uso de microalgas como alternativa para mitigar os efeitos do acúmulo de CO₂ na atmosfera (LOURENÇO, 2006; NREL, 2008; PEDRONI *et al.*, 2001).

2.1.3 Classificação Quanto ao Metabolismo e Regime de Cultivo

As microalgas, dependendo de sua espécie, apresentam três tipos principais de metabolismo: autotrófico, com utilização da luz como fonte única de energia que é convertida em energia química por meio de reações fotossintéticas; heterotrófico: utilização apenas de compostos orgânicos dissolvidos como fonte de carbono e energia; e mixotrófico: realização da fotossíntese como a principal fonte de energia, embora compostos orgânicos e CO₂ sejam ambos essenciais. No metabolismo anfitrófico, subtipo de mixotrofia, os organismos são capazes de viver autotrófica ou heterotroficamente, dependendo da concentração de compostos orgânicos e intensidade de luz disponível. Além do apelo pela biofixação de CO₂, atualmente a produção fotoautotrófica é o único método que seria tecnicamente e economicamente factível para produção em grande escala de biomassa de algas para fins não energéticos (BRENNAN & OWENDE, 2010; MATA, MARTINS & CAETANO, 2010).

Quanto ao regime de cultivo, destacam-se os cultivos em batelada, semicontínuos e contínuos. Entretanto, para aplicações específicas, existem na literatura desenvolvimentos em culturas de células imobilizadas e recicladas. Os cultivos em batelada são caracterizados por modificações intensas na composição do meio de cultura ao longo do processo e pelo efeito de auto-sombreamento das células. As células são inoculadas no meio fresco no início do cultivo, não havendo nenhuma adição posterior de nutrientes (YUAN-KUN & HUI, 2004; LOURENÇO, 2006).

No regime de batelada, há etapas de crescimento bem definidas: fase de adaptação ou *lag* (1), que ocorre devido à presença de células inviáveis ou esporos no inóculo ou devido ao período de adaptação fisiológica das células frente às modificações nas condições de cultivo, mas pode ser evitada quando células em crescimento exponencial avançado são usadas como inóculo; fase exponencial ou logarítmica (2), onde inicia o crescimento e a multiplicação e as células se dividem como uma função exponencial do tempo, enquanto substratos, luz e temperatura adequada estiverem disponíveis; fase de redução do crescimento ou de transição (3); fase estacionária (4); fase de declínio ou de morte (5). Esse tipo de cultivo é interessante para pesquisa, onde se deseja entender o comportamento do sistema frente às condições

operacionais aplicadas. A curva de crescimento típica gerada nesse regime pode ser exemplificada pela Figura 2.1 (YUAN-KUN & HUI, 2004; LOURENÇO, 2006).

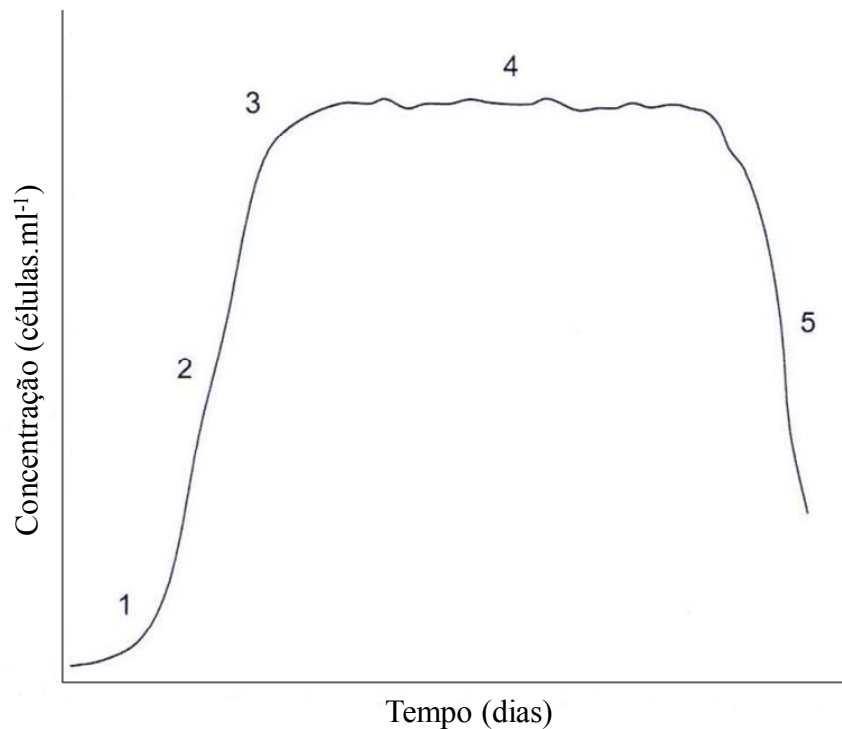


Figura 2.1: Representação esquemática do desenvolvimento de microalgas em um cultivo em batelada. (1) Fase de adaptação. (2) Fase de crescimento exponencial. (3) Fase de transição. (4) Fase estacionária. (5) Fase de declínio. (*Fonte: LOURENÇO, 2006*).

Nos cultivos contínuos há um processo permanente de saída de cultura com microalgas e entrada de meio esterilizado no recipiente de cultivo, baseado em dois diferentes sistemas, turbidostato e quimiostato. Nesse último, a taxa de adição de meio e remoção de cultura são iguais e constantes, sendo o sistema utilizado quando deseja ajuste da fisiologia das células às condições de cultura existentes e da manutenção das taxas de crescimento específico em valores pré-determinados. No turbidostato, a concentração de células da cultura é mantida constante através do controle da vazão de meio. Este mecanismo é útil quando há instabilidade no cultivo e/ou não é possível manter a concentração de células em valores constantes num simples quimiostato. O monitoramento da densidade celular pode ser feito através de uma célula fotoelétrica sensível à turbidez da cultura, ou através do monitoramento de variáveis como O_2 , consumo de CO_2 ou mudança no pH (YUAN-KUN & HUI, 2004; LOURENÇO, 2006).

Os cultivos semicontínuos são caracterizados pela substituição de parte do meio de cultivo em intervalos periódicos, geralmente quando a quantidade de biomassa presente já é alta. As curvas de crescimento típicas apresentam variações bruscas na densidade de células. Nesse tipo de cultivo a produtividade é elevada, bem como o consumo de nutrientes. A concepção atual de que microalgas constituem sistemas de alta produtividade advém em parte de cultivos semicontínuos. Embora os cultivos contínuos e semicontínuos forneçam microalgas com maior uniformidade do que em outros tipos de cultivo, podem ser necessários dias ou até semanas para estabilizar esse regime de cultivo. Outra limitação quanto ao uso desses cultivos está relacionada principalmente à contaminação por outros micro-organismos, sendo extremamente difícil produzir cultivos monoalgáceos axênicos (ausentes de contaminantes microbianos), mesmo em escala de laboratório. (LOURENÇO, 2006).

2.1.4 Reprodução e Medidas de Crescimento

O padrão de reprodução predominante no cultivo de microalgas é o vegetativo, ou seja, a célula mãe se divide em duas células filhas, levando ao aumento do número de indivíduos presentes, fato que é considerado na maioria das expressões de crescimento de microalgas, embasadas no número de duplicações de células por unidades de tempo. Qualquer estimativa das taxas de crescimento exige uma série temporal de medidas que permitam uma estimativa da taxa de variação da biomassa. Se o objetivo do estudo é estimar as taxas de crescimento, ou seja, a compreensão dinâmica de desenvolvimento dos cultivos, a contagem de células é um dos procedimentos mais adotados. Como o procedimento de contagem é custoso, utilizam-se medidas indiretas que também representam o crescimento dos micro-organismos. Medidas típicas que podem ser correlacionadas são densidade ótica, fluorescência *in vivo*, quantificação de peso seco, concentração de pigmentos (principalmente clorofila *a*) e concentração de carbono. (LOURENÇO, 2006; WOOD, EVERROAD & WINGARD, 2005).

Para utilizar uma correlação é essencial conhecer as condições de crescimento em que ela foi determinada e o intervalo de concentração em que é válida. Quando se trabalha com organismos fotossintéticos, como algas, também é necessário levar em consideração o ciclo

diário, ao planejar a estratégia de amostragem, visto que vários componentes são sintetizados com certa periodicidade. Isto significa que a amostragem deve ocorrer preferencialmente todos os dias no mesmo horário, o que na prática também minimiza a dispersão nas séries temporais de medições. A dispersão também pode ser reduzida evitando realizar medidas em horários que coincidam com aqueles onde ocorre divisão celular sincronizada, naquelas culturas onde se conhece esse comportamento. Assim, pode ser útil a realização de estudos preliminares para determinar qual o padrão de divisão celular na linhagem ou espécie sob investigação (WOOD, EVERROAD & WINGARD, 2005).

A utilização de medidas de densidade óptica para avaliar o crescimento de microalgas baseia-se na obstrução física da passagem da luz pelas células; quanto maior a concentração de células maior será a absorvância, seguindo a Lei de Lambert-Beer. A seleção do comprimento de onda para as medidas deve considerar o fato de que as microalgas possuem pigmentos fotossintetizantes, cuja absorção tipicamente está em valores maiores que 600nm. Os dados de absorvância obtidos devem ser posteriormente relacionados a um método de determinação de biomassa através de uma curva de calibração, como o peso seco. Essa técnica consiste em recolher alíquotas de cultivos de volume conhecido e concentrar as células por centrifugação, filtração ou floculação e posteriormente na determinação da biomassa presente, geralmente por gravimetria. Determinações com material seco são mais adequadas, pois a presença de umidade nas amostras provoca erro significativo nas análises. A secagem das amostras pode ser realizada por meio de estufas ou através de liofilização (HARRIS, 2005; LOURENÇO, 2006).

O cálculo da taxa de crescimento por meio de equações padrão requer um crescimento exponencial. Por isso, é útil ter alguma noção prévia da velocidade com qual o número de células ou da biomassa está mudando, e quanto tempo leva para esgotar o meio ao planejar um experimento a taxa de crescimento. Idealmente, deve-se garantir que a amostragem ocorra em pelo menos três pontos do tempo entre o momento que a cultura entra na fase de crescimento exponencial e o tempo que ele entra no período de transição para a fase estacionária. Em geral, isso envolve a utilização de um inóculo inicial pequeno o suficiente para o meio de cultura suportar cinco ou mais gerações de crescimento. Quando apenas dois pontos de dados estão disponíveis, é possível calcular uma taxa de crescimento, mas a confiança na taxa só é tão boa quanto a segurança do investigador que a cultura estava em

crescimento exponencial durante todo o tempo decorrido entre a colheita de amostras para cada ponto de dados. (WOOD, EVERROAD & WINGARD, 2005).

Uma forma tradicional de calcular o crescimento exponencial de microalgas em cultivos em regime de batelada foi proposta por GUILLARD (1973 apud WOOD, EVERROAD & WINGARD, 2005), que considera que durante o crescimento exponencial, a taxa de aumento de células por unidade de tempo é proporcional ao número de células presentes na cultura no instante de tempo inicial, seguindo a Equação 2.1

$$\frac{dN}{dt} = rN \quad (2.1)$$

cuja solução é dada pela Equação 2.2

$$N_t = N_0 e^{rt} \quad (2.2)$$

onde N_0 é a condição inicial para o tamanho da população, N_t é o tamanho da população no final do intervalo de tempo, e r é a taxa proporcional de variação, também chamada de taxa intrínseca de crescimento, parâmetro malthusiano, ou taxa instantânea de crescimento, cujas unidades são sempre expressas pelo tempo (t^{-1}). Isolando este termo da Equação 2.2 chega-se à Equação 2.3

$$r = \frac{\ln(N_t / N_0)}{\Delta t} = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{\Delta t} \quad (2.3)$$

onde Δt é o intervalo de tempo ($t_t - t_0$) considerado, estando t_0 representando o instante de tempo inicial e t_t o instante de tempo final do intervalo. Quando a mortalidade m é zero, a Equação 2.3 é equivalente à equação de crescimento clássico, com r igual à taxa de crescimento específico μ , resultando na Equação 2.4

$$r = \mu - m \quad (2.4)$$

Expressando o tempo t em dias, a taxa instantânea de crescimento r pode ser utilizada para calcular o número de duplicações por dia (k), dividindo r pelo logaritmo natural de 2 (i. e., por $\ln(2) = 0,6931$), conforme a Equação 2.5,

$$k = \frac{r}{0,6931} \quad (2.5)$$

ou alternativamente pela equação 2.6

$$k = \frac{\log_2(N_t / N_0)}{\Delta t} \quad (2.6)$$

Adaptando as equações anteriormente mencionadas também é possível calcular duplicações por unidade de tempo para qualquer incremento de tempo. Por convenção, pressupõe-se que a nomenclatura k refere-se a duplicações por dia e que t é expresso em dias, ou frações de dias. Se incrementos de tempo menores que um dia forem utilizados no cálculo, pode não ser possível presumir que a taxa de crescimento calculada a partir de dois pontos consecutivos aplica-se ao longo de um período de 24 horas, pois mesmo as culturas cultivadas sob luz contínua podem mostrar ritmos diários de divisão celular e deve ser amostradas durante mais de um ciclo diário. Sendo assim, considerando essas observações, o tempo de duplicação (T_2) da cultura pode ser calculado a partir de uma estimativa de r com o uso da Equação 2.7, com o resultado expresso na mesma unidade de tempo (GUILLARD, 1973 apud WOOD, EVERROAD & WINGARD, 2005).

$$T_2 = \frac{0,6931}{r} \quad (2.7)$$

Independentemente do parâmetro calculado, é importante notar as diferenças conceituais que fundamentam os termos taxa de crescimento instantânea, duplicações por dia e tempo de duplicação. Intuitivamente, pode parecer que uma divisão por dia seria equivalente a uma taxa de crescimento de $1,0 \text{ d}^{-1}$, porém isso não é verdade. A natureza contínua do crescimento exponencial significa que uma cultura que cresce a uma taxa k de uma divisão por dia, tem um tempo de duplicação T_2 de um dia e uma taxa de crescimento r de $0,69 \text{ d}^{-1}$.

2.1.5 Influência de Fatores Ambientais

Fatores ambientais como luz, temperatura, salinidade e nutrientes não afetam somente a taxa fotossintética e a produtividade em biomassa das microalgas, mas também os padrões, rotas e atividades do metabolismo celular e conseqüentemente a composição dinâmica das células, o que pode conduzir a amplas aplicações biotecnológicas. Por exemplo, é conhecido que uma diminuição na temperatura de crescimento abaixo do nível ótimo geralmente aumenta o grau de insaturação dos lipídios nas membranas. Outros estudos mostram que essa variável tem efeito na produção de enzimas, pigmentos, nas quotas de carbono e nitrogênio das células e no biovolume celular. (VONSHAK & TORZILLO, 2004).

A fotossíntese representa um processo único de conversão de energia solar e componentes inorgânicos em matéria orgânica, dentro dos limites de capacidade de cada micro-organismo. A atividade fotossintética pode ser monitorada por meio de medidas de produção de oxigênio e relacionada à intensidade luminosa, gerando as chamadas curvas luz-resposta, onde são determinadas a irradiação de saturação e a taxa máxima de fotossíntese. Em baixas irradiâncias, essa taxa cresce linearmente com a intensidade luminosa, mas à medida que essa variável aumenta a fotossíntese torna-se cada vez menos eficiente, até atingir um platô, onde as reações enzimáticas que utilizam energia tornam-se limitantes. Em condições prolongadas de irradiância acima do ótimo, geralmente a taxa de fotossíntese decresce, fenômeno conhecido como fotoinibição. (MASOJÍDEK, KOBLÍŽEK & TORZILLO, 2004).

As microalgas apresentam mecanismos de adaptação frente a mudanças na quantidade e qualidade da luz às quais estão sujeitas, com o objetivo de equilibrar as reações clara e escura da fotossíntese. Por exemplo, em condições de luz limitada, as células aumentam o número de unidades fotossintéticas e o tamanho dos complexos de coleta de luz. O tempo que as células têm para responder às mudanças varia de segundos até dias, onde diferentes mecanismos são utilizados para lidar com o excesso de energia. A aclimação a longo prazo à irradiância é referida como fotoaclimação, processo que envolve mudanças na óptica, biofísica, bioquímica, níveis ultra-estruturais, fisiológicos e moleculares. De maneira geral, sob luz limitada verifica-se aumento de clorofilas *a*, *b* e *c*, ficobiliproteínas e carotenóides

primários, favorecendo o acúmulo de AGPIs, incluindo EPA. Em alta luminosidade, clorofila e pigmentos fotossintetizantes diminuem e os carotenóides secundários aumentam, com aumento da produção de polissacarídeos (MASOJÍDEK, KOBLÍZĚK & TORZILLO, 2004; VONSHAK & TORZILLO, 2004).

O fluxo luminoso é medido em lúmens (lm), enquanto a intensidade luminosa é expressa em lux (lm.m^{-2}). As reações fotoquímicas na fotossíntese dependem do número de fótons incidentes na superfície, sendo conveniente expressar a irradiância como o número de fótons atingindo uma unidade de superfície uma unidade de tempo, geralmente $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ou $\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. É usual também expressar a energia da luz incidente em uma superfície, ou o fluxo de energia radiante, em unidades de potência por área (W.m^{-2} ou $\text{J.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Em um dia ensolarado, a irradiância solar média que atinge a superfície da terra corresponde a cerca de 1000 W.m^{-2} ou 100000 lux . Dessa energia, cerca de 40% corresponde à radiação fotossinteticamente ativa, situada entre 400 e 750 nm, correspondendo a $1800 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. O fator de conversão aproximado para a luz do sol é 1 W.m^{-2} equivale a $4,5 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. (EGC, 2010; MASOJÍDEK, KOBLÍZĚK & TORZILLO, 2004).

A carboxilação é o processo onde as moléculas de CO_2 são fixadas, na fase escura da fotossíntese e é favorecida por razões baixas de O_2/CO_2 . A fotorrespiração compete com esse processo, onde o carbono orgânico é convertido a CO_2 sem nenhum ganho metabólico. Para atingir rendimentos ótimos em cultivo de microalgas em massa é necessário minimizar os efeitos da fotorrespiração através do enriquecimento com CO_2 além da quantidade presente naturalmente no ar. O destino do carbono fixado dentro das células está fortemente ligado à concentração de nitrogênio no meio de cultivo, elemento que compõe cerca de 7 a 10% do peso seco das microalgas. Em geral, a produção de moléculas constituídas de nitrogênio é prejudicada em condições de suficiência do elemento. Já em concentrações limitadas de nitrogênio, o fluxo de carbono é desviado da síntese de proteínas para a síntese de lipídios ou carboidratos ou ainda carotenóides secundários em algumas espécies (MASOJÍDEK, KOBLÍZĚK & TORZILLO, 2004; VONSHAK & TORZILLO, 2004).

A influência de fatores físicos ou químicos na composição de microalgas conduz a resultados mais interessantes considerando o sinergismo entre as variáveis. É conhecido que no cultivo massivo de microalgas o ponto mais importante para a fotossíntese e produção de

metabólitos secundários é a luz. Porém, somente quando as necessidades nutricionais estiverem satisfeitas e a temperatura do cultivo estiver na região ótima é possível atingir produtividade máxima. Dentro de certos limites, a temperatura ótima para fotossíntese cresce com o aumento da intensidade da luz, existindo forte interação entre as variáveis. Além disso, o projeto de fotobiorreatores, combinado com determinadas estratégias de cultivo, também pode influenciar fortemente tanto a produtividade quanto composição bioquímica das microalgas. Geralmente, condições que favorecem a formação de produtos desejados, como por exemplo lipídios, não são compatíveis com aquelas requeridas para crescimento máximo e produção de biomassa; portanto, dependendo dos produtos de interesse, devem ser otimizadas as condições de crescimento (VONSHAK & TORZILLO, 2004).

Em busca das melhores condições operacionais para seus sistemas de cultivo, vários autores têm se dedicado a estudos considerando o sinergismo entre as variáveis de interesse, como, por exemplo, ARAÚJO & GARCIA (2005) e RAGHAVAN, HARIDEVI & GOPINATHAN (2008), que avaliaram a influência da salinidade, temperatura e concentração de CO₂ no crescimento e composição bioquímica de duas microalgas do gênero *Chaetoceros*, determinando seu teor de lipídios, carboidratos e proteínas para aplicações na aquicultura. A microalga *Dunaliella salina* também já foi estudada em trabalhos semelhantes, como o desenvolvido por ARAÚJO *et al.* (2009), que avaliou a influência de salinidade e irradiância no cultivo dessa microalga. Com base nas taxas de crescimento alcançadas, os autores propuseram um modelo para estimar custos relativos ao sequestro de 10% do CO₂ emitido por uma usina de gás natural de 200 MW, cujos resultados teóricos foram positivos considerando o mercado de créditos de carbono e de carotenóides.

2.1.6 *Nannochloropsis oculata*

Existem cerca de 100.000 espécies de microalgas conhecidas (OHSE *et al.*, 2007). Uma série de publicações apresenta a composição bioquímica média de algumas dessas espécies. Algumas das que apresentam destaque pelo seu conteúdo lipídico e/ou quantidade de trabalhos publicados estão listadas na Tabela 2.2. Uma das vantagens importantes que as microalgas marinhas apresentam em relação às de água doce é o menor potencial de

contaminação por bactérias e fungos devido à natureza salina dos meios de cultivo. Além disso, projetando cultivos em larga escala, com recursos naturais, é importante que se utilize o menor volume possível de água doce, evitando a concorrência com a produção de alimentos e com o próprio consumo humano e das indústrias.

Tabela 2.2: Microalgas potenciais na produção de biocombustíveis.

Espécie	% lipídios em peso seco de biomassa
Microalgas marinhas	
<i>Chaetoceros calcitrans</i> (diatomácea)	17,6
<i>Dunaliella salina</i> (clorofícea)	6,0 – 25
<i>Dunaliella tertiolecta</i> (clorofícea)	16,0 – 71,0
<i>Isochrysis galbana</i> (primnesiofícea)	7,1 - 33
<i>Nannochloropsis oculata</i> (eustigmatofícea)	22,7 - 29,7
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (diatomácea)	18,0 – 57,0
<i>Skeletonema costatum</i> (diatomácea)	13,5 - 51,3
Microalgas de água doce ou salobra	
<i>Botryococcus braunii</i> (clorofícea)	25,0 – 75,0
<i>Chlorella vulgaris</i> (clorofícea)	5,0 – 58,0
<i>Neochloris oleoabundans</i> (clorofícea)	29,0 – 65

(Fonte: SHENG-YI *et al.*, 2009 ; MATA, MARTINS & CAETANO *et al.*, 2010).

BORGES (2005) avaliou o potencial de absorção de CO₂ de dez espécies diferentes de microalgas. A Eustigmatofícea *Nannochloropsis oculata* foi apontada como melhor opção, devido à sua maior produção e conteúdo lipídico. Essa microalga, que tipicamente tem de 2 a 4 µm de diâmetro, é amplamente distribuída nos oceanos. Microalgas do gênero *Nannochloropsis* também se destacam por serem produtoras de um importante ácido graxo poliinsaturado essencial, o ácido eicopentanóico (EPA) (BROWN *et al.*, 1997; LOURENÇO, 2006; ZITTELLI *et al.*, 1999, ZOU *et al.*, 2000). Por tratar-se de um micro-organismo resistente, que tem boa produção em relação à média e com bom potencial na produção de lipídios, a *Nannochloropsis oculata* é a espécie de microalga escolhida para ser estudada nessa dissertação. Informações sobre sua composição bioquímica aproximada, provenientes de diferentes autores, podem ser vista na Tabela 2.3.

A microalga *Nannochloropsis oculata* (Figura 2.2) pertence à divisão *Ochrophyta*, da

classe *Eustigmatophyceae*, que compreende oito gêneros e quinze espécies, todas unicelulares cocóides ou coloniais, com distribuição na água doce, no solo úmido e no mar, predominantemente planctônicas. A espécie tem diâmetro médio de 2 a 4 μm , com células esféricas ou ligeiramente ovóides, não flageladas. A sua parede celular é rígida e composta de polissacarídeos; a estrutura química do seu produto de reserva não é conhecida, mas sabe-se que não se trata do amido. Somente a reprodução assexuada já foi constatada nessa classe e não são conhecidos efeitos nocivos das espécies do gênero *Eustigmatophyceae* na natureza. Por sua facilidade de cultivo, tamanho pequeno, velocidade de crescimento e alto teor de AGPIs essas microalgas são bastante utilizadas na aquicultura, com destaque para a *Nannochloropsis oculata* por acumular quantidade significativa de EPA. Na aquicultura, é utilizada como alimento para rotíferos e para criar efeito verde em tanques de larvas. (LOURENÇO, 2006; MURAKAMI & HASHIMOTO, 2009 apud SOARES, 2010; ZITELLI, RODOLFI & TREDICI, 2004).

Tabela 2.3: Composição típica da microalga *Nannochloropsis oculata*.

% em relação ao peso seco de biomassa			<i>Fonte</i>
Lipídios	Proteínas	Carboidratos	
16,2	-	-	<i>BORGES, 2005.</i>
3,4	21,3	11,0	<i>CAMPOS, BARBARINO & LOURENÇO, 2010.</i>
22,7-29,7	-	-	<i>SHENG-YI et al., 2009.</i>
18,0	35,0	7,8	<i>LOURENÇO, 2006.</i>



Figura 2.2: Imagem ampliada da microalga *Nannochloropsis oculata*. (Fonte: RCC, 2009 apud SOARES, 2010).

A produção de *Nannochloropsis oculata* para aquicultura é geralmente feita em sacos de polietileno suspensos (Figura 2.3 a). Na literatura há alguns relatos sobre cultivos dessa microalga em fotobiorreatores em ambientes fechados e abertos, com dados sobre sua produtividade. Fotobiorreatores *airlift* cilíndricos, feitos de fibra de vidro conectados em série e operando continuamente, com volume de 200 l e 30 cm diâmetro apresentaram produtividade de $50 \text{ mg.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$ sob iluminação de $330 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. (Figura 2.3 b). Um fotobiorreator modular foi construído a partir de seis painéis alveolares removíveis de 1,6 cm de espessura, dispostos verticalmente a fim de formar uma unidade compacta dentro de um compartimento com controle de temperatura. O volume total do sistema é de 123 l e área iluminada de $20,4 \text{ m}^2$. Sob iluminação de $230 \mu\text{E m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em ambos os lados do painel a produção foi de 7 g.l^{-1} (Figura 2.3 c) (ZITELLI, RODOLFI & TREDICI, 2004).

Em ambiente fechado, ainda foram realizados cultivos com placas de vidro de 1,4 cm de diâmetro e volume de 2 l, agitação vigorosa, sob regime de batelada, alcançando produção recorde de 60 g.l^{-1} . Em regime semicontínuo, com substituição do meio a cada 48 h para remover substâncias inibidoras, a produtividade alcançada variou de $0,8$ a $2,3 \text{ g.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Sob regime contínuo, o mesmo sistema, com iluminação de $300 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de um lado e $1700 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ do outro, atingiu $2,9 \text{ g.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Em ambiente aberto, ou seja, sob luz natural, operou-se um reator tubular quase horizontal, consistindo de oito tubos plásticos flexíveis paralelos a uma folha branca ondulada, orientados para o sul e dispostos de forma horizontal com ângulos pequenos, entre 5 e 7° . Os tubos foram conectados a um trocador de gases e a um *manifold* na base, onde mistura de ar e CO_2 foi injetada para promover a mistura e a troca de gases. O resfriamento foi obtido pela pulverização de água. Nessa configuração, um sistema com volume de 600 l e 30m^2 de área ocupada apresentou produtividade média no verão de $0,5$ a $0,8 \text{ g.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$ (Figura 2.3 d) (ZITELLI, RODOLFI & TREDICI, 2004).

Placas de vidro verticais de $0,5 \text{ m}^2$ e 1,3 cm diâmetro produziram de $0,12$ a $0,85 \text{ g.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Seguindo a mesma geometria, duas placas foram conectadas formando um sistema com volume de 500 l, 10 cm de caminho óptico, 2 m de largura, 1,1 m de altura e 8m^2 de superfície iluminada, equipado com um sistema de mistura por borbulhamento de ar resfriamento por pulverização com água. A produtividade alcançada foi de $0,21$ a $0,27 \text{ g l}^{-1}.\text{d}^{-1}$ no verão e inverno, respectivamente (Figura 2.3 e). Um sistema montado a partir de dois cilindros de 2 m de Plexiglas® de 3 e 5 cm de diâmetro colocados um dentro do outro, pode

ser operado com luz natural ou artificial; o canal formado pelo tubo menor é utilizado para colocação de lâmpadas ou para resfriamento, dependendo do propósito. Operado com mistura de ar e CO₂, a produtividade alcançada foi de 0,25 g.l⁻¹.d⁻¹ sob luz artificial. Já em condições naturais de iluminação, a produtividade variou de 0,12 a 0,25 g.l⁻¹.d⁻¹, porém atingiu 0,36 g.l⁻¹.d⁻¹ em determinado período do ano. (Figura 2.3 f). Entre os sistemas exemplificados, o reator tubular quase horizontal alcançou maior produtividade volumétrica, mas a placa de vidro parece ser superior em termos de facilidade de operação e limpeza. (ZITELLI, RODOLFI & TREDICI, 2004).

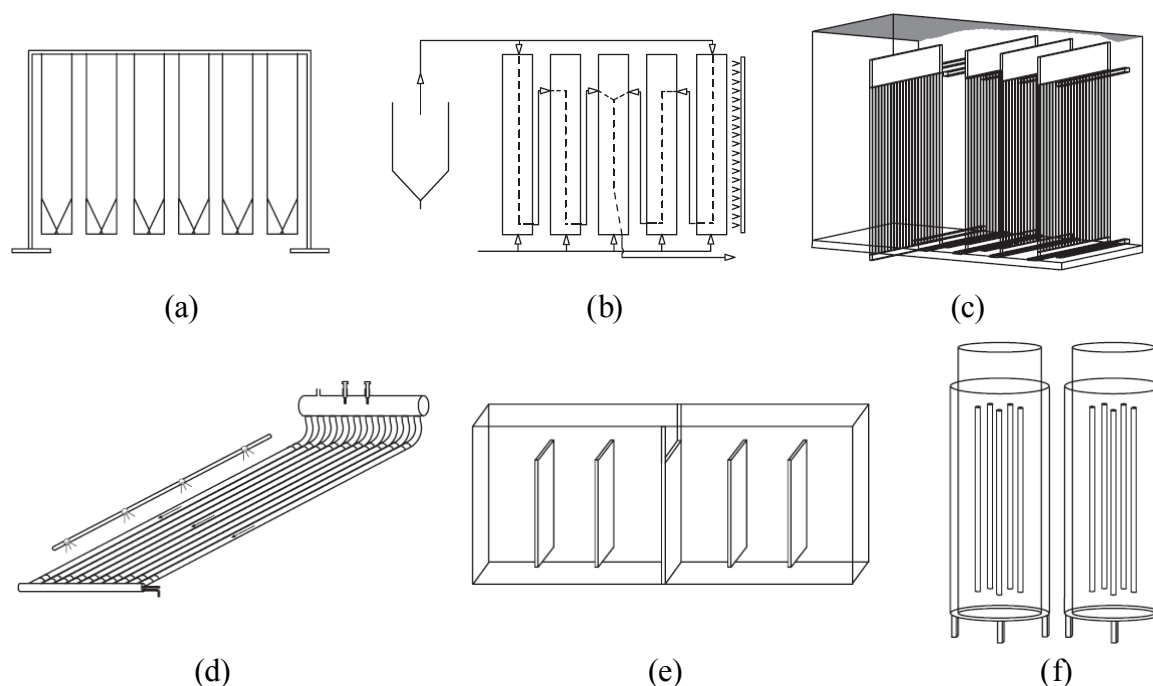


Figura 2.3: Alguns sistemas utilizados no cultivo de *Nannochloropsis oculata*. (a) Sacos de polietileno suspensos. (b) Fotobiorreatores *airlifts* cilíndricos. (c) Fotobiorreator modular alveolar. (d) Reator tubular quase horizontal. (e) Placas de vidro. (f) Reator cilíndrico anular. (Fonte: adaptado de ZITELLI, RODOLFI & TREDICI, 2004).

Três estudos importantes na determinação das variáveis e faixas de estudo dessa dissertação serão introduzidos a seguir. SHENG-YI *et al.* (2009) estudaram o efeito de diferentes concentrações de CO₂ na aeração de cultivos semicontínuos de *Nannochloropsis oculata*, avaliando o crescimento e o acúmulo de lipídios em um fotobiorreator cilíndrico de 30 cm de comprimento, 7 cm de diâmetro e 800 ml de volume de trabalho. Utilizou-se o meio f/2 modificado, com três vezes a concentração original de nutrientes traço e adição de tampão tris. Foram testadas concentrações de 2, 5, 10 e 15% de CO₂ na corrente de aeração, com taxa

de 0,25 v.v.m., ou seja, 200 ml de ar por minuto, temperatura de 26 ± 1 °C e iluminação contínua de $300 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ dada por lâmpadas fluorescentes.

Os melhores rendimentos em biomassa e lipídios foram verificados para concentração de 2% de CO₂ na corrente de aeração, com produtividade máxima em biomassa e lipídios de $0,480 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ e $0,142 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, respectivamente. Os cultivos semicontínuos foram mantidos por até doze dias. Além disso, os resultados mostram que concentrações de CO₂ de 5 a 15% podem inibir o crescimento algal e que o teor de lipídios em experimentos em batelada cresceu de 30,8% para 50,4% da fase logarítmica para a fase estacionária, indicando que o decréscimo na concentração de nitrogênio favoreceu o acúmulo de óleo. Para otimizar o rendimento de biomassa a longo prazo foi sugerido cultivar o micro-organismo em sistema semicontínuo aerado com 2% de CO₂ e substituição de metade do meio de cultivo todos os dias (SHENG-YI *et al.*, 2009).

CONVERTI *et al.* (2009) avaliaram a influência da temperatura e da concentração de nitrogênio no crescimento e acúmulo de lipídios de *Nannochloropsis oculata*. Os experimentos foram realizados em erlenmeyers de 2 l, com iluminação contínua de $70 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, meio f/2 e em regime de batelada, num período de 14 dias. As temperaturas avaliadas foram 15, 20 e 25 °C e as concentrações de nitrato testadas foram de 300, 150 e 75 mg.l⁻¹. A maior taxa de crescimento ocorreu em 20 °C e foi de $0,13 \text{ d}^{-1}$, e os maiores acúmulos de lipídios ocorreram em 15 e 25 °C. Porém, nessas temperaturas a produtividade foi menor, o que sugere que a produtividade final de lipídios foi independente da temperatura. Já a concentração de nitrogênio foi muito significativa, pois o acúmulo de lipídios dobrou quando a concentração de nitrato no meio foi reduzida 75% (300 para 75 mg.l⁻¹), chegando a 15,86%, embora o crescimento tenha permanecido praticamente inalterado.

Dos três estudos mencionados, destaca-se o realizado por SPOLAORE *et al.* (2006), que otimizaram o crescimento de *Nannochloropsis oculata* em fotobiorreator de coluna de bolhas utilizando metodologia de superfície de resposta, através de um planejamento fatorial fracionado com pontos centrais e pontos axiais. Foram avaliadas as influências da temperatura, intensidade luminosa, pH e taxa de aeração; as condições ótimas foram 21 °C, $52 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, pH 8,4 e 0,245 v.v.m de taxa de aeração, atingindo uma taxa de crescimento máxima de $0,86 \text{ d}^{-1}$. No estudo foi utilizado meio f/2 modificado, com o dobro das

concentrações originais de nitrato e fosfato, para evitar limitação por nutrientes, e adição de tampão, para manutenção do pH nas condições de estudo. O volume do fotobiorreator foi de 2,5 l e os experimentos foram realizados em regime de batelada. Para trabalhos futuros os autores recomendaram enriquecer as correntes de aeração das culturas com CO₂, tornando a composição das mesmas uma variável de estudo.

2.1.7 Meios de Cultivo

Diversas formulações de meios de cultura são propostas para contemplar as necessidades nutricionais das algas, o que é de fundamental importância para seu cultivo. Naturalmente, a água do mar contém cerca de 3,5% de substâncias dissolvidas, contando com aproximadamente 70 elementos químicos. Apesar de alguns elementos terem concentração tipicamente baixa, correspondendo a apenas 0,07% da massa de substâncias dissolvidas, eles são extremamente importantes para organismos marinhos. Os principais componentes necessários às microalgas se dividem em dois grupos: macro e micronutrientes (LOURENÇO, 2006).

Os macronutrientes apresentam funções bem distintas em algas marinhas, mas todas de grande importância, como constituir a estrutura de biomoléculas, membranas e do meio intracelular, participar de processos de troca de energia, regular atividades metabólicas, dentre outras funções importantes. Classificam-se como macronutrientes carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, silício e ferro. Quanto aos micronutrientes, sobretudo os metálicos, sua principal função é participar da estrutura e atividade de diversas enzimas; os principais micronutrientes são manganês, molibdênio, cobalto, boro, vanádio, zinco, cobre e selênio (LOURENÇO, 2006).

Além dos nutrientes citados, para cultivos densos, é usual adicionar aos meios de cultivo três vitaminas que apresentam funções importantes nas microalgas, que são a tiamina (B₁), biotina (H) e cianocobalamina (B₁₂). A tiamina tem função geral de agir como coenzima; a biotina atua como transportadora de CO₂, mas esta função é desempenhada também por outras enzimas algáceas; já o papel metabólico da cianocobalamina não está

suficientemente elucidado. É importante ainda a adição de agentes quelantes aos meios de cultivo para microalgas, para promover a solubilidade de alguns componentes, sendo o EDTA o agente mais usado atualmente. (LOURENÇO, 2006).

O CO₂ é altamente solúvel em água do mar e tende a se difundir do ar para a água continuamente, o que supre a necessidade das microalgas por fontes de carbono em frascos de até 500 ml e em cultivos com baixa densidade de células. Já em cultivos densos e/ou de grandes volumes é necessário aeração e em alguns casos o enriquecimento do ar com CO₂. Quando enriquecida, a aeração de fotobiorreatores com CO₂ ocorre geralmente em teores de 0,2 a 5%. Porém, o excesso desse gás pode provocar danos por meio da acidificação do meio de cultura. Se o meio de cultura tiver nitrato como fonte de nitrogênio, que promove a alcalinização do meio, a adição de CO₂ pode ser interessante. Por outro lado, a aeração e a própria densidade de células fotossintetizantes acarretam grande acúmulo de O₂ no sistema, que, se não removido, pode levar a danos foto-oxidativos que diminuem a produtividade do cultivo, pois promovem a quebra de moléculas orgânicas e formação de CO₂ sem ganhos de energia para o micro-organismo. (LOURENÇO).

Informações a respeito da infraestrutura necessária para o cultivo de microalgas estão apresentadas no Apêndice A Seção A.1.

2.2 Sistemas de Cultivo

Os sistemas atuais de produção de microalgas são baseados em lagoas abertas e em tecnologias de fotobiorreatores fechados. A viabilidade técnica de cada sistema é influenciada pelas propriedades intrínsecas das espécies de microalgas utilizadas, bem como as condições climáticas e os custos da terra e da água. O termo fotobiorreatores diz respeito a sistemas onde micro-organismos fotoautotróficos, como micróbios, algas ou células vegetais, são produzidos ou usados para realizar uma reação fotobiológica. Atualmente, a produção comercial de biomassa fotoautotrófica é limitada a poucas espécies cujas culturas são realizadas em lagoas abertas, muitas das quais não podem ser mantidas por tempos longos em função do risco de contaminação por fungos, bactérias e protozoários e pela competição com outras microalgas.

Ao contrário das lagoas abertas, os fotobiorreatores oferecem um ambiente protegido de precipitação direta, menos suscetível à contaminação e que possibilita melhor controle. Além disso, esses sistemas poderão permitir a exploração do potencial das mais de 100.000 espécies de microalgas conhecidas, que podem ser fontes interessantes de produtos de alto valor agregado (BRENNAN & OWENDE, 2010; OHSE *et al.*, 2007; TREDICI, 2004).

2.2.1 Sistemas Abertos

Mundialmente são produzidas cerca de 7.000 toneladas por ano de biomassa seca, produzidas majoritariamente em sistemas abertos, que consistem basicamente de áreas com grande superfície de contato com o ar, sendo cobertos ou não. Embora apresentem menor produtividade, sistemas abertos ainda são preferidos em função dos menores custos de instalação e manutenção (BOROWITZKA, 1999; BRENNAN & OWENDE, 2010; LOURENÇO, 2006; MENG *et al.*, 2009).

O material para construção de sistemas abertos varia desde materiais baratos, como areia, barro, tijolo ou cimento, até plásticos caros, como cloreto de polivinila, fibra de vidro ou poliuretano. Para cobertura, se utilizada, é feita com membranas plásticas de cloreto de polivinila e polietileno ou vidro. Embora a forma mais simples de cultivar microalgas seja a utilização de lagoas naturais com características apropriadas, os sistemas que mais se destacam são as lagoas do tipo *raceway*, construídas como tanques de “volta infinita”, onde a cultura é circulada por meio de pás giratórias; sistemas inclinados, onde a mistura é atingida por bombeamento e pela força da gravidade; lagoas circulares, onde a agitação é provida por um braço rotatório; e tanques com profundidade de mais de 30 centímetros (BOROWITZKA, 2005; TREDICI, 2004).

Os melhores exemplos de cultivo de microalgas em lagoas naturais são o cultivo de *Dunaliella salina* no México e na Austrália. Já os sistemas inclinados são utilizados na Bulgária para produzir espécies dos gêneros *Arthrospira* e *Scenedesmus* e para produzir *Chlorella* na Austrália. Lagoas circulares são utilizadas no Japão, Taiwan e Indonésia para cultivo de *Chlorella* e sistemas do tipo *raceways* são utilizados nos cultivos de *Arthrospira*

nos Estados Unidos e *Dunaliella salina* em Israel. Tanques são geralmente utilizados para produção em menor escala para gêneros utilizados na aquicultura, como a *Nannochloropsis oculata*. (BOROWITZKA, 2005; LOURENÇO, 2006; TREDICI, 2004). A Figura 2.4 ilustra a produção de microalgas em sistemas abertos.

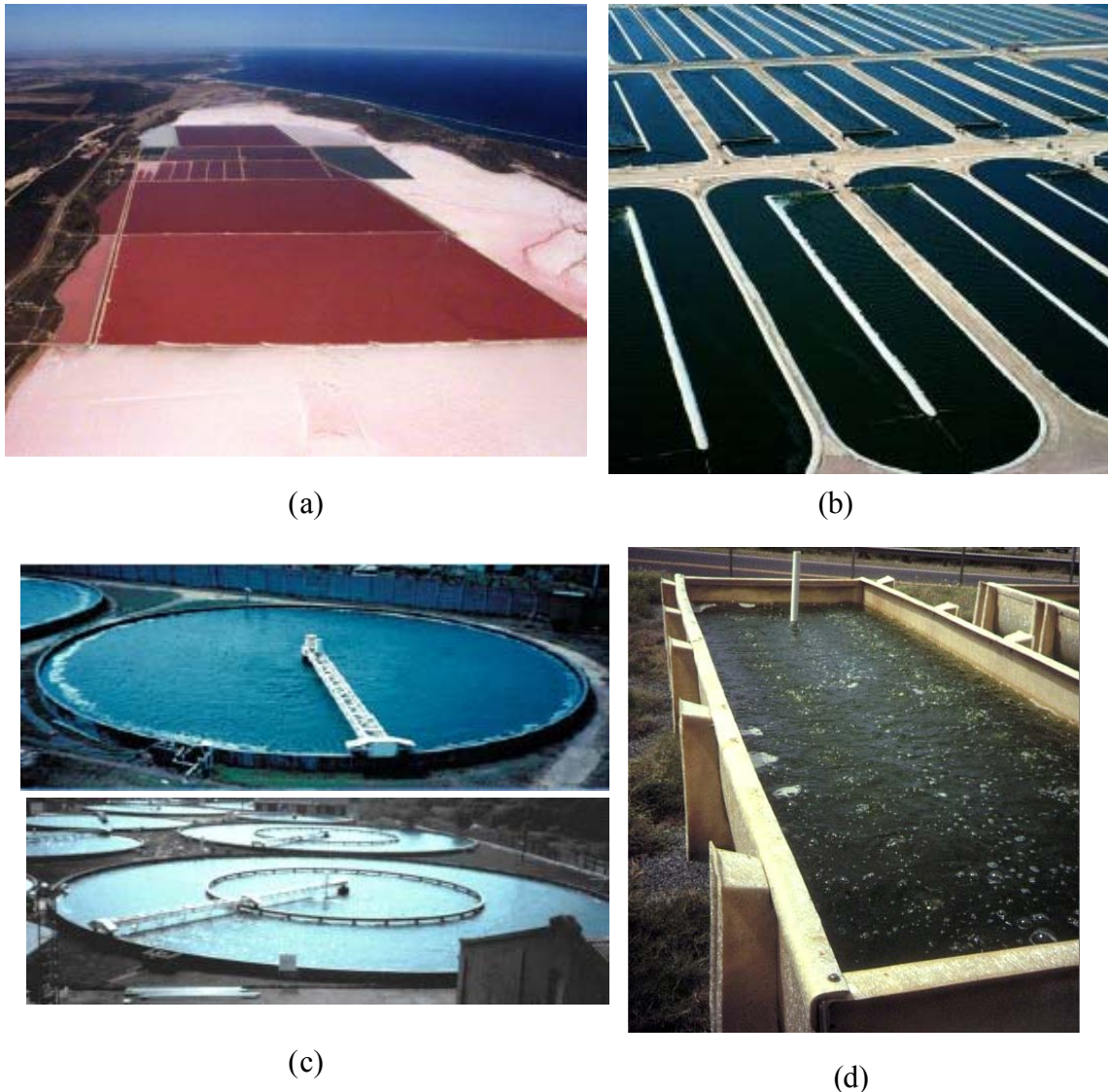


Figura 2.4: Alguns exemplos de sistemas abertos para produção de microalgas. (a) Produção de *Dunaliella salina* em lagoas abertas na Austrália. (b) Sistema *raceway*, cultivo de *Spirulina* nos EUA. (c) Lagoa circular para produção de *Chlorella* em Taiwan. (d) Produção de *Nannochloropsis* para aquicultura. (Fonte: BOROWITZKA, 2005; CHISTI 2007).

2.2.2 Sistemas Fechados

Embora os fotobiorreatores necessitem de mais investimento na sua construção e operação, há uma série de vantagens no uso desses sistemas: menores perdas de água por evaporação; redução dos problemas de contaminação por outros micro-organismos; maior facilidade na colheita de biomassa, que se concentra em menores volumes de cultura; controle maior das trocas gasosas entre o cultivo e o ar atmosférico ou gás de combustão; menor ocupação de espaço; maior rendimento por unidade de área e volume; possibilidade de obter cultivos com alto grau de pureza, dentre outros. (LOURENÇO, 2006; UGWU, AOYAGI & UCHIYAMA, 2008).

De acordo com a geometria, os fotobiorreatores podem ser classificados como planos ou tubulares; horizontais, inclinados, verticais ou espirais; e do tipo *manifold* ou serpentina. Esses sistemas podem ser de uma fase, preenchidos com meio e as trocas gasosas sendo efetuadas em um trocador de gases externo, ou de duas fases, no qual gás e líquido estão presentes no interior do reator, onde ocorrem as trocas gasosas. Os materiais para construção podem ser rígidos ou flexíveis, sendo comum o uso de vidro e plásticos (TREDICI, 2004). A Figura 2.5 exemplifica as principais geometrias utilizadas.

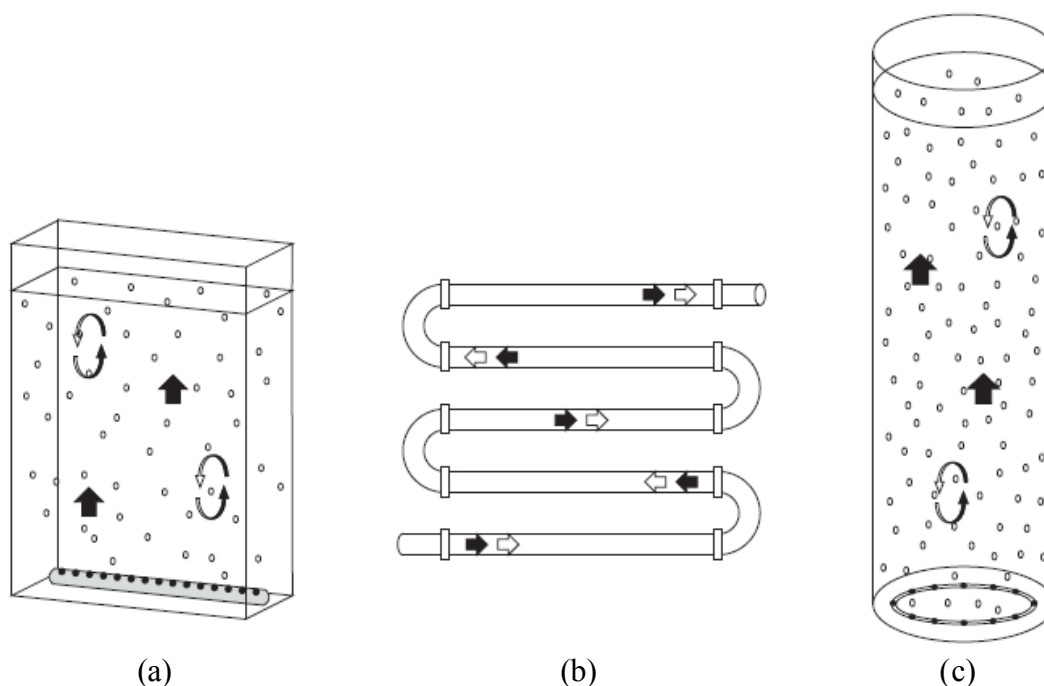


Figura 2.5: Geometrias comuns na construção de fotobiorreatores. (a) Plana. (b) Tubular. (c) Cilíndrica. (Fonte: adaptado de JACOBI, IVANOVA & POSTEN, 2010).

Os fotobiorreatores tubulares do tipo serpentina consistem de vários tubos retos transparentes conectados em série por conexões curvas em formato de “U” para formar um módulo plano que pode ser disposto vertical ou horizontalmente. As trocas gasosas e adição de nutrientes ocorrem em local separado, por meio de uma bomba ou de um dispositivo *airlift*. Já os fotobiorreatores tubulares do tipo *manifold* são construídos por uma série de tubos paralelos conectados nas extremidades por dois *manifolds*, um para distribuição e outro para a coleta de cultura. Em relação aos sistemas em serpentina, esse tipo de projeto é mais eficiente energeticamente no que diz respeito ao reciclo da cultura, pela ausência de curvaturas, que oferecem resistência ao movimento (TREDICI, 2004).

Tratando-se de geometria tubular, também se destacam os fotobiorreatores helicoidais, que consistem de tubos de pequeno diâmetro, geralmente flexíveis, enrolados ao redor de uma estrutura vertical. Há ainda fotobiorreatores cilíndricos verticais, que são sistemas simples, também chamados de reatores coluna, nos quais a mistura é alcançada pela injeção de ar comprimido (TREDICI, 2004).

Segundo LOURENÇO (2006), a maioria dos fotobiorreatores utilizados no mundo apresenta formato tubular ou cilíndrico, com disposição vertical ou horizontal dos tubos. Há pouco mais de vinte e cinco anos começaram a ser desenvolvidos fotobiorreatores planos, indicados como muito promissores no cultivo de microalgas, pois possibilitam utilizar eficientemente a energia solar, através do ajuste do ângulo e orientação de seus painéis. Borbulhamento de ar pode ser adotado para obter eficiência de mistura e promover trocas gasosas. Esses sistemas são utilizados com frequência em laboratório pela facilidade em medir a irradiância na sua superfície (LOURENÇO, 2006; TREDICI, 2004).

As variações mais comuns dos fotobiorreatores planos são as placas de vidro, nos quais a injeção de ar é realizada por meio de tubos perfurados dispostos horizontalmente na base e no meio do fotobiorreator, e os painéis planos alveolares, construídos de materiais comerciais como folhas de policloreto de vinila, policarbonato ou polimetilmetacrilato internamente divididas para formar canais na forma de alvéolos. Para recirculação da cultura são utilizadas bombas ou injeção de ar. A desvantagem dessa configuração está na propensão a vazamentos nas conexões coladas e também ao acúmulo nas paredes, o que pode causar danos às células. Quanto aos fotobiorreatores de placas de vidro, sua vantagem está na alta

transparência, facilidade de limpeza, resistência ao intemperismo e adaptabilidade do caminho óptico; porém, a fragilidade, custo e densidade do vidro podem desfavorecer o uso desse material. De maneira geral, devido a dificuldades no aumento de escala, os sistemas planos tem a desvantagem de muitas unidades serem necessárias para expandir a produção para escala comercial (TREDICI, 2004). A Tabela 2.4 traz de forma sucinta as principais vantagens e desvantagens dos principais sistemas discutidos até aqui.

Tabela 2.4: Comparação entre sistemas de produção de microalgas.

Vantagens	Limitações
Lagoas abertas e <i>raceways</i>	
Relativamente barato; fácil de limpar; utiliza terras não agriculturáveis; baixa demanda de energia; fácil manutenção; <i>stress</i> hidrodinâmico baixo.	Produtividade baixa, requer grandes áreas de terra; limitado a algumas espécies de microalgas; mistura, utilização de luz e CO ₂ pobres; culturas são facilmente contamináveis; apresenta altas taxas de evaporação; possibilita pouco controle das condições de cultura.
Fotobiorreatores tubulares	
Grande área de superfície iluminada; possibilita culturas em ambiente aberto; relativamente barato; produtividades razoáveis.	Acúmulo e crescimento de biomassa nas paredes; requer área grande; ocorrem gradientes de pH, O ₂ dissolvido e CO ₂ ao longo dos tubos.
Fotobiorreatores de colunas verticais	
Compacto; boa transferência de massa; baixo consumo de energia; boa mistura com baixo <i>stress</i> de cisalhamento; fácil de esterilizar; fotoinibição e fotooxidação reduzidas.	Pequena área de superfície iluminada, o que se agrava com o aumento de escala; caro comparado a sistemas abertos; construção requer materiais sofisticados; <i>stress</i> por cisalhamento.
Fotobiorreatores planos	
Alta produtividade; fácil de esterilizar; baixo acúmulo de O ₂ ; bom caminho óptico; grande área de superfície iluminada; possibilita culturas em ambiente aberto.	Aumento de escala requer muitos compartimentos e materiais de suporte; <i>stress</i> hidrodinâmico; pode ocorrer acúmulo nas paredes.

(Fontes: BRENNAN & OWENDE, 2010; MATA, MARTINS & CAETANO *et al.*, 2010; UGWU, AOYAGI & UCHIYAMA, 2008).

Independentemente da geometria, no projeto de fotobiorreatores uma série de fatores deve ser considerada a fim de promover alta produtividade volumétrica e eficiência de conversão de energia luminosa. Dentre os principais critérios que merecem atenção estão:

razão superfície-volume (relacionado ao caminho óptico), orientação e inclinação, dispositivos para mistura e trocas gasosas, sistemas para limpeza e para controle de pH, temperatura e intensidade luminosa, transparência e durabilidade do material de construção. Cabe destacar que os fotobiorreatores não podem ser projetados de modo a serem efetivos para todas as culturas em todas as condições, em função da alta diversidade que as microalgas apresentam; além disso, o sistema deve ser confiável, estável e ter boas razões custo benefício. (BEHRENS, 2005; TREDICI, 2004). A Figura 2.6 ilustra as interações que ocorrem em fotobiorreatores, evidenciando a dificuldade de otimização de tal equipamento.

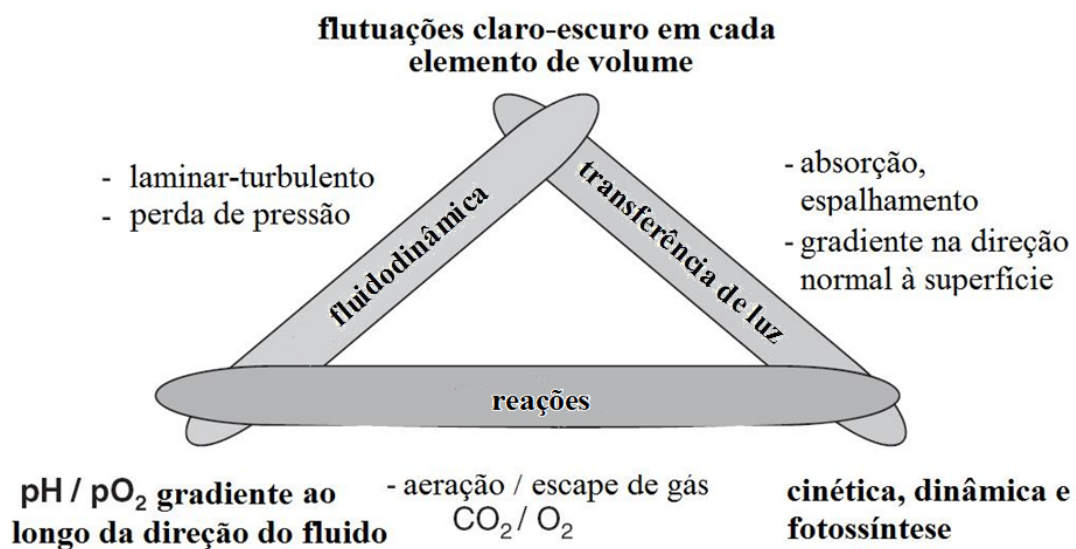


Figura 2.6: Interações entre fluidodinâmica, reações bioquímicas e transferência de luz em fotobiorreatores. (Fonte: adaptado de POSTEN, 2009).

A luz é o parâmetro mais importante na concepção e construção de um fotobiorreator com objetivos de alcançar alto crescimento e produtividade microalgal. Diretamente relacionada à absorção de luz está a razão superfície-volume de um fotobiorreator, em geral variando de 20 a 200 m⁻¹, contra 5 a 10 m⁻¹ em lagoas abertas. Quanto maior essa razão, geralmente maiores concentrações de células são atingidas, o que reduz os custos de colheita. Porém, em sistemas com alta razão superfície-volume, fatores como oxigênio dissolvido, absorção de CO₂, consumo de nutrientes e excreção de metabólitos sofrem alterações a altas taxas e podem ter efeitos negativos sobre a estabilidade da cultura, podendo tornar-se ineficientes para aumento para escala industrial. Outros aspectos importantes relacionados à absorção de luz são a orientação e inclinação; geralmente sistemas orientados para o sul e inclinados a fim de interceptar a radiação solar máxima apresentam maior produtividade

volumétrica, enquanto que sistemas dispostos verticalmente, de modo a “diluir” a radiação incidente, atingem maior eficiência de conversão dessa radiação solar. (BEHRENS, 2005; RICHMOND, 2004; TREDICI, 2004).

A mistura ou circulação nos fotobiorreatores é fundamental para trocas gasosas, através da quebra de gradientes de difusão na superfície da célula. Tão importante quanto fornecer CO₂ às células, para a realização da fotossíntese, é remover o O₂ gerado, pois seu excesso leva a danos fotooxidantes e aumento das taxas de respiração, ambos prejudiciais para a produtividade. Concentrações quatro ou cinco vezes o valor da saturação de O₂ do ar são tóxicos para a maioria dos micro-organismos autotróficos. Reatores coluna ou de placas planas com mistura promovida pela injeção de ar apresentam vantagem nesse aspecto. A mistura é importante também para impedir as células de sedimentar, evitar estratificação térmica, distribuir nutrientes e garantir que as células sejam submetidas a períodos adequadas de luz e de escuro. A escolha pelos dispositivos utilizados para promover a mistura e sua intensidade deve levar em consideração as características das microalgas que serão cultivadas. Aumentar a taxa de aeração a valores altos pode aumentar a produtividade, mas pode danificar as células pela alta turbulência e forças de cisalhamento (BEHRENS, 2005; TREDICI, 2004).

Segundo BEHRENS (2005), depois da intensidade luminosa e das concentrações de CO₂ e O₂, a temperatura e o pH são os parâmetros mais importantes para medir e controlar em fotobiorreatores. Para controle do pH é comum o uso de tampões, como tris e glicilglicina, e também a injeção de CO₂, utilizada industrialmente. Se o objetivo de determinado estudo for avaliar o efeito do pH no metabolismo de microalgas, a injeção de CO₂ pode não ser o melhor método para controlar essa variável, pois iria influenciar na disponibilidade de carbono para as células. Em fotobiorreatores em escala de laboratório, é adequado controlar a temperatura por meio de trocadores de calor, já em sistemas maiores, é comum o uso de arrefecimento por pulverização com água, que pode ser confiável e de custo efetivo em climas secos. Considerações econômicas favorecem o resfriamento evaporativo sobre o uso de trocadores de calor (BEHRENS, 2005; HARRISON & BERGES, 2005; SPOLAORE *et al.*, 2006; TREDICI, 2004).

Para construção de fotobiorreatores é ideal utilizar materiais de baixa toxicidade, alta transparência, alta resistência mecânica, alta durabilidade, estabilidade química e custo baixo. Na maioria dos projetos são utilizados vidro, ou acrílico, que não se prestam à esterilização a vapor. Além disso, a dimensão da maioria dos fotobiorreatores excede o que poderia ser acomodado em uma autoclave, por exemplo. Uma solução mais prática é sanitização com hipoclorito de sódio ao invés de esterilização. Outra opção eficiente seria a esterilização com ozônio, mas esse tipo de procedimento é caro e difícil de realizar sem o sistema apropriado. Bombas de ar, analisadores, e outros equipamentos podem ser mantidos livres de micro-organismos e algas e outras com o uso adequado de pré-filtros (BEHRENS, 2005; TREDICI, 2004).

Com poucas exceções, os projetos envolvendo plantas comerciais de fotobiorreatores adotam o sistema de *manifolds*. Segundo estudos realizados, à medida que o comprimento dos tubos aumenta parâmetros como pH e oxigênio dissolvido aumentam de forma prejudicial aos cultivos. Além do coeficiente global de transferência de massa (k_{La}) ser cerca de quatro vezes o valor verificado para um sistema em serpentina, nesses sistemas pneumáticos o fluxo gás-líquido é muito mais caótico, o que melhora a alternância de ciclo claro-escuro necessário à fotossíntese. Assim, esses sistemas sofrem menos inibição por oxigênio e fotoinibição (TREDICI, 2004).

Na pesquisa e desenvolvimento de fotobiorreatores a tendência aponta para o desenvolvimento de sistemas automatizados de agitação, aeração, colheita e filtração, mediante a instalação de sensores para avaliação da produtividade do cultivo. Outros parâmetros importantes como pH, oxigênio dissolvido, temperatura e concentração de CO₂ também são controláveis com sensores específicos. A automação dos sistemas vem contribuindo aos poucos para alcançar valores na ordem de 5 a 10 g.L⁻¹ de biomassa para várias espécies (LOURENÇO, 2006).

2.2.3 Fotobiorreatores *Airlift* e Coluna de Bolhas

A definição de reator *airlift* é atribuída a sistemas pneumáticos de contato gás-líquido

ou gás-líquido-sólido, caracterizados pela circulação de fluidos em um ciclo definido através de canais construídos para esse fim. O conteúdo do reator é pneumaticamente agitado por uma corrente de ar ou outros gases, o que facilita a transferência de massa entre o meio e a fase gasosa, evita sedimentação e favorece o contato entre as células e os nutrientes. A principal diferença entre *arlifts* e coluna de bolhas está no tipo de fluxo do fluido, que depende da geometria do sistema. (BRENNAN & OWENDE, 2010; MATA, MARTINS & CAETANO, 2010; MERCHUK & GLUZ, 2002).

No fotobiorreator de coluna de bolhas o gás é injetado na parte inferior, o que produz bolhas ascendentes e gera mistura aleatória. No *airlift*, a circulação do fluido é determinada pela concepção do fotobiorreator, que tem seções características. No *riser*, o gás é injetado na parte inferior e o fluxo de gás e líquido é principalmente ascendente. No *downcomer*, que é paralelo ao *riser*, o fluxo de gás é predominantemente descendente. Em operação, verifica-se uma motriz dada pela diferença de densidade entre as duas seções, o que gera um gradiente de pressão necessário para a recirculação. A base efetua a ligação entre o *riser* e o *downcomer*, e na grande maioria dos projetos de reatores *airlift* é muito simples. Esta seção pode influenciar na velocidade de líquido, no fluxo de sólidos, e na fração total de gás disperso no sistema (MERCHUK & GLUZ, 2002).

O separador de gases é a seção que conecta o *riser* ao *downcomer* pelo topo, facilitando a recirculação do líquido e o desprendimento de gases. Configurações que permitam um tempo de residência do gás que seja maior que o tempo necessário para as bolhas de ar se desprender minimizam a fração de gás recirculante no *downcomer*. Momento, transferência de massa e de calor serão diferentes em cada seção, mas a geometria de cada uma pode influenciar o desempenho das outras, já que as quatro estão interligadas (MERCHUK & GLUZ, 2002).

Os reatores *airlift* podem ser agrupados em dois tipos principais, os de circulação externa, no qual a circulação ocorre em canais separados e distintos, e os de circulação interna, no qual defletores são colocados estrategicamente no vaso para criação dos canais necessários à recirculação. Os projetos de ambos os tipos podem ser modificados, levando a variações na dinâmica dos fluidos, no desprendimento de gases e nas taxas de fluxo das várias fases. Em geral, enquanto o *gas holdup* (fração volumétrica de gás dissolvida na dispersão

gás-líquido) para coluna de bolhas e reatores *airlift* de tubos concêntricos com circulação interna tende a ser muito similar para situações idênticas, o *gas holdup* e o k_La para reatores de loop externo é normalmente menor (CHISTI, 1989; MERCHUK & GLUZ, 2002). A Figura 2.7 reúne alguns exemplos comuns de configuração de reatores *airlift* e das seções responsáveis pelo desprendimento de gases.

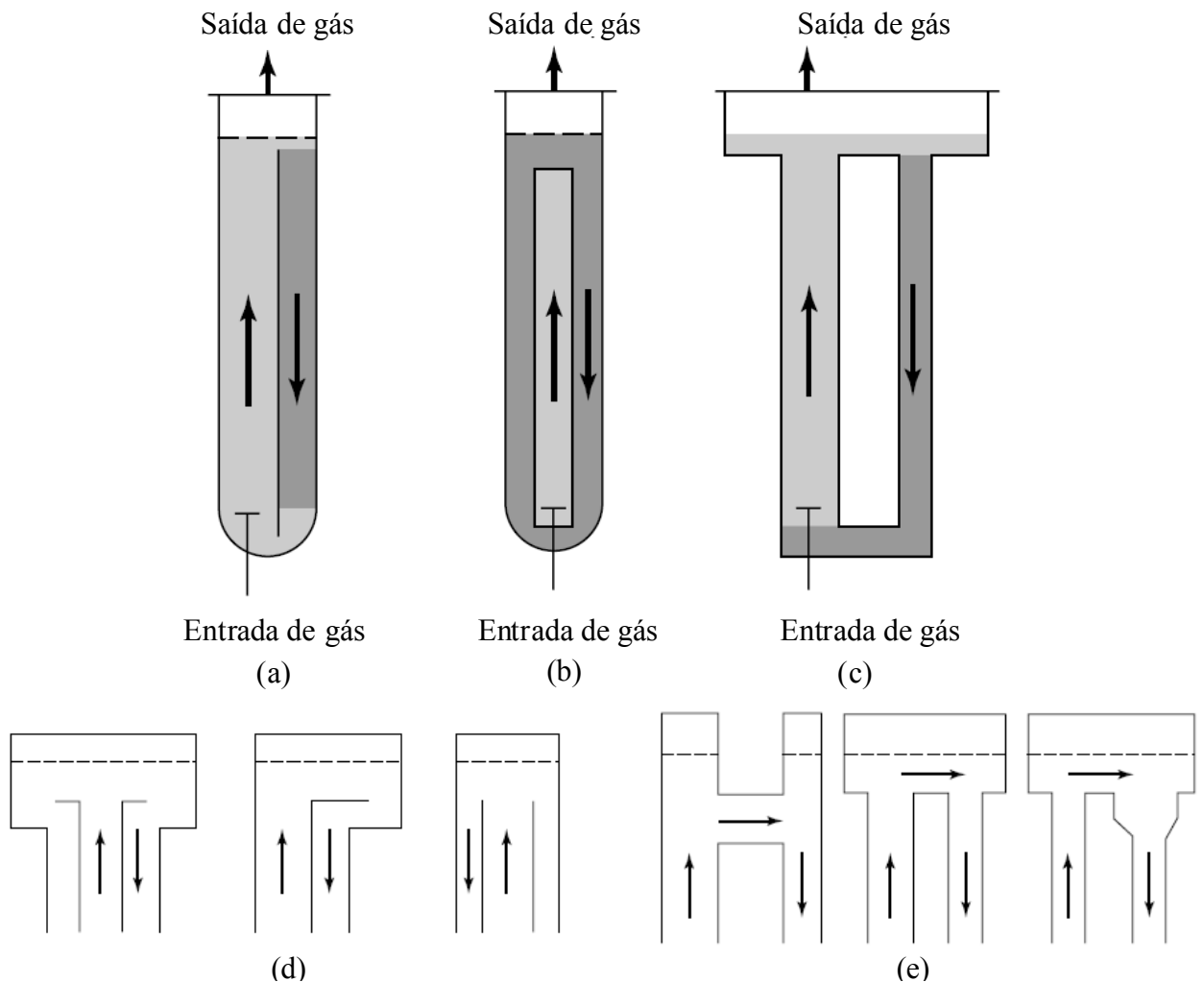


Figura 2.7: Configurações usuais para reatores *airlift*. (a) Circulação interna. (b) Circulação interna por tubos concêntricos. (c) Circulação externa. (d) Modelos de separadores de gases para *airlifts* de circulação interna. (e) Modelos de separadores de gases para *airlifts* de circulação externa. (Fonte: adaptado de MERCHUK & GLUZ, 2002).

Os reatores do tipo *airlift* são capazes de proporcionar as mesmas condições que fermentadores de tanque agitado convencionais, como interface gás-líquido para trocas gasosas, homogeneização para distribuição adequada de nutrientes e minimização de danos causados pela adição de ácidos ou bases para controle de pH. Possibilita também controle de

temperatura e um ambiente livre de contaminação. Uma das vantagens dos reatores *airlift* está associada à minimização das forças de cisalhamento em relação aos fermentadores convencionais, onde a energia é introduzida focalmente por meio de um agitador. A diferença de pressão entre o *riser* e o *downcomer*, ocasionada pelas diferentes frações gás-líquido nessas regiões, distribui as forças de cisalhamento, o que favorece bastante o crescimento de células sensíveis como as de vegetais e mamíferos (MERCHUK & GLUZ, 2002; TREDICI, 2004).

Além de apresentar mistura eficiente com baixa tensão de cisalhamento, outras boas perspectivas para fotobiorreatores *airlift* e coluna de bolhas incluem sua transferência de massa alta, classificadas entre as maiores entre sistemas agitados e o baixo consumo de energia. Isso deve ser contrabalançado com suas desvantagens, que incluem a exigência de um volume mínimo de líquido para seu funcionamento, que permita a comunicação entre *riser* e *downcomer*, seu custo e sua escalabilidade. No caso específico da produção de microalgas, uma vez que o diâmetro e altura não podem ser muito maiores em função da absorção de luz e trocas gasosas, um grande número de unidades seria necessário para construção de uma planta comercial, por exemplo. (MATA, MARTINS & CAETANO, 2010; MERCHUK & GLUZ, 2002).

O comportamento hidrodinâmico de reatores de coluna de bolhas e reatores *airlift* é muito diferente. A principal diferença é que nos reatores *airlift* a taxa de circulação do líquido depende e é determinada pela taxa de fluxo de gás, enquanto que nos fotobiorreatores de colunas de bolhas o fluxo de líquido é independente do fluxo de gás. A possível faixa de operação de reatores *airlift* em termos velocidades superficiais de gás e líquidos é mais ampla do que para reatores de coluna de bolhas (CHISTI, 1989).

2.3 Colheita e Processamento de Biomassa de Microalgas

A recuperação da biomassa de microalgas, que geralmente requer uma ou mais fases de separação de líquidos e sólidos, é uma fase desafiadora do processo de produção de biomassa de algas, e corresponde a uma porcentagem entre 20 ou 30% dos custos totais de

produção. Os processos envolvidos incluem floculação, filtração, flotação e centrifugação, alguns dos quais requerem bastante energia. Densidades celulares baixas (normalmente na faixa de 0,3 a 5 g.l⁻¹) e o pequeno tamanho de algumas células de microalgas tornam a recuperação da biomassa difícil. A seleção de tecnologia de colheita é fundamental para a produção econômica de biomassa de microalgas. A seleção de espécies mais fáceis de colher é necessária, como por exemplo a de *Spirulina*, que tem formato de espiral e tamanho entre 20 e 100 µm de comprimento (GRIMA *et al.*, 2003; BRENNAN & OWENDE, 2010).

A escolha da técnica de colheita é dependente das características das microalgas, como por exemplo tamanho, densidade e valor dos produtos alvo. Geralmente, a colheita de microalgas é um processo de dois estágios, envolvendo (GRIMA *et al.*, 2003; BRENNAN & OWENDE, 2010):

- a) Colheita da biomassa: visa a separação da biomassa da suspensão. Os fatores de concentração para esta operação são geralmente de 100 a 800 vezes para chegar a 2-7% de matéria sólida total. Isso vai depender da concentração inicial de biomassa e tecnologias utilizadas, incluindo flotação, floculação, ou sedimentação por gravidade.
- b) Concentração: o objetivo é concentrar a cultura por meio de técnicas como a centrifugação, filtração e agregação por ultrassom, por isso, geralmente é uma etapa mais intensiva de energia do que a colheita de biomassa.

Concentrados algáceos (tipicamente com 5 a 15% de sólidos secos) são perecíveis e devem ser tratados rapidamente após a colheita; desidratação ou secagem são comumente usadas para estender sua vida viabilidade, dependendo do produto final requerido. Os métodos que têm sido usados incluem a secagem ao sol, secagem em prateleira em baixas pressões, secagem em prateleira, secagem em tambor, secagem em leito fluidizado, liofilização e tecnologia de secagem *Refractance Window*TM (GRIMA *et al.*, 2003; BRENNAN & OWENDE, 2010).

Secagem ao sol é o método mais barato de desidratação, mas as principais desvantagens incluem longos tempos de secagem, a exigência de grandes superfícies de secagem e o risco de perda de material. Secagem em prateleira é comumente usado para a

extração de produtos de alto valor, mas é relativamente caro e pode causar uma deterioração significativa de pigmentos naturais de algas. A liofilização é igualmente cara, especialmente para operações de grande escala, mas facilita a extração de óleos. Elementos intracelulares, tais como óleos, são difíceis de extrair a partir da biomassa úmida com solventes, sem rompimento celular, mas são extraídos mais facilmente a partir da biomassa liofilizada (GRIMA *et al.*, 2003; BRENNAN & OWENDE, 2010).

Para extração de componentes como lipídios, por exemplo, geralmente a extração é realizada por meio de solventes orgânicos. Alguns processos podem facilitar a extração, como a extração enzimática, que utiliza enzimas para degradar a parede celular. Efeito semelhante pode ser promovido por um choque osmótico, ou seja, uma redução brusca da pressão osmótica pode levar as células em uma solução de ruptura. Alternativamente à extração com solventes orgânicos, pode-se utilizar fluido supercrítico, onde CO₂ é liquefeito sob pressão e aquecido até o ponto que tem as propriedades de um líquido e gás, agindo como solvente na extração do óleo (AMIN *et al.*, 2009).

As tecnologias de conversão para a utilização energética de biomassa de microalgas podem ser separadas em químicas, termoquímicas e biológicas. Fatores que influenciam a escolha do processo de conversão incluem o tipo e a quantidade de matéria-prima da biomassa, a forma desejada de energia, aspectos econômicos, projeto específico e a forma final desejada do produto (BRENNAN & OWENDE, 2010).

A conversão termoquímica geralmente abrange a decomposição térmica do material orgânico constituinte da biomassa para produção de produtos combustíveis e é alcançável por diferentes processos como gaseificação, liquefação, pirólise, combustão direta e hidrogenação. Os processos biológicos de transformação de energia de biomassa em outros combustíveis incluem a digestão anaeróbia, fermentação alcoólica e produção de hidrogênio fotobiológica (GRIMA *et al.*, 2003; BRENNAN & OWENDE, 2010). O fluxograma da Figura 2.8 apresenta os principais métodos de processamento de microalgas para fins energéticos e os respectivos produtos majoritários formados.

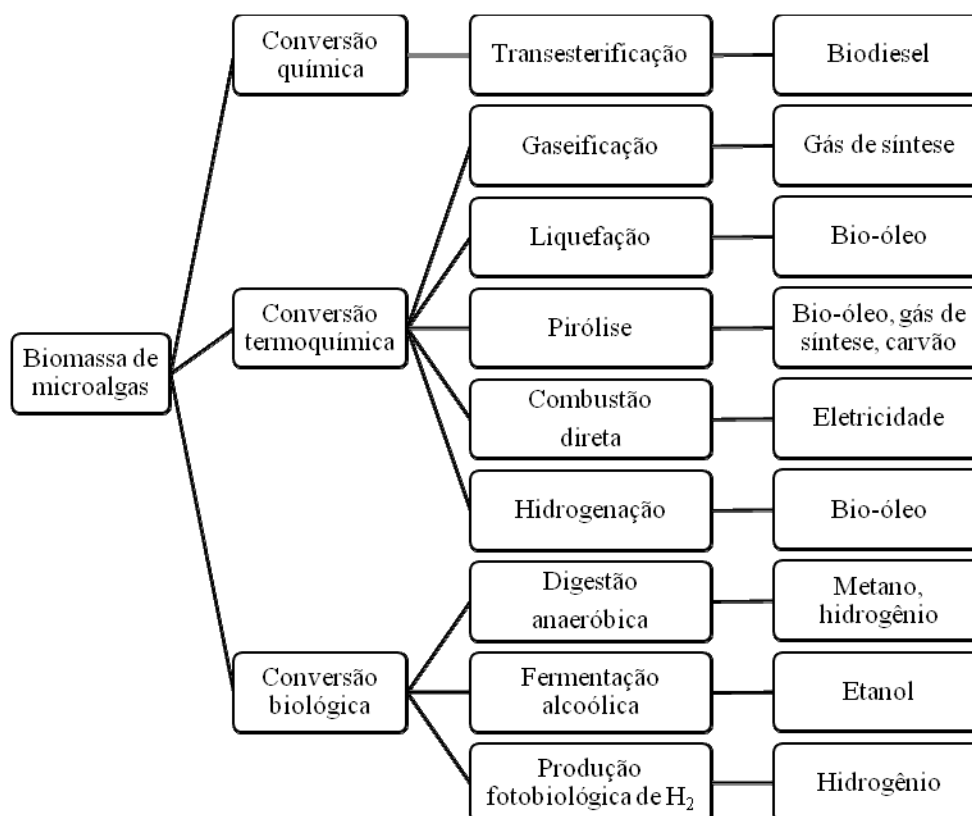


Figura 2.8: Processos utilizados no processamento de biomassa algácea. (Fonte: adaptado de AMIN *et al.*, 2009; BRENNAN & OWENDE, 2010).

Na conversão química destaca-se a transesterificação do óleo de microalgas, que requer, portanto, etapas prévias de extração do mesmo. Na transesterificação, é obtido biodiesel, a partir da conversão de triglicerídios na presença de álcool (geralmente metílico) e um catalisador (ácido ou base). Esta aplicação é o objetivo de muitas das pesquisas atuais relacionadas à produção de energia a partir de microalgas. Para o biodiesel de algas ser aceito em substituição a combustíveis fósseis, as suas propriedades devem ser iguais ou exceder o Padrão Internacional de Biodiesel para Veículos (EN14214). Óleos de algas contêm um alto grau de ácidos graxos poliinsaturados quando comparados aos óleos vegetais, o que o torna suscetível à oxidação em armazenamento e limitam sua utilização. No entanto, o biodiesel de algas possui características físicas e químicas semelhantes ao diesel de petróleo, ao biodiesel de primeira geração a partir de culturas oleaginosas (AMIN *et al.*, 2009; BRENNAN & OWENDE, 2010).

O biodiesel de algas tem várias vantagens sobre o diesel de petróleo: é derivado de biomassa e, portanto, é renovável; é biodegradável; é atóxico e contém níveis reduzidos de partículas, monóxido de carbono, fuligem, hidrocarbonetos e SOx. Comparado à primeira

geração de biodiesel (proveniente de óleos vegetais) o biodiesel de algas é mais adequado para uso na indústria de aviação, onde os pontos de congelamento e baixa densidade de alta energia são critérios fundamentais. Outra grande vantagem do biodiesel de algas é de redução das emissões de CO₂ em até 78% em comparação com as emissões de diesel de petróleo. A grande limitação do uso de biodiesel de microalgas está relacionada aos custos, que atualmente não são competitivos (BRENNAN & OWENDE, 2010).

2.4 Delineamento Composto Central Rotacional

Em muitas áreas do conhecimento, quando se está iniciando o estudo de determinado sistema ou processo, é comum a utilização de estratégias de otimização por meio de experimentos. É incontestável que a utilização de um estudo de planejamento fatorial reduz ensaios, custos e melhora a qualidade de informações quando comparado a uma metodologia que avalie somente uma variável por vez, principalmente se for realizado explorando todo espaço experimental através de um delineamento composto central rotacional. Antes de definir o procedimento experimental mais adequado, deve-se conhecer o máximo possível sobre o processo estudado, para a escolha correta das variáveis de investigação, suas faixas de estudo e as respostas de interesse. Além disso, a escolha do planejamento adequado passa pelo número de variáveis independentes e da viabilidade do número de ensaios que podem ser realizados, pois há um número mínimo de experimentos requeridos para que a discussão de resultados e a interpretação estatística não fiquem comprometidas. No caso de duas ou três variáveis independentes, é recomendado não realizar um planejamento fatorial fracionado e sim um delineamento composto central rotacional completo (RODRIGUES & IEMMA, 2009).

Um problema potencial no uso de planejamentos fatoriais de dois níveis é a suposição de linearidade dos fatores e naturalmente, mesmo que a linearidade não seja perfeita, o sistema poderá ser representado de forma aproximada. A inserção de termos de interação aos efeitos principais ou de primeira ordem contribui na representação de curvaturas, mas em alguns casos é necessária ainda a inserção de fatores quadráticos ou de segunda ordem,

resultando na Equação genérica 2.8, chamada modelo de superfície de resposta de segunda ordem

$$y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum_{i<j} \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_j^2 + \varepsilon \quad (2.8)$$

onde y representa a variável dependente, os termos β representam os coeficientes de regressão, os termos x representam as variáveis independentes respectivas, ε representa o erro, e as parcelas $\sum_{j=1}^k \beta_j x_j$, $\sum_{i<j} \beta_{ij} x_i x_j$, $\sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_j^2$ representam os termos relacionados aos efeitos de primeira ordem, interação e segunda ordem, respectivamente (MONTGOMERY, 2001).

Para o caso de três variáveis independentes, para avaliar dez efeitos, conforme a Equação 2.9, é necessária a realização de dezessete ensaios, oito ensaios representados pelos vértices do cubo da Figura 2.9, seis ensaios nos pontos axiais e três ensaios repetidos no ponto central. A adição de pontos centrais a um planejamento fatorial 2^k convencional permite, além de uma estimativa independente do erro a ser obtido, avaliar a hipótese de linearidade da região em estudo. Uma razão importante para fazer repetições no ponto central é que eles não afetam a estimativa usual dos efeitos em um planejamento 2^k . Ainda, a inclusão de pontos axiais aumenta o número de pontos independentes no experimento, aumentando os graus de liberdade e permitindo o cálculo de todos os efeitos desejados, lineares, de interação e quadráticos. Se um planejamento fatorial 5^3 fosse utilizado nesse caso, seriam necessários cento e vinte e cinco testes para testar todas as combinações, o que seria demorado, de custo muito alto e desnecessário; além disso, nenhuma informação a respeito da reprodutibilidade do processo estaria disponível sem fazer experimentos adicionais (MONTGOMERY, 2001).

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 \quad (2.9)$$

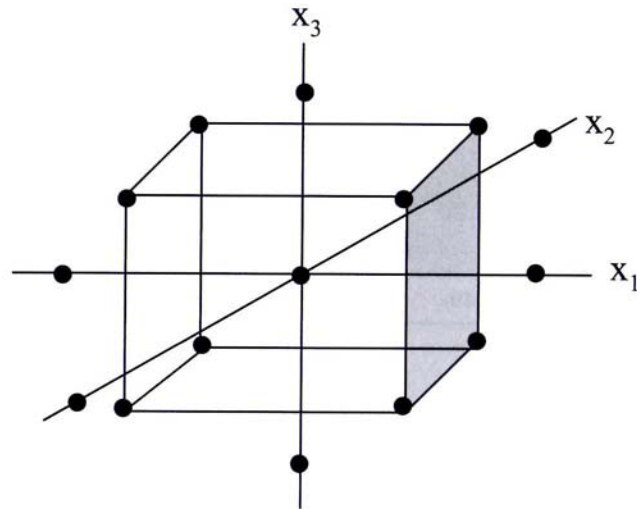


Figura 2.9: Delineamento composto central para três variáveis de estudo. (Fonte: RODRIGUES & IEMMA, 2009).

Capítulo 3

Materiais e Métodos

Neste capítulo serão apresentados os materiais e métodos utilizados na realização desse trabalho, detalhando a infraestrutura utilizada no Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a concepção e montagem da planta laboratorial que possibilitou o estudo, e as análises realizadas.

3.1 Material de Laboratório, Esterilização, Manipulação e Armazenamento

A vidraria utilizada na manutenção e preparação dos inóculos de *Nannochloropsis oculata* consistiu basicamente de erlenmeyers, frascos para armazenamento, tubos de ensaio, béqueres, pipetas de Pasteur de vidro, pipetas reguláveis, ponteiras, dentre outros. Como tampas de erlenmeyers foram utilizadas buchas feitas de algodão hidrófobo e ataduras de crepom, cobertas com folhas de papel alumínio até sua utilização. Todo material de vidro utilizado foi devidamente lavado, enxaguado com água destilada e esterilizado em a 121 °C, 2 bar, por 30 min, salvo materiais que não permitiam a esterilização em função do material ou tamanho, que serão mencionados no momento oportuno. Quanto às soluções estoque utilizadas na preparação do meio de cultivo, foram igualmente autoclavadas, com exceção da

solução de vitaminas, que foi esterilizada por meio de filtros com poros de 0,22 μm para evitar degradação térmica (HARRISON & BERGES, 2005).

A manipulação dos inóculos, soluções, meios de cultivo e vidraria esterilizadas ocorreu, sempre que possível, dentro de uma capela de fluxo laminar vertical dotada de sistema de filtração de ar e lâmpadas com radiação UV (detalhes da operação da autoclave e capela de fluxo laminar no Apêndice A Seções A.2 e A.3). As soluções estoque foram armazenadas em refrigerador (8 °C), com exceção das vitaminas, que foram congeladas (-18 °C) para utilização conforme a demanda. (KAWACHI & NOEL, 2005).

3.2 Meio de Cultura

O meio de cultura f/2, largamente utilizado em pesquisas com microalgas marinhas, foi utilizado para manutenção do banco de células, preparação de inóculos e também nos experimentos. Para o preparo do meio de cultivo foi utilizada sempre água destilada. Os reagentes utilizados e a composição padrão do meio f/2 podem ser visualizados na Tabela 3.1. Detalhes da preparação de soluções estoque e dos reagentes utilizados podem ser vistos no Apêndice A Seções A.4.1 e A.5. O pH final do meio preparado dessa forma foi de 8,2, dado por um medidor de pH de bancada. Já a salinidade do meio foi de $33 \pm 1 \text{ g.l}^{-1}$, medida com um refratômetro apropriado.

Tabela 3.1: Composição do meio f/2.

Solução (volume no meio final)	Reagente utilizado	Concentração solução estoque	Concentração meio f/2	
Solução salina (1000 ml)	Sal marinho	33,3 g.l ⁻¹	33 ± 1 g.l ⁻¹	
Nitrato (1 ml)	NaNO ₃	75 g.l ⁻¹	75 mg.l ⁻¹	
Fosfato (1 ml)	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	5 g.l ⁻¹	5 mg.l ⁻¹	
Silicato (1 ml)	Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	30 g.l ⁻¹	30 mg.l ⁻¹	
Soluções estoque	CuSO ₄ .5H ₂ O	9,8 mg.l ⁻¹	9,8 µg.l ⁻¹	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	22,2 mg.l ⁻¹	22,2 µg.l ⁻¹	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	10 mg.l ⁻¹	10 µg.l ⁻¹	
	Metais-traço (1 ml)	MnCl ₂ .4H ₂ O	180 mg.l ⁻¹	180 µg.l ⁻¹
		Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	6,3 mg.l ⁻¹	6,3 µg.l ⁻¹
		FeCl ₃ .6H ₂ O	3,15 g.l ⁻¹	3,15 mg.l ⁻¹
		Na ₂ EDTA	4,36 g.l ⁻¹	4,36 mg.l ⁻¹
Vitaminas (1 ml)	Tiamina (B ₁)	100 mg.l ⁻¹	100 µg.l ⁻¹	
	Cianocobalamina (B ₁₂)	0,5 mg.l ⁻¹	0,5 µg.l ⁻¹	
	Biotina (B ₇)	0,5 mg.l ⁻¹	0,5 µg.l ⁻¹	

Fonte: (GUILLARD, 1975 apud LOURENÇO, 2006).

3.3 Manutenção do Banco de Células de *Nannochloropsis oculata*

A cepa da microalga *Nannochloropsis oculata* utilizada nesse estudo foi cedida pelo Laboratório de Ecologia de Fitoplâncton e Microrganismos Marinhos, da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). A manutenção do banco de células dos inóculos foi realizada em uma incubadora dotada de controle de temperatura e fotoperíodo, construída no laboratório a partir dos seguintes itens: um refrigerador; um aquecedor termoventilador; um controlador e indicador de temperatura; quatro lâmpadas fluorescentes; um compressor, um temporizador para controle de fotoperíodo; e um rotâmetro de ar. A câmara incubadora montada pode ser vista no Apêndice A Seção A.6.

Para manutenção de um banco de células, independente dos inóculos preparados para experimentos, foram adotados dois procedimentos:

- a) Repicagem em tubos de ensaio de 20 ml (volume útil de 10 ml): temperatura de 25 ± 1 °C, fotoperíodo de 12 h: 12 h luz/escuro e luminosidade média de 5170 ± 650 lux, dependendo da localização dos tubos na incubadora. Foram mantidos sempre três tubos, cada um representando uma geração dada por repicagens com intervalo entre 10 a 15 dias, isto é, o primeiro tubo gerou o segundo, que gerou o terceiro, e assim sucessivamente. Cada repicagem foi realizada na proporção de 1:10 (1 ml da cultura antecessora para 9 ml de meio de cultura novo). Os tubos foram agitados suavemente de forma manual uma vez ao dia.

- b) Repicagem em erlenmeyers de 1000 ml (volume útil de 400 ml): temperatura de 25 ± 1 °C, fotoperíodo de 12 h: 12 h luz/escuro, luminosidade média de 3810 ± 400 , dependendo da localização dos recipientes na incubadora. Foram mantidos sempre três erlenmeyers, cada um representando uma geração dada por repicagens com intervalo entre 10 a 15 dias. Ao contrário dos tubos, um primeiro inóculo deu origem aos três sistemas e cada um foi repicado independentemente para erlenmeyers de igual volume nos procedimentos seguintes. Cada repicagem foi realizada na proporção de 1:10 (40 ml da cultura antecessora para 360 ml de meio de cultura novo). Os erlenmeyers foram agitados suavemente de forma manual uma vez ao dia.

Para gerar os inóculos utilizados nos experimentos, diferentes procedimentos foram adotados de acordo com as variáveis estudadas nos Experimentos 1 e 2, por isso a metodologia utilizada será descrita nas Seções 3.6.1 e 3.6.2.

3.4 Fotobiorreator *Airlift* Utilizado nos Experimentos

O modelo de fotobiorreator *airlift* de circulação interna utilizado nesse estudo foi construído em acrílico transparente, apresenta formato retangular e tem as dimensões especificadas na Figura 3.1, com volume útil médio de 3195 ± 54 ml cada. A aeração do sistema é feita por duas pedras porosas situadas na parte inferior do *riser*. Já a troca térmica do sistema é promovida pelo bombeamento de uma corrente de água através de tubos de aço inox 316 localizados no *downcomer* do fotobiorreator. Para coleta de amostras, há um orifício

na tampa do fotobiorreator. Para saída de gás há um pequeno condensador em formato de balão, para evitar perda de líquido por arraste, adaptado após testes iniciais onde houve problemas nesse sentido, conforme será discutido no próximo Capítulo.

Para fins de caracterização do potencial de transferência de massa do fotobiorreator em estudo, foi determinado seu coeficiente volumétrico de transferência de massa da fase líquida ($k_L a$) através do método dinâmico, detalhado na Seção 3.9. A determinação foi realizada na temperatura de 19 °C, a menor da faixa de estudo utilizada nessa dissertação, e nas vazões de ar (500, 750, 1000 ml.min⁻¹), com determinações em duplicata. Para isso foi utilizado um medidor de oxigênio dissolvido (célula polarográfica de Clark). Após sua calibração, todo o oxigênio dissolvido no líquido foi retirado através da injeção de N₂ gasoso por alguns minutos. Em seguida, foi retomada a aeração do sistema na condição desejada e os dados de concentração de O₂ dissolvido foram coletadas de cinco em cinco segundos pela saída RS-232 do oxímetro (CHISTI, 1989; RECH, 2003).

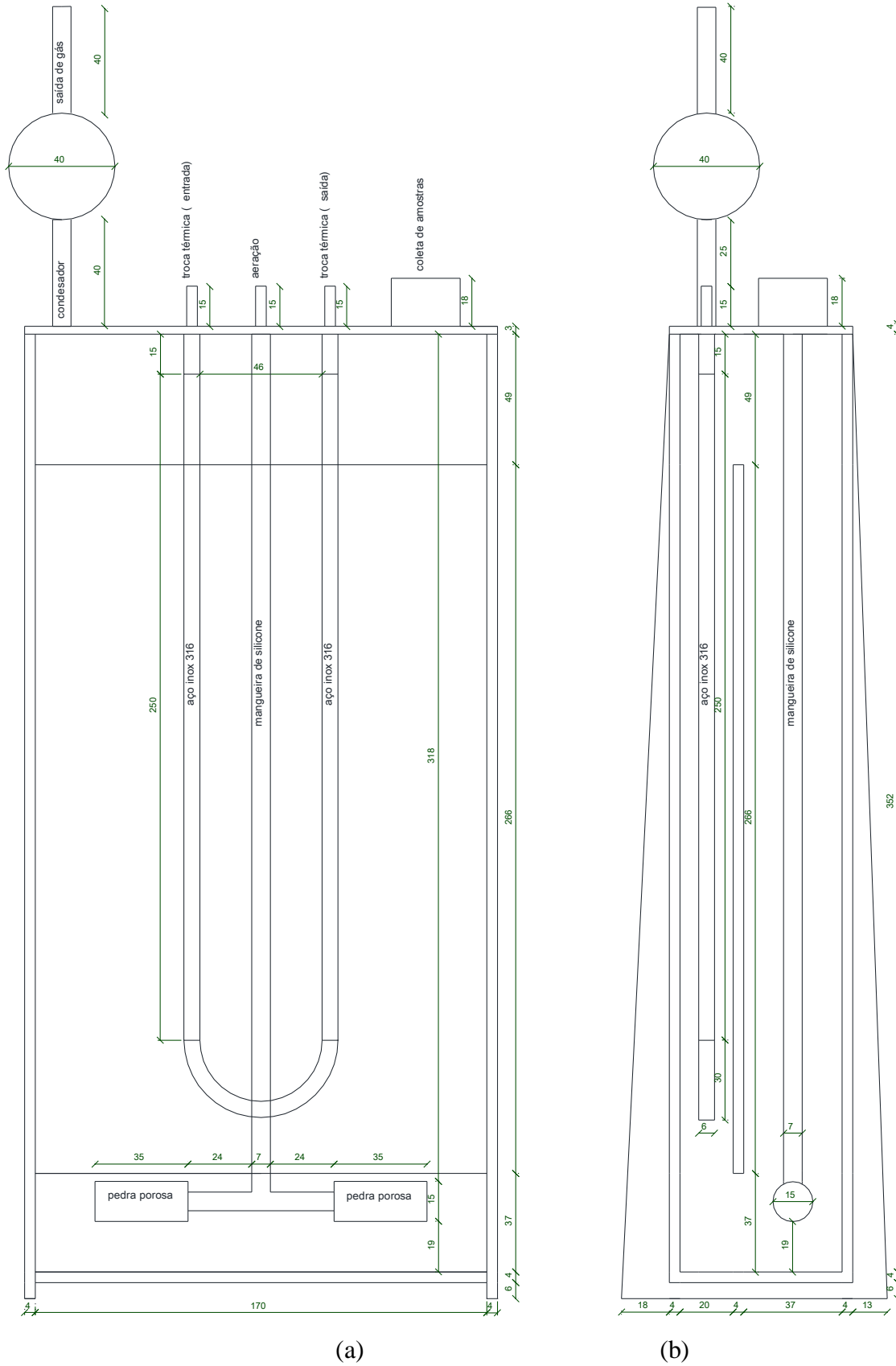
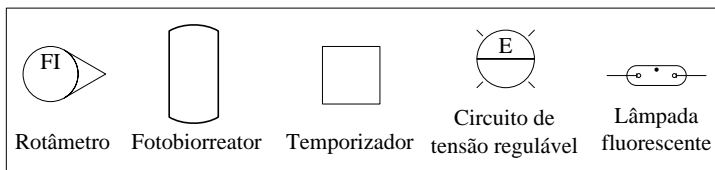


Figura 3.1: Fotobiorreator *airlift* plano de circulação interna utilizado nesse estudo. (a) Vista frontal. (b) Vista lateral. As dimensões cotadas estão na escala de milímetros.

3.5 Montagem e Operação da Planta de Fotobiorreatores

Os experimentos com microalgas em geral necessitam de dias de observação, ao contrário de outros micro-organismos como bactérias e leveduras, que levam horas para serem concluídos. O objetivo desse trabalho contempla um planejamento experimental que necessitaria de no mínimo uma dezena de experimentos para ser concretizado. Com o objetivo de minimizar o tempo de realização dos experimentos, uma planta com doze fotobiorreatores foi construída, que possibilita a realização de um delineamento composto central rotacional completo com três variáveis em apenas duas bateladas.

A concepção da planta permite, num primeiro momento, que as variáveis citadas a seguir apresentem três valores (ou níveis) diferentes numa mesma batelada de experimentos: concentração de CO₂ na corrente de aeração, temperatura e intensidade luminosa (ou fotoperíodo). Além disso, outras variáveis como vazão da corrente de aeração e concentração de nutrientes podem ser fixadas individualmente em cada fotobiorreator. A Figura 3.2 traz uma representação esquemática e algumas imagens da planta, que possui três prateleiras de aço de 120 cm de comprimento, 40 cm de largura e 69,5 cm de altura, podendo comportar até seis fotobiorreatores em cada uma delas.



(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 3.2: Planta de fotobiorreatores. (a) Representação esquemática de uma das prateleiras. (b) Painel de controle. (c) Em operação nos experimentos com microalgas. (d) Em operação somente com água.

Para aeração dos fotobiorreatores foram utilizados compressores de ar e um cilindro de CO₂ industrial (Figura 3.3). Para medir a vazão das correntes de ar e CO₂ relativas a cada composição planejada, e também as vazões respectivas a cada fotobiorreator foram utilizados rotômetros de ar de 100, 250, 500 (CO₂) e 2500 ml (ar), respectivamente. Para otimizar e

confirmar a eficiência das misturas nas composições desejadas, foi adotada a recalibração dos rotâmetros através de um bolhômetro e por um medidor digital de fluxo (resultados no Apêndice A Seção A.7). Além disso, as misturas de ar e CO₂ analisadas em um cromatógrafo gasoso com detector de condutividade térmica, utilizando uma coluna Porapack Q (12 pés de comprimento) a 60 °C, hélio como gás de arraste e temperatura do injetor de 100°C. Amostras de 600 µl de cada uma das misturas foram coletadas e analisadas considerado fatores de resposta, cujos dados serão posteriormente apresentados no Apêndice B.

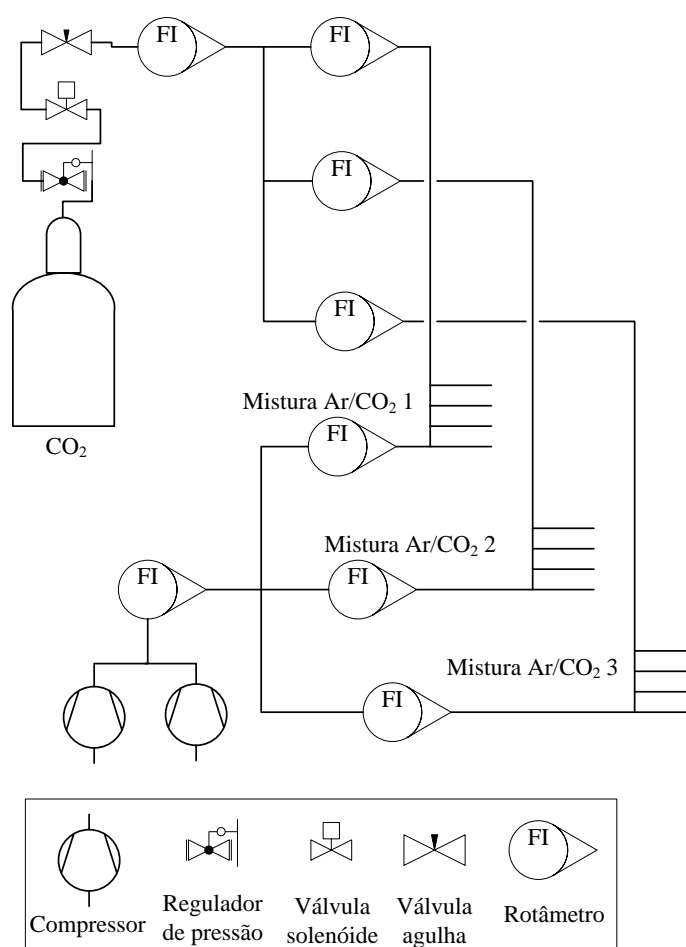


Figura 3.3: Representação esquemática do sistema de aeração da planta de fotobiorreatores.

Três circuitos de tensão regulável foram acoplados aos sistemas de iluminação de cada uma das prateleiras (Figura 3.2 a), permitindo modificar o fluxo de fótons dado pelas duas lâmpadas fluorescentes, que foi monitorado por meio de um luxímetro a partir da conversão estabelecida pela Equação 3.1 (EGC, 2010). Nas medidas de intensidade luminosa com o luxímetro, foi mantida sempre a mesma posição do sensor na superfície do fotobiorrator: no seu centro à altura de aproximadamente 18,25 cm, na face onde a luz incide (*riser*). Dessa

forma, o sensor é posicionado entre as duas lâmpadas de maneira simétrica (Figura 3.4). Um temporizador também foi acoplado a cada uma das prateleiras, permitindo modificações no fotoperíodo de luz/escuro às quais as microalgas são submetidas.

$$74\text{lux} = 1\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1} = 1\mu\text{E.m}^{-2}\text{s}^{-1} \quad (3.1)$$

Como fluido de refrigeração/aquecimento foi utilizada água destilada armazenada em três bombonas de 20 l, cujas temperaturas foram controladas por meio de três indicadores e controladores digitais de temperatura, cada qual acoplado a um sensor termopar inserido nas bombonas. Em cada um dos reservatórios foi montado um sistema de troca térmica, sendo o aquecimento provido por aquecedores elétricos de aquário e o resfriamento dado pela circulação de água em serpentinas de alumínio, água essa proveniente de um banho de refrigeração compartilhado pelas três bombonas (Figura 3.4). A temperatura ambiente foi mantida na faixa de 23 a 29 °C através da climatização da sala com ar condicionado, que permaneceu ligado durante os experimentos. A temperatura no interior de cada fotobiorreator foi monitorada diariamente por meio de um termômetro de bulbo. Assim como para as medidas de luminosidade, foi estabelecido um ponto específico dos fotobiorreatores para coleta de amostras, localizado no *downcomer*, entre os tubos de aço para troca térmica, conforme a Figura 3.5.

Detalhes sobre os equipamentos utilizados para o desenvolvimento deste trabalho, bem como a precisão dos instrumentos utilizados nas medidas de temperatura, intensidade luminosa e vazão de gases estão apresentados no Apêndice A Seção A.4.

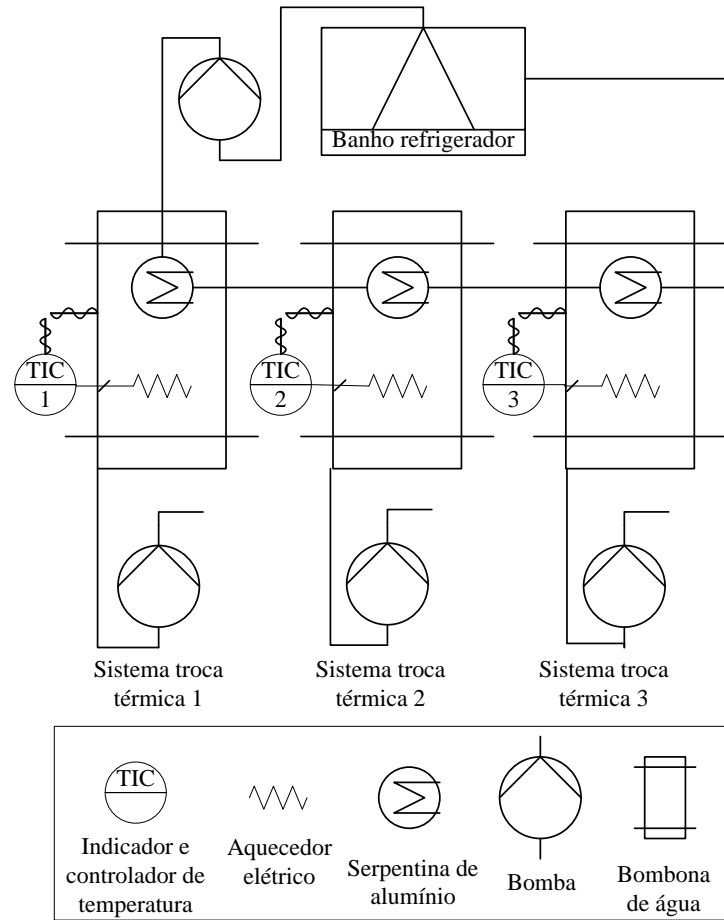


Figura 3.4: Representação esquemática do sistema de troca térmica da planta de fotobiorreatores.

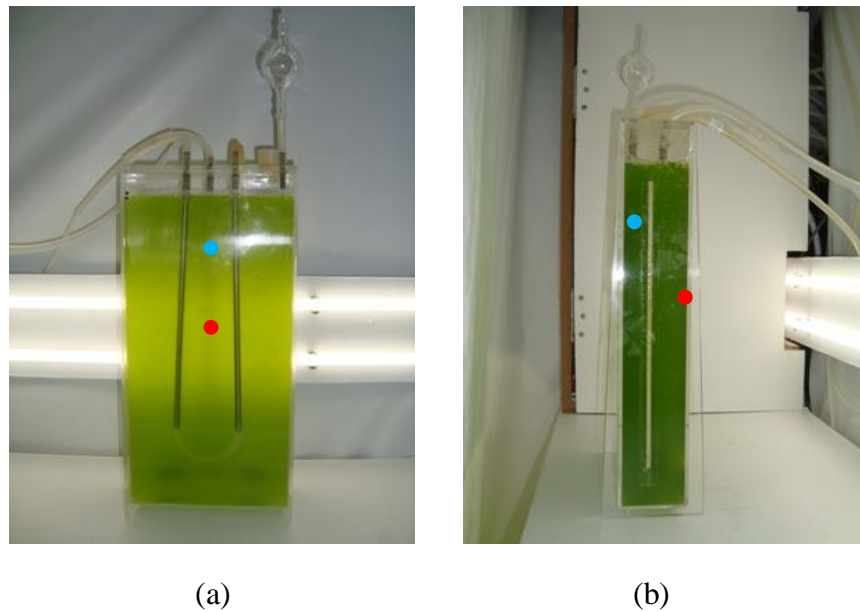


Figura 3.5: Fotobiorreator *airlift*. (a) Vista frontal. (b) Vista lateral. O ponto azul indica o ponto de coleta de amostras e ponto vermelho indica o local de posicionamento do sensor de luminosidade do luxímetro.

Para ligação entre os fotobiorreatores e os sistemas de aeração e troca térmica foram utilizadas mangueiras de silicone conectadas a pinos metálicos constituintes da tampa de cada um dos sistemas. Por ser construído em acrílico e devido ao material constituinte dos aeradores (pedra porosa) o fotobiorreator não pode ser esterilizado em autoclave; em função disso foi adotado um procedimento de assepsia momentos antes do início dos experimentos. Filtros de ar feitos com algodão hidrófobo foram conectados às correntes de aeração dos fotobiorreatores, que foram acionadas. Cada um dos sistemas foi preenchido com água destilada e 300 µl de hipoclorito de sódio 10-12% foi adicionado. Após 1h, adicionou-se 1 ml de solução de tiosulfato de sódio 50 g.l⁻¹ para neutralização do cloro residual. Em seguida, o conteúdo líquido do fotobiorreator foi sugado através do orifício para coleta de amostras por uma mangueira de silicone esterilizada ligada a uma bomba peristáltica. Rolhas de silicone autoclavadas foram utilizadas como tampa do orifício para coleta de amostras.

3.6 Planejamento Experimental

Considerando estudos anteriores em diferentes sistemas de cultivo, mencionados na Seção 2.1.6, este trabalho primeiramente teve como variáveis de interesse temperatura, intensidade luminosa e concentração de CO₂ na corrente de aeração. Posteriormente, por fatos que serão discutidos no Capítulo 4, esta última variável de estudo foi substituída pela concentração de nitrato no meio de cultivo. As respostas estatisticamente avaliadas, seguindo uma metodologia de superfície de resposta, foram máxima concentração de biomassa (ou seja, a concentração de biomassa obtida no término do período experimental), taxa instantânea de crescimento no período exponencial e teor de lipídios em biomassa liofilizada.

3.6.1 Experimento 1

Na primeira etapa desse estudo seguiu-se um delineamento composto central rotacional, conforme a Tabela 3.2. Os experimentos foram realizados com salinidade de 33 ± 1 g.l⁻¹, fotoperíodo 12h: 12h luz/escuro e vazão de ar de 0,25 v.v.m, ou seja, vazão de

750 ml.min⁻¹ de ar. O inóculo para os cultivos foi preparado na incubadora em erlenmeyer de 6 l, com 4 l de cultura, salinidade de 33±1 g.l⁻¹, 25 ± 1 °C, intensidade luminosa de 6200 ± 500 lux, fotoperíodo 12h: 12h luz/escuro, e alimentação constante de ar filtrado sem adição de CO₂ de 0,25 v.v.m, ou seja, 1 l.min⁻¹ de ar.

Tabela 3.2: Matriz de planejamento experimental do Experimento 1.

Identificação do experimento (Posição na planta) ¹	Temperatura (°C) (x ₁)		CO ₂ (% v/v) (x ₂)		Intensidade luminosa (lux - μE m ⁻² s ⁻¹) ² (x ₃)		
	Valores codificados e originais das variáveis de estudo						
Batelada 1	P2-2	-1	21	-1	2,0	-1	5000 - 68
	P2-1	1	27	-1	2,0	-1	5000 - 68
	P2-4	-1	21	1	4,0	-1	5000 - 68
	P2-3	1	27	1	4,0	-1	5000 - 68
	P3-2	-1	21	-1	2,0	1	9000 - 122
	P3-1	1	27	-1	2,0	1	9000 - 122
	P3-4	-1	21	1	4,0	1	9000 - 122
	P3-3	1	27	1	4,0	1	9000 - 122
	P1-1	0	24	0	3,0	0	7000 - 95
	P1-2	0	24	0	3,0	0	77000 - 95
P1-3	0	24	0	3,0	0	7000 - 95	
Batelada 2	P3-1	-1,68	19	0	3,0	0	7000 - 95
	P3-2						
	P3-2	1,68	29	0	3,0	0	7000 - 95
	P3-3	0	24	-1,68	1,3	0	7000 - 95
	P3-4	0	24	1,68	4,7	0	7000 - 95
	P2-1	0	24	0	3,0	-1,68	3636 - 49
	P2-2	0	24	0	3,0	1,68	10364 - 140
	P2-3	0	24	0	3,0	0	7000 - 95
P2-4	0	24	0	3,0	0	7000 - 95	

¹ Por exemplo, P2-1 refere-se ao 1^a reator da 2^a prateleira da esquerda para a direita.

² 74 lux = 1 μE m⁻² s⁻¹ (Fonte: EGC, 2010).

(Fonte: RODRIGUES & IEMMA, 2009).

Foi determinada uma curva para verificar o fim da fase logarítmica de crescimento das células, pois segundo YUAN-KUN & HUI (2004) e LOURENÇO (2006), a fase de adaptação é reduzida se células nesse estágio de crescimento são utilizadas como inóculo. Nessa

dissertação, o final da fase logarítmica dos inóculos foi considerado quando a absorbância atingiu o valor unitário. O tempo determinado foi de 10 dias, portanto inóculos com aproximadamente esse período de cultivo foram utilizados inóculos nos fotobiorreatores. A relação inóculo/ meio de cultura inserida nos fotobiorreatores no início dos experimentos é de 1:10; dessa forma, aproximadamente 300 ml de inóculo e 2700 ml de meio de cultura fresco foram adicionados em cada fotobiorreator. Duas bateladas de experimentos seriam necessárias para a conclusão dos experimentos relativos ao planejamento experimental proposto, porém somente a primeira delas foi realizada, conforme será discutido.

3.6.2 Experimento 2

Na segunda etapa desse estudo a variável de estudo concentração de CO₂ na corrente de aeração foi substituída pela variável concentração de nitrato no meio de cultivo. O delineamento composto central rotacional foi mantido e a nova matriz pode ser vista na Tabela 3.3. Os experimentos foram realizados com salinidade de $33 \pm 1 \text{ g.l}^{-1}$, fotoperíodo 12h: 12h luz/escuro e vazão de ar de 0,25 v.v.m, ou seja, vazão de 750 ml.min^{-1} de ar. O inóculo para os cultivos foi preparado na incubadora em erlenmeyer de 6l, com 4l de cultura, salinidade de $33 \pm 1 \text{ g.l}^{-1}$, $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, intensidade luminosa de $7260 \pm 670 \text{ lux}$, fotoperíodo 12h: 12h luz/escuro, e alimentação constante de ar filtrado sem adição de CO₂ de 0,25 v.v.m, ou seja, 1 l.min^{-1} de ar.

Ao todo quatro bateladas foram realizadas seguindo este planejamento experimental, duas delas utilizando tris-HCl como tampão de pH e duas sem o reagente, ou seja, dois experimentos completos foram realizadas. O tampão tris-HCl de concentração aproximada equivalente a 2 mM da base foi feito a partir de tris-(hidroximetil)-aminometano e HCl, com pH final de 7,1 (detalhes podem ser vistos no Apêndice A Seção A.5.7). O meio de cultivo f/2 com a adição de 1 ml dessa solução apresentou pH de 8,2. (LOURENÇO, 2006; HARRISON & BERGES, 2005). Para fins de simplificação, nessa dissertação os pontos experimentais da matriz apresentada na Tabela 3.3 nos quais houve utilização de tampão tris-HCl no meio de cultivo f/2 serão referidos como pertencentes ao Experimento 2A. Já os pontos experimentais da referida matriz onde não houve utilização do tampão serão referidos como Experimento 2B.

Foram determinadas diferentes curvas, com e sem a utilização de tris-HCl, para verificar o fim da fase logarítmica de crescimento das células (padronizado como valor de absorvância igual a 1 nessa dissertação) quando elas estão mais propícias para serem inoculadas. Os tempos determinados foram de sete e 10 dias, portanto inóculos com aproximadamente esse período de cultivo foram utilizados nos fotobiorreatores dos Experimentos 2A e 2B, respectivamente. A relação inóculo/ meio de cultura inserida nos fotobiorreatores no início dos fotobiorreatores é de 1:10; dessa forma, aproximadamente 300 ml de inóculo e 2700 ml de meio fresco foram adicionados em cada fotobiorreator.

Tabela 3.3: Matriz de planejamento experimental do Experimento 2.

Identificação do experimento (Posição na planta) ¹	Temperatura (°C) (x ₁)		NaNO ₃ (mg.l ⁻¹) (x ₂)		Intensidade luminosa (lux - μE m ⁻² s ⁻¹) ² (x ₃)		
	Valores codificados e originais das variáveis de estudo						
Batelada 1	P2-2	-1	21	-1	45	-1	5000 - 68
	P2-1	1	27	-1	45	-1	5000 - 68
	P2-4	-1	21	1	105	-1	5000 - 68
	P2-3	1	27	1	105	-1	5000 - 68
	P3-2	-1	21	-1	45	1	9000 - 122
	P3-1	1	27	-1	45	1	9000 - 122
	P3-4	-1	21	1	105	1	9000 - 122
	P3-3	1	27	1	105	1	9000 - 122
	P1-1	0	24	0	75	0	7000 - 95
	P1-2	0	24	0	75	0	77000 - 95
P1-3	0	24	0	75	0	7000 - 95	
Batelada 2	P3-1	-1,68	19	0	75	0	7000 - 95
	P3-2		0	75	0	7000 - 95	
	P3-2	1,68	29	0	75	0	7000 - 95
	P3-3	0	24	-1,68	25	0	7000 - 95
	P3-4	0	24	1,68	125	0	7000 - 95
	P2-1	0	24	0	75	-1,68	3636 - 49
	P2-2	0	24	0	75	1,68	10364 - 140
	P2-3	0	24	0	75	0	7000 - 95
P2-4	0	24	0	75	0	7000 - 95	

¹ Por exemplo, P2-1 refere-se ao 1^a reator da 2^a prateleira da esquerda para a direita.

² 74 lux = 1 μE m⁻² s⁻¹ (Fonte: EGC, 2010).
(Fonte: RODRIGUES & IEMMA, 2009).

3.7 Análises Realizadas

A partir do conjunto de experimentos realizados, objetivou-se obter os seguintes dados: máxima concentração de biomassa (g.l^{-1}), taxa específica de crescimento (d^{-1}) e teor de lipídios (% em biomassa liofilizada). A determinação desses parâmetros foi realizada por meio das metodologias descritas a seguir.

3.7.1 Espectrofotometria Visível

Para monitorar o crescimento das células foi adotado o método de espectrofotometria visível, com medições no comprimento de onda de 570 nm. Uma alíquota de 4 ml de amostra foi diariamente coletada (preferencialmente no mesmo horário) em cada um dos reatores para realização das medidas em cubetas de vidro em espectrofotômetro (UV-1600 Pró-Análise), utilizando-se meio de cultivo como branco. Posteriormente, essas medidas foram relacionadas ao método de determinação de peso seco por meio de uma curva de calibração. Objetivou-se sempre medidas de absorvância até o valor unitário, as amostras que apresentavam maior absorvância foram diluídas (LOURENÇO, 2006, CONVERTI *et al.*, 2009; SHENG-YI *et al.*, 2009; SPOLAORE *et al.*, 2006).

3.7.2 Determinação de Peso Seco

Depois de finalizados os cultivos, foram realizadas determinações de peso seco em duplicata com amostras dos dois ou três fotobiorreatores mais representativos na respectiva batelada em estudo (ponto central e/ou pontos de maior absorvância), para posterior correlação com as medidas realizadas por espectrofotometria e determinação. Com auxílio de uma bomba de vácuo, alíquotas de volume entre 250 e 500 ml de cultivo de cada um dos fotobiorreatores foram filtradas em filtros de 0,7 μm de porosidade (GF-3 MN) previamente pesados. Após o escoamento do líquido, os filtros foram lavados com água ultrapura para

remoção de sal remanescente no filtrado. A transparência da água confirmou a eficiência de retenção das células no filtro. Em seguida, os filtros foram alocados em vidros de relógio para secagem em estufa a 105 °C por 24 h. Depois de transcorrido o período de secagem, os filtros foram alocados em um dessecador para evitar a absorção de umidade durante o resfriamento por cerca de uma hora. Imediatamente após a retirada dos filtros do dessecador os mesmos foram pesados em balança analítica para determinação da biomassa ali contida. (LOURENÇO, 2006; YUAN-KUN & HUI, 2004; SHENG-YI *et al.*, 2009; SPOLAORE *et al.*, 2006).

Uma vez determinada a biomassa contida no filtro, e conhecendo o volume de filtrado, foi possível determinar a concentração de biomassa do experimento em questão e também dos demais. Com uma alíquota de amostra do mesmo fotobiorreator escolhido previamente, foram realizadas várias diluições para contemplar uma reta de absorbância (valores entre 0,1 e 1) *versus* peso seco com pelo menos cinco pontos, pois conhecendo o volume de cultura utilizado na diluição, também é possível conhecer a massa ali contida, e então relacioná-la à absorbância. As diluições foram realizadas com meio de cultivo, também utilizado como branco, e com o auxílio de pipetas reguláveis (100 a 1000 µl) totalizando o volume de 4 ml, suficiente para preencher a cubeta de vidro. As medidas por espectrofotometria foram realizadas no mesmo comprimento de onda de trabalho (570 nm). A partir da equação de reta obtida, cada medida diária de absorbância (adimensional) pode ser transformada para dados de concentração de biomassa (g.l⁻¹). A obtenção desses dados permitiu calcular não só a produtividade final dos cultivos, mas também a taxa específica de crescimento (aplicando a Equação 2.3 do Capítulo 2 nos pontos experimentais delimitantes da fase exponencial de crescimento). (WOOD, EVERROAD & WINGARD, 2005).

3.8 Análise de Lipídios

Com o objetivo de obter medidas confiáveis e de otimizar a extração de lipídios, três métodos de extração foram previamente avaliados nesse trabalho: método Soxhlet, método de Folch com ultrassom e método de Bligh & Dyer com ultrassom. Uma amostra teste, composta de biomassa proveniente de vários cultivos (não pertencentes ao Experimento 2B), foi

analisada pelas três metodologias. Apenas uma delas (metodologia de Folch com ultrassom) foi escolhida para realização das análises de lipídios relativas ao Experimento 2B, de acordo com as justificativas que serão apresentadas no próximo capítulo dessa dissertação.

Para obtenção de biomassa seca para as análises, foram realizadas etapas de centrifugação, congelamento e liofilização. A centrifugação das amostras foi realizada no mesmo dia em que os cultivos foram encerrados, em uma centrífuga com capacidade para oito tubos plásticos de 50 ml. O volume total de todos os fotobiorreatores foi centrifugado (cerca de 3 l cada), com exceção das alíquotas utilizadas na determinação das retas absorbância *versus* peso seco. Cada amostra foi reduzida a volumes finais de menos de 50 ml. As condições de centrifugação empregadas foram de 4800 rpm (força centrífuga de 3044 g) por 5 min, à temperatura de 10°C, com 30 s de aceleração e 30 s de frenagem do equipamento. Com auxílio de uma espátula, o concentrado algáceo depositado no fundo dos tubos foi transferido para recipientes específicos para secagem por liofilização, devidamente identificados. As amostras foram submetidas a congelamento em ultrafreezer a -40 °C e posteriormente foram liofilizadas, sob condições de -30°C e pressão muito baixa ($\leq 500 \mu\text{mHg}$), com tempo médio de processo entre 24 e 48 h, até verificar-se peso constante. (GRIMA, FERNANDÉZ & MEDINA, 2004 ; BEHRENS, 2005; CONVERTI *et al.*, 2009; SHENG-YI *et al.*, 2009).

3.8.1 Método Soxhlet

Cerca de 500 mg de amostra, devidamente pesados em balança analítica, foram colocados no interior da câmara de extração do extrator Soxhlet utilizado, suportados em papel filtro quantitativo de 125 mm diâmetro dobrado em formato cônico. Aproximadamente 120 ml de hexano foram utilizados como solvente, à temperatura $115 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$, monitorada por termômetro de bulbo e dada por uma manta de aquecimento disposta no fundo do balão de ebulição. Após percolação do solvente pela amostra por 4 h, com aproximadamente 10 sifonagens, a solução contendo os lipídios extraídos foi transferida para um balão previamente pesado, de onde o hexano foi removido por meio de um rotaevaporador. O balão contendo os lipídios foi transferido para um dessecador para resfriamento; imediatamente após sua retirada efetuou-se a pesagem para determinação da massa do analito. A massa obtida dividida pela

massa de amostra utilizada resulta no teor de lipídios extraído das células (g.g^{-1} de biomassa liofilizada) (BRUM, ARRUDA & REGITANO-D'ARCE, 2009; CONVERTI, 2009). O aparato utilizado pode ser visto na Figura 3.6.

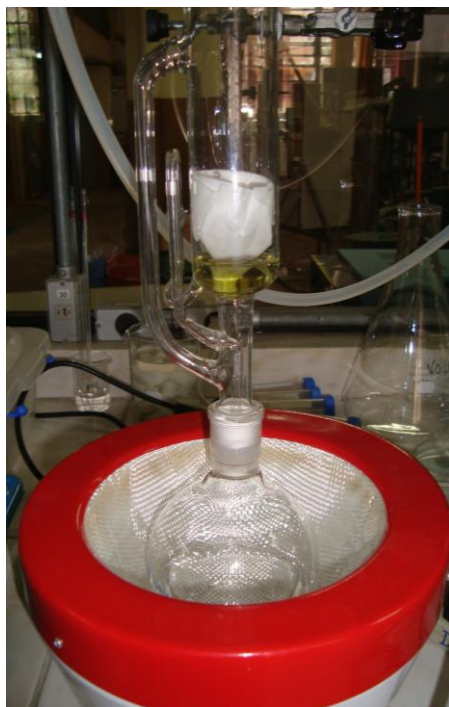


Figura 3.6: Extrator Soxhlet utilizado.

3.8.2 Método de Folch com Ultrassom

Cerca de 500 mg de amostra, devidamente pesados em balança analítica, foram macerados em cadinho de porcelana com 20 ml de clorofórmio e 10 ml de metanol (Figuras 3.7 *a* e *b*). Em seguida, a mistura obtida foi colocada em tubo plástico de 50 ml e mantida em banho ultrassom (40 kHz) por 90 min (Figura 3.7 *c*). Após esse procedimento a amostra foi submetida à centrifugação por 8 min, a 4800 rpm (força centrífuga de 2214 g), à temperatura de 4°C, com 30 s de aceleração e 30 s de frenagem do equipamento. O sobrenadante, contendo os lipídios extraídos, foi transferido para outro tubo plástico de 50 ml, onde foram adicionados cerca de 6 ml de solução aquosa de KCl a 0,88%, correspondendo a 1/4 do volume do sobrenadante. Com o tubo fechado, efetuou-se sua agitação manual em triplicata, obtendo-

se duas fases, a superior hidrofílica (aproximadamente 13 ml), e a inferior, de coloração verde, contendo os lipídios (aproximadamente 17 ml).

Removeu-se a fase superior e 4 ml de uma mistura metanol/ água 1:1, correspondendo a 1/4 do volume da fase lipídica remanescente, foram adicionados ao tubo. Nova agitação manual em triplicata foi realizada e novamente a fase superior foi removida (aproximadamente 5 ml). A fase lipídica remanescente (aproximadamente 5 ml) foi filtrada com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e recolhida em balão previamente pesado (Figura 3.7 d), de onde o solvente foi extraído por meio de rotaevaporador (Figura 3.7 e). O balão contendo os lipídios foi transferido pra um dessecador para resfriamento; imediatamente após sua retirada efetuou-se a pesagem para determinação da massa do analito (Figura 3.7 f). A massa obtida dividida pela massa de amostra utilizada resulta no teor de lipídios extraído das células (g.g^{-1} de biomassa seca) (BRUM, ARRUDA & REGITANO-D'ARCE, 2009; CONVERTI *et al.*, 2009; LOURENÇO, 2006; SHENG-YI *et al.* 2009).

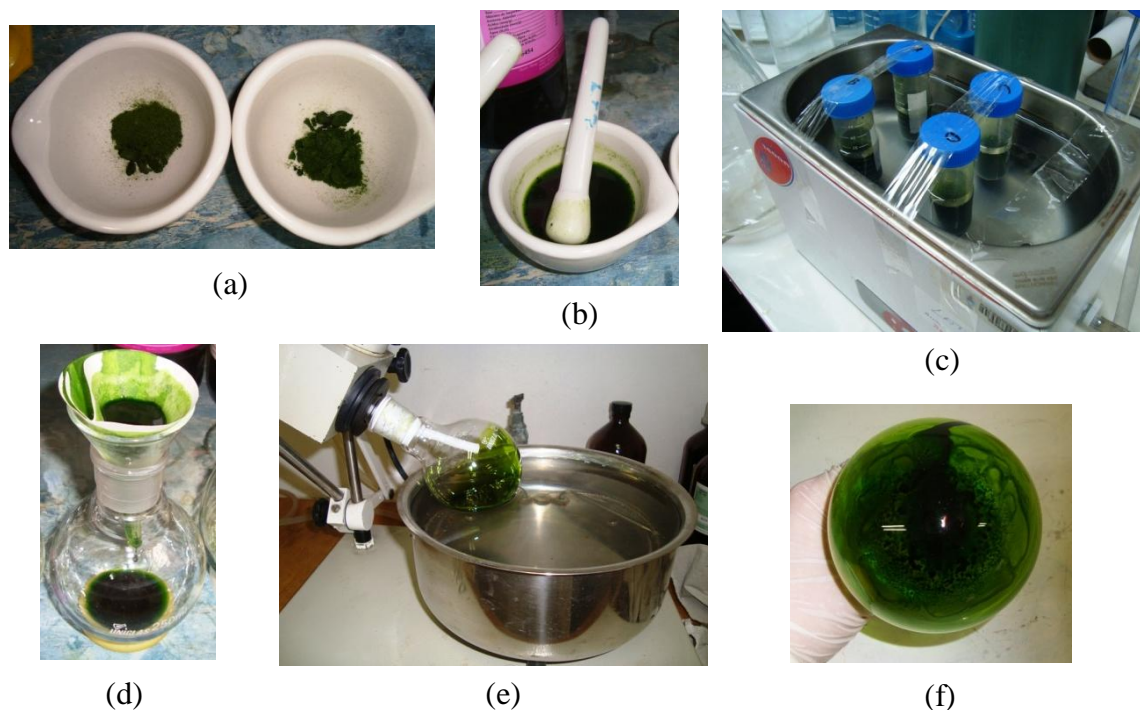


Figura 3.7: Análise de lipídios pelo método de Folch com ultrassom. (a) Maceração da amostra seca. (b) Maceração da amostra com solvente. (c) Banho ultrassom. (d) Filtração com Na_2SO_4 anidro. (e) Evaporação do solvente. (e) Aspecto final do balão contendo lipídios extraídos.

3.8.3 Método de Bligh & Dyer com Ultrassom

Cerca de 500 mg de amostra, devidamente pesados em balança analítica, foram macerados em cadinho de porcelana com 30 ml de clorofórmio. Após a maceração foram adicionados 10 de metanol à mistura, que foi transferida para um tubo plástico de 50 ml, permanecendo 30 min em banho ultrassom (40 khz). Em seguida, adicionou-se cerca de 12 ml de solução aquosa de NaCl a 1% ao tubo, cujo conteúdo foi transferido para um funil de extração e submetido a vigorosa agitação para separação de fases. A fase lipídica verde (inferior) foi filtrada para remover partículas e a solução recolhida em balão previamente pesado, de onde o solvente foi extraído por meio de rotaevaporador. O balão contendo os lipídios foi transferido para um dessecador para resfriamento; imediatamente após sua retirada efetuou-se a pesagem para determinação da massa do analito. A massa obtida dividida pela massa de amostra utilizada resulta no teor de lipídios extraído das células (g.g^{-1} de biomassa seca) (BRUM, ARRUDA & REGITANO-D'ARCE, 2009; RANJAN, PATIL & MOHOLKAR, 2010; SHENG-YI *et al.* 2009).

3.9 Análise Estatística dos Resultados

Para avaliação estatística dos dados experimentais obtidos, foi utilizado o software *Statistica 7.1 (StatSoft Incorporation)*. Através da metodologia de superfície de resposta foi avaliada a influência das três variáveis de estudo (independentes) sobre as respostas estudadas (variáveis dependentes). Foram calculados os efeitos lineares, quadráticos e de interação dos fatores, além do erro puro, significância estatística (valor p) e coeficientes t e F . Foi adotado o nível de significância $\alpha = 0,05$ (5%), o que atesta a significância dos resultados com 95% de confiança para as variáveis de resposta. O valor de p está relacionado ao nível de significância das variáveis de estudo (independentes) sobre as respostas (variáveis dependentes), sendo possível afirmar que para valores de p inferiores a 0,05 o efeito do fator é significativo, e para valores de p maiores que 0,05 o efeito do fator é não significativo. Também para os testes t e F realizados nessa dissertação sempre foi adotado nível de confiança de 95%.

3.10 Método Dinâmico de Determinação do k_La

O coeficiente volumétrico de transferência de massa da fase líquida (k_La) é o parâmetro de caracterização mais importante em fotobiorreatores, pois caracteriza sua eficiência. A etapa determinante na transferência de oxigênio (válido para outros gases, como CO₂) para células em cultivo é a sua difusão através do filme de líquido estagnado em torno da bolha. Portanto, a taxa de transferência de massa pode ser calculada pela Equação 3.2

$$OTR = k_La(C^* - C) \quad (3.2)$$

onde OTR (*oxygen transfer rate*) é a velocidade de transferência de oxigênio por unidade de volume de fluido ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$), k_L é o coeficiente de transferência de massa da fase líquida, a representa a área da interface líquido-gás por unidade de volume do fluido ($\text{m}^2\cdot\text{m}^{-3}$), C é a concentração de oxigênio no meio de cultura ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$) e C^* é a concentração de oxigênio no meio de cultura em equilíbrio com a fase gasosa ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$), ou seja, a solubilidade do oxigênio no meio de cultura (RECH, 2003).

A determinação do k_La do fotobiorreator em estudo foi realizada através do método dinâmico, utilizado-se um eletrodo de O₂ dissolvido (célula polarográfica de Clark), calibrado em água destilada com injeção de N₂ gasoso (zero) e pela injeção de ar (máximo), na temperatura de 19°C. O fotobiorreator foi preenchido com água destilada até seu volume útil e o sensor foi mergulhado no seu interior, mais especificamente no *downcomer*. Em seguida, o O₂ dissolvido foi retirado borbulhando-se gás N₂ no sistema. Após a remoção do oxigênio, iniciou-se a aeração com ar na vazão e temperatura desejadas, até verificar-se a estagnação do valor de oxigênio dissolvido indicado no equipamento. Nesse procedimento, a variação da concentração de O₂ dissolvido ocorre unicamente devido à aeração do meio, conforme a Equação 3.3 (RECH, 2003).

$$\frac{dC}{dt} = k_La \cdot (C^* - C) \quad (3.3)$$

Integrando a Equação 3.3 nas condições iniciais conhecidas $t_0 = 0$ e $C_0 = 0$, conforme a Equação 3.4

$$\int_{C_0=0}^C \frac{dC}{(C^* - C)} = k_L a \int_{t_0=0}^t dt \quad (3.4)$$

chegamos à Equação 3.5, que representa uma reta cujo coeficiente angular é $-k_L a$, conforme a representação da Figura 3.8 (RECH, 2003).

$$\ln\left(1 - \frac{C}{C^*}\right) = -k_L a \cdot t \quad (3.5)$$

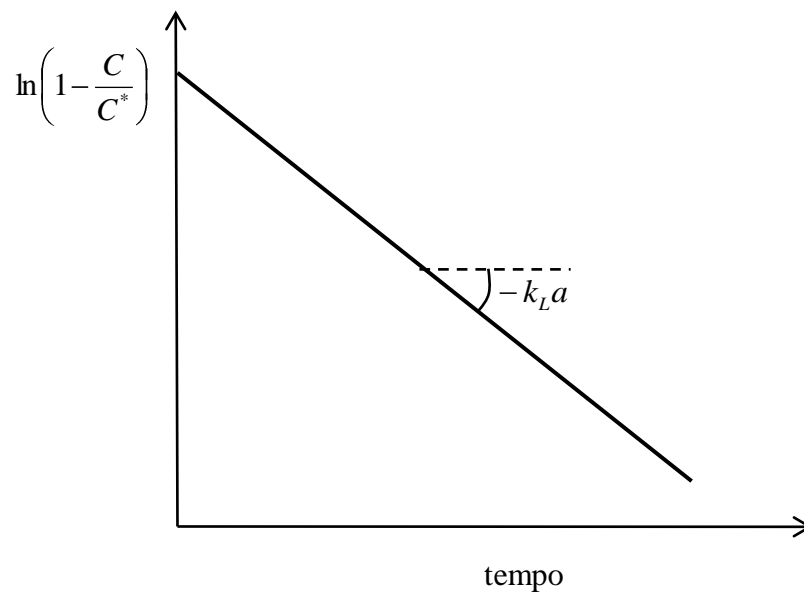


Figura 3.8: Determinação do $k_L a$ pelo método dinâmico.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

O presente capítulo foi segmentado da seguinte forma: as Seções 4.1 e 4.2 apresentam uma breve descrição dos experimentos iniciais realizados na planta experimental detalhada no Capítulo 3. Na Seção 4.3 são apresentados e discutidos os principais resultados obtidos nesta dissertação em termos de máxima concentração de biomassa, taxa instantânea de crescimento e teor de lipídios em biomassa liofilizada para a *Nannochloropsis oculata* nas condições estudadas. A análise estatística e o ajuste de modelos quadráticos para estimação de dados na região de estudo também são apresentados.

4.1 Experimento 1

A batelada de experimentos relativa ao Experimento 1 (que tinha como variáveis de estudo temperatura, concentração de CO₂ na corrente de aeração e intensidade luminosa) foi a primeira realizada na planta de fotobiorreatores construída, onde ocorreram alguns problemas operacionais. O principal deles foi a dificuldade da manutenção da composição de CO₂ desejada na corrente de aeração, ajustada inicialmente por cromatografia gasosa, já que os rotâmetros utilizados na dosagem do gás possuíam escala inadequada para tal fim. Os rotâmetros foram substituídos por outros de escala adequada, que desta vez foram

previamente calibrados. Porém, não foi possível confirmar a composição das misturas por cromatografia gasosa em função da indisponibilidade do cromatógrafo gasoso utilizado, o que inviabilizou sua utilização, prejudicando o andamento do estudo. Pela incerteza de que poderia se manter a variável de estudo nos valores e precisão desejados, optou-se por substituí-la por outra variável de interesse no escopo deste trabalho, no caso a concentração da fonte de nitrogênio no meio de cultivo.

Outra adaptação proposta para os próximos experimentos foi a adição de tampão tris-HCl no meio de cultivo, pois SPOLAORE *et al.* (2006) determinou pH de 8,4 como ótimo para o crescimento de *Nannochloropsis oculata* nas suas condições de estudo. Porém, nesta dissertação foram verificados valores de pH próximos de 6 (medidos com papel indicador) nos experimentos realizados com injeção de CO₂. LOURENÇO (2006) indica que a utilização de tris em quantidades apropriadas é capaz de manter o pH do meio f/2 entre 7,5 e 8,5, fato comprovado por SHENG-YI *et al.* (2009), que avaliaram a influência da injeção de CO₂ na produção de *Nannochloropsis oculata*, e relataram a manutenção do pH em 7,7 com injeção de 5% de CO₂ na corrente de aeração utilizando 10 mM de tris-base. Porém, LOURENÇO (2006) ainda afirma que o tris pode ser tóxico para muitas espécies em concentrações de 10 mM, portanto o recomendado é utilizar valores entre 1 e 5 mM.

Mais detalhes operacionais, resultados das análises cromatográficas e das calibrações dos rotâmetros, resultados obtidos neste conjunto de experimentos e sua análise estatística podem ser verificados no Apêndice B Seção B.1.

4.2 Experimento 2A

No Experimento 2, o inóculo antecessor àquele destinado para os experimentos da primeira batelada foi preparado com meio de cultivo já contendo o tampão tris-HCl (preparação descrita no Apêndice A Seção A.5.7). Porém, para a segunda batelada de experimentos, o inóculo foi repicado mais vezes com meio de cultivo contendo o tampão, cerca de cinco repicagens contra duas na primeira batelada, fato que pode ter influenciado para que os dois blocos de experimentos tenham entrado em fase de decaimento do

crescimento em períodos distintos, respectivamente 6 e 11 dias na primeira e na segunda batelada. Além disso, as curvas de peso seco *versus* absorvância das duas bateladas apresentaram regressões muito diferentes entre si, diferentemente do esperado, conforme o estudo publicado por SPOLAORE *et al.* (2006).

Quanto à adição de tampão, embora o pH tenha se mantido entre 7 e 8 ao longo do período de experimentos, verificou-se decantação de células no fundo dos fotobiorreatores e também seu acúmulo nas pedras porosas para aeração e tubos de inox para troca térmica, fato que anteriormente não tinha sido verificado em tamanha proporção. O acúmulo de células prejudicou a homogeneidade dos experimentos, que, aliado à disparidade entre os períodos de cultivo prejudicam a tomada de conclusões concretas a respeito dos efeitos das variáveis. Por estas razões, optou-se por retomar a utilização do meio f/2 sem tris-HCl em um novo conjunto de experimentos relativos ao planejamento experimental apresentado na Tabela 3.3 (denominado Experimento 2B), pois na ausência do enriquecimento da corrente de aeração com CO₂ o pH do meio de cultivo mantém-se em valores entre 7 e 8 mesmo sem tampão (verificado na vazão de trabalho de 750 ml.min⁻¹ de ar). Os resultados do Experimento 2A e sua análise estatística estão detalhados no Apêndice B Seção B.2.

4.3 Experimento 2B

Após iniciados os experimentos, diariamente foram monitorados os valores de luminosidade e temperatura dos cultivos e, quando necessário, os valores foram ajustados a fim de manter as condições desejadas. Nos três primeiros dias de cultivo dos experimentos da primeira batelada houve dificuldade na manutenção das temperaturas de 21 e 24 °C nos valores desejados em função das condições climáticas, com valores medidos até dois graus acima dos valores desejados, situação que foi posteriormente controlada. O pH manteve-se entre 7 e 8 ao longo de todo período experimental. As Figuras 4.1 e 4.2 apresentam as curvas de absorvância *versus* tempo obtidas para os inóculos utilizados nos experimentos das bateladas 1 e 2, respectivamente.

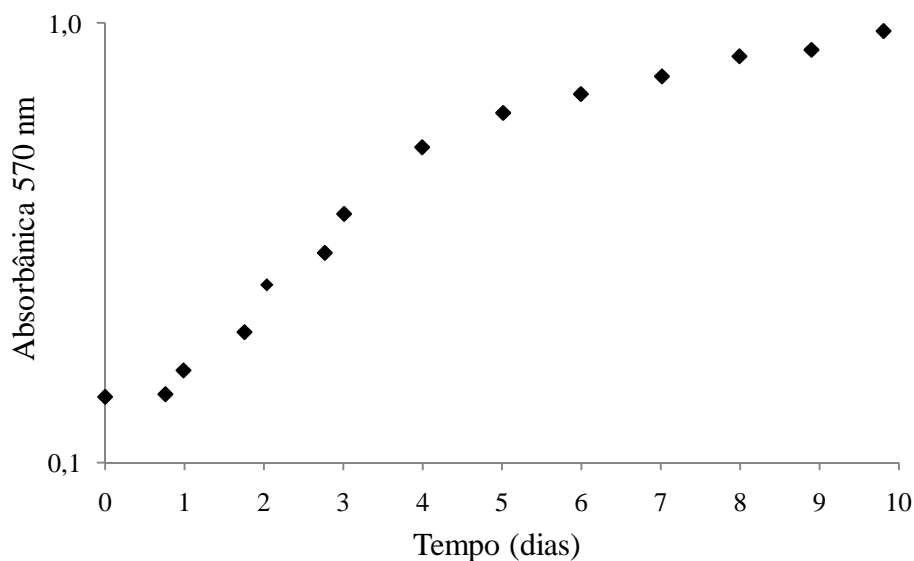


Figura 4.1: Curva do inóculo utilizado nos experimentos da batelada 1 do Experimento 2B.

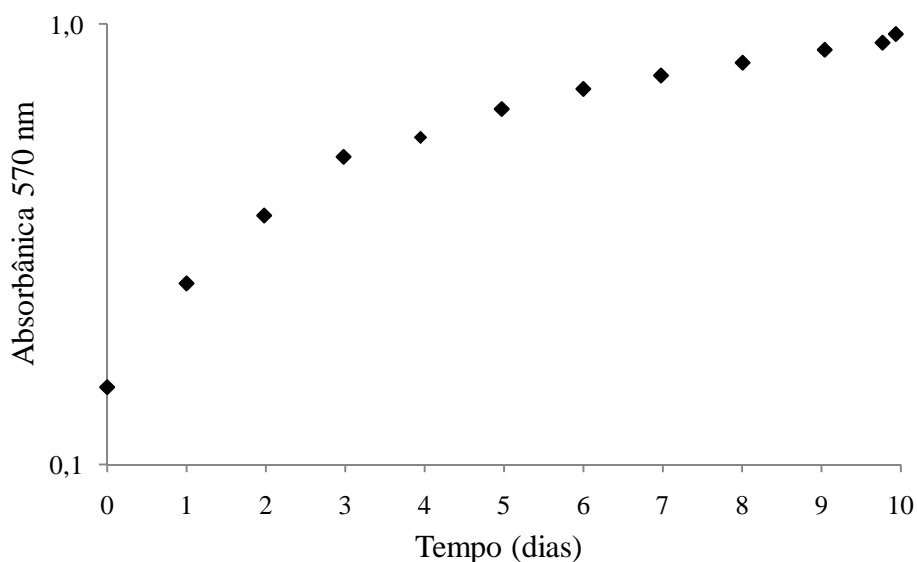


Figura 4.2: Curva do inóculo utilizado nos experimentos da batelada 2 do Experimento 2B.

As relações entre absorbância e peso seco determinadas após o término dos experimentos foram realizadas a partir dos ensaios codificados como P3-3 e P3-4 na batelada 1 e P2-2 e P3-4 na batelada 2, pois estes foram os experimentos de maior absorbância em cada um dos blocos. As regressões obtidas apresentam coeficientes lineares de regressão relativamente similares (i.e., 247,74 e 259,10, conforme Figuras 4.3 e 4.4) confirmando o estudo de SPOLAORE *et al.*, que afirma que diferentes condições empregadas nos experimentos não afetaram a relação linear de proporcionalidade entre absorbância e peso seco. A partir das regressões obtidas, foram calculadas as concentrações de biomassa ao longo do tempo, apresentadas nas curvas de crescimento da Figura 4.5, e as taxas instantâneas de crescimento no período exponencial.

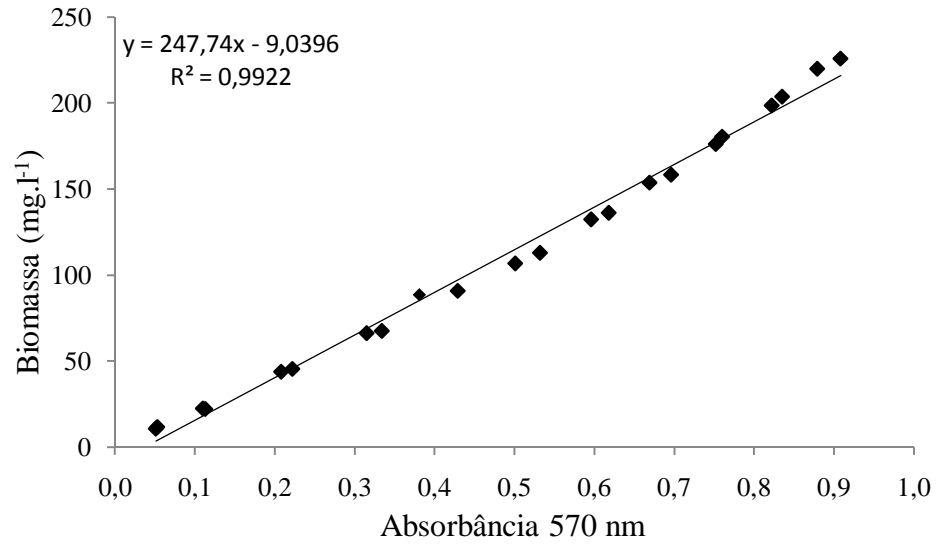


Figura 4.3: Relação entre absorbância e peso seco determinada para os experimentos da batelada 1 do Experimento 2B.

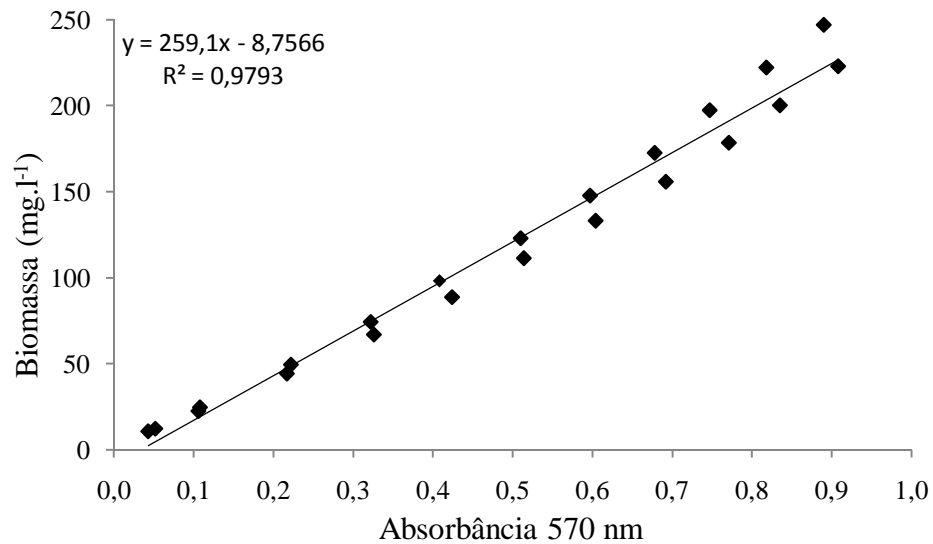


Figura 4.4: Relação entre absorbância e peso seco determinada para os experimentos da batelada 2 do Experimento 2B.

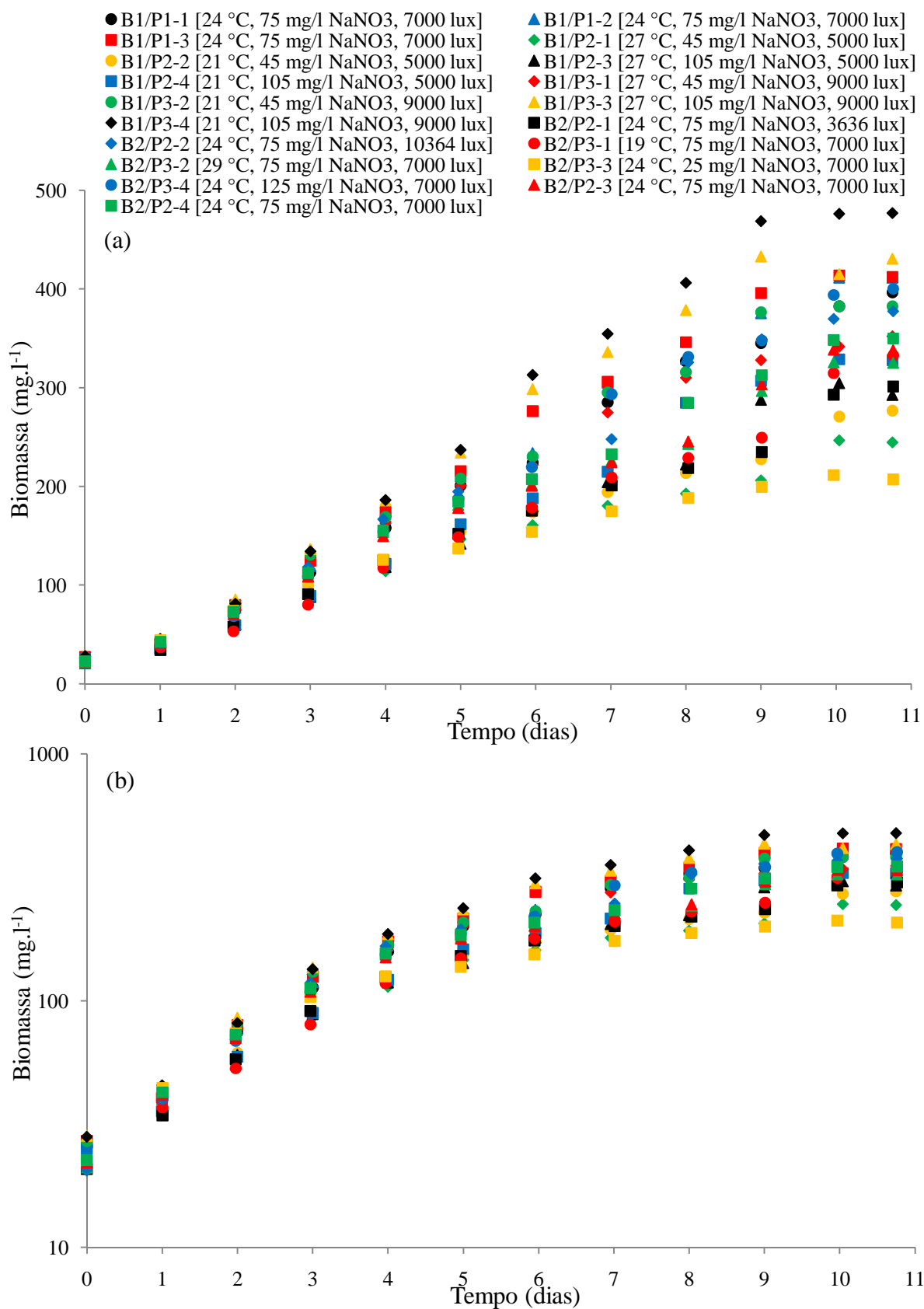


Figura 4.5: Curvas de crescimento obtidas no Experimento 2B. (a) Valores de concentração de biomassa expressos em escala normal. (b) Valores de concentração de biomassa expressos em escala logarítmica.

Em geral o acúmulo de lipídios em células de microalgas ocorre majoritariamente durante a fase estacionária (SHENG-YI *et al.*, 2009; BROWN *et al.*, 1997; MATA, MARTINS & CAETANO, 2010). Por essa razão, a interrupção dos cultivos foi realizada somente no 11º dia, quando foram verificadas diminuições nas absorvâncias medidas em alguns cultivos com absorvância crescente até então.

Na Tabela 4.1 são apresentados os resultados experimentais, onde a máxima concentração de biomassa está baseada nos valores de absorvância medidos após agitação das culturas em cada um dos fotobiorreatores no término dos experimentos, o que promoveu a homogeneização de pequenas quantidades de biomassa decantadas no fundo dos sistemas. Isso explica eventuais diferenças entre os valores visualizados nas curvas de crescimento e aqueles apresentados na referida tabela, pois os dados para as curvas de crescimento foram amostrados considerando apenas a homogeneização dada pela aeração do sistema.

Os teores de lipídios foram determinados pelo método de Folch com ultrassom, descrito no Capítulo 3. A escolha desta metodologia em detrimento das outras apresentadas será discutida no decorrer deste capítulo.

Tabela 4.1: Resultados obtidos no Experimento 2B.

Experimento	Máxima concentração de biomassa (mg.l ⁻¹)	Taxa instantânea de crescimento (d ⁻¹) ¹	Teor de lipídios (método de Folch com ultrassom) (% em biomassa liofilizada)
B1/P2-2 [21 °C, 45 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 5000 lux]	274,7	0,4578	30,36
B1/P2-1 [27 °C, 45 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 5000 lux]	246,0	0,4169	28,54
B1/P2-4 [21 °C, 105 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 5000 lux]	333,2	0,4592	21,38
B1/P2-3 [27 °C, 105 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 5000 lux]	299,5	0,4398	18,73
B1/P3-2 [21 °C, 45 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 9000 lux]	381,7	0,5502	26,17
B1/P3-1 [27 °C, 45 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 9000 lux]	360,1	0,5284	29,00
B1/P3-4 [21 °C, 105 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 9000 lux]	482,7	0,5410	24,86
B1/P3-3 [27 °C, 105 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 9000 lux]	453,0	0,5520	29,22
B1/P1-1 [24 °C, 75 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 7000 lux]	390,6	0,5247	24,42
B1/P1-2 [24 °C, 75 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 7000 lux]	397,3	0,5451	24,35
B1/P1-3 [24 °C, 75 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 7000 lux]	433,7	0,5624	23,47
B2/P3-1 [19 °C, 75 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 7000 lux]	328,1	0,3943	18,15
B2/P3-2 [29 °C, 75 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 7000 lux]	338,0	0,4994	18,13
B2/P3-3 [24 °C, 25 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 7000 lux]	218,2	0,4298	25,86
B2/P3-4 [24 °C, 125 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 7000 lux]	404,3	0,5044	16,53
B2/P2-1 [24 °C, 75 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 3636 lux]	309,5	0,4945	21,42
B2/P2-2 [24 °C, 75 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 10364 lux]	383,1	0,5473	26,65
B2/P2-3 [24 °C, 75 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 7000 lux]	353,5	0,4883	22,28
B2/P2-4 [24 °C, 75 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 7000 lux]	366,0	0,4924	18,79

¹ período considerado para o cálculo: 1° ao 3° dia, ou seja, o período exponencial compreendido entre 24 e 72 h de cultivo.

4.3.1 Máxima Concentração de Biomassa

Como pode ser observado tanto nos gráficos da Figura 4.5 como na Tabela 4.1, a maior concentração de biomassa máxima foi obtida na condição experimental de 21 °C, 105 mg.l⁻¹ de NaNO₃ no meio f/2 e 9000 lux de intensidade luminosa na superfície do fotobiorreator (B1/P3-4), com 482,7 mg.l⁻¹ de biomassa ao final de aproximadamente 11 dias de experimento. O ponto experimental que se destaca depois desse está nas condições de 27 °C, 105 mg.l⁻¹ de NaNO₃ e 9000 lux (B1/P3-3), com 453,0 mg.l⁻¹ de biomassa. Por outro lado, as menores concentrações de biomassa máximas foram verificadas nas condições de 24 °C, 25 mg.l⁻¹ de NaNO₃ e 7000 lux (B2/P3-3) e 27 °C, 45 mg.l⁻¹ de NaNO₃ e 5000 lux (B1/P2-1), com 218,2 e 246,0 mg.l⁻¹ de biomassa, respectivamente.

A análise de variância apresentada na Tabela 4.2 mostra que, de acordo com o valor de *p*, foram significativos apenas os efeitos linear e quadrático da concentração de NaNO₃ no meio de cultivo e o efeito linear da intensidade luminosa, além do efeito relacionado aos blocos. Na mesma tabela estão apresentados os dados de uma análise de variância da regressão e da falta de ajuste tanto do modelo completo, quando do modelo reduzido, nesse caso considerando apenas os efeitos significativos. Tanto o modelo completo quanto o modelo reduzido apresentaram regressão significativa (*F* calculado superior ao *F* tabelado), com coeficientes de correlação de 88,15% e 82,18%, respectivamente. Embora o modelo reduzido tenha explicado menos a variação nos dados, o maior valor de *F* aponta para uma maior significância em relação ao modelo completo.

Os valores estimados para os coeficientes de regressão indicam o quanto cada fator influencia a resposta estudada. Um coeficiente de regressão linear positivo indica que o valor absoluto da resposta aumenta passando de um valor mínimo para um valor máximo da variável independente. Por outro lado, um coeficiente de regressão linear negativo indica que o valor absoluto da resposta diminui passando de um valor mínimo para um valor máximo da variável independente. No caso da máxima concentração de biomassa (Tabela 4.3), verifica-se que o valor positivo dos coeficientes de regressão lineares significativos da concentração de NaNO₃ no meio de cultivo e da intensidade luminosa contribuem para o aumento na produção de biomassa na região estudada. O valor negativo do coeficiente de regressão quadrático

significativo da concentração de NaNO_3 no meio de cultivo confere um perfil parabólico aos valores de máxima concentração na região estudada.

Tabela 4.2: Análise de variância da máxima concentração de biomassa do Experimento 2B.

Fonte de variação ¹	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	F tabelado	p-valor
Modelo completo						
Blocos	4794,1	1	4794,1	12,46	5,32	0,038629
T (L)	697,0	1	697,0	1,81	5,32	0,270953
T (Q)	2653,4	1	2653,4	6,90	5,32	0,078563
NaNO₃ (L)	27998,7	1	27998,7	72,79	5,32	0,003383
NaNO₃ (Q)	6417,2	1	6417,2	16,68	5,32	0,026513
I (L)	30733,7	1	30733,7	79,90	5,32	0,002954
I (Q)	1152,3	1	1152,3	3,00	5,32	0,181924
T x NaNO ₃	21,5	1	21,5	0,06	5,32	0,828518
T x I	15,4	1	15,4	0,046	5,32	0,854199
NaNO ₃ x I	838,5	1	838,5	2,19	5,32	0,236323
Falta de ajuste	8671,1	5	1734,2	4,51	3,69	0,122526
Erro puro	1153,9	3	384,7	0,22	4,07	
Total	82922,0	18				
Regressão	73097,0	10	7309,7	5,95	3,35	
Resíduos	9825,0	8	1228,1	% variação explicada (R^2) = 88,15		
Modelo reduzido (somente termos significativos)						
Falta de ajuste	13619,3	11	1238,1	3,22	2,57	0,182675
Erro puro	1153,9	3	384,7	0,31	3,34	
Total	82922,0	18				
Regressão	68148,8	4	17037,2	16,15	3,11	
Resíduos	14773,2	14	1055,2	% variação explicada (R^2) = 82,18		

¹ (L) = termo linear; (Q) = termo quadrático.

Quanto ao efeito relacionado aos blocos, pode ser interpretado como algum fator externo que influenciou diferentemente os experimentos em cada um dos blocos de experimentos. A explicação para tal efeito pode estar relacionada às absorvâncias iniciais, e consequentemente às concentrações iniciais de biomassa, no início dos experimentos em cada uma das bateladas, que apresentaram os seguintes valores: na batelada 1, absorvância média de $0,145 \pm 0,04$ (ou $26,84 \pm 1,00 \text{ mg.l}^{-1}$) e na batelada 2 absorvância média de $0,117 \pm 0,03$ (ou $21,46 \pm 0,77 \text{ mg.l}^{-1}$). É conhecido que o crescimento de microalgas segue um padrão exponencial e que a população de células no final do cultivo é proporcional à sua concentração inicial, conforme a Equação 2.2 do Capítulo 2. O estudo realizado por SOARES (2010) com a microalga *Phaeodactylum tricornutum* mostra que de fato a densidade celular

inicial no meio de cultura influencia na produção final de biomassa. Sendo assim, é justificado o efeito de bloco significativo verificado.

Tabela 4.3: Coeficientes de regressão estimados para a máxima concentração de biomassa do Experimento 2B.

Fatores ¹	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	t(3)	p-valor	Limite confiança inferior (-95%)	Limite confiança superior (95%)
Média	385,3	8,8	43,9	0,000026	357,4	413,2
Bloco (1)	-16,1	9,1	-3,5	0,038629	-30,6	-1,6
T (L)	-7,2	10,7	-1,3	0,270953	-24,1	9,8
T (Q)	-14,1	10,8	-2,6	0,078563	-31,3	3,0
NaNO ₃ (L)	45,4	10,7	8,5	0,003383	28,5	62,4
NaNO ₃ (Q)	-22,0	10,8	-4,1	0,026513	-39,1	-4,9
I (L)	47,4	10,6	8,9	0,002954	30,6	64,3
I (Q)	-9,2	10,6	-1,7	0,181924	-26,1	7,7
T x NaNO ₃	-1,6	13,9	-0,2	0,828518	-23,7	20,4
T x I	1,4	13,9	0,2	0,854199	-20,7	23,5
NaNO ₃ x I	10,2	13,9	1,51	0,236323	-11,8	32,3

¹ (L) = termo linear; (Q) = termo quadrático.

O diagrama de Pareto da Figura 4.6 permite comparar melhor os valores de t calculados (Tabela 4.3) com o valor crítico tabelado, no caso 3,18, a partir do qual os efeitos são significativos. Na Figura 4.7 são apresentados os valores experimentais e previstos pelo modelo reduzido para a máxima concentração de biomassa. A linha contínua representa os valores teóricos e os pontos representam os valores experimentais. A partir desses dados foi calculado o erro médio relativo de 6,32%, que representa um ajuste adequado para propósitos práticos. O modelo reduzido e codificado proposto para a máxima concentração de biomassa (mg.l^{-1}), na região e condições experimentais estudadas, é dado pela Equação 4.1

$$y = 385,3 + 45,4 \cdot x_2 - 22,0 \cdot x_2^2 + 47,4 \cdot x_3 \quad (4.1)$$

onde x_2 representa a concentração de NaNO₃ no meio de cultivo e x_3 representa a intensidade luminosa na superfície do fotobiorreator. A correspondência entre os valores reais e os valores codificados, que devem ser substituídos nessa equação, pode ser visualizada na Tabela 3.3 do Capítulo 3.

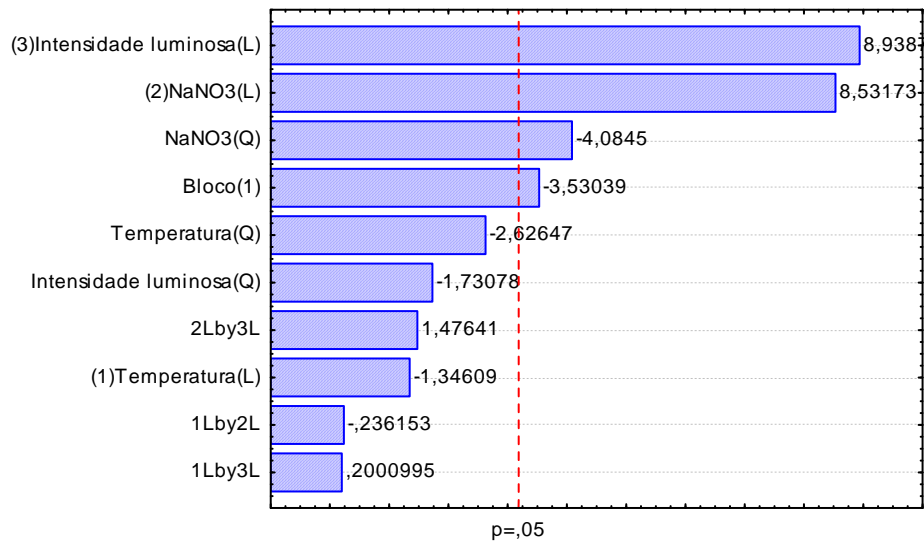


Figura 4.6: Diagrama de Pareto da máxima concentração de biomassa do Experimento 2B. (L) representa os termos lineares e (Q) representa os termos quadráticos.

A superfície de resposta na Figura 4.8, baseada no modelo proposto da Equação 4.1, permite uma melhor visualização dos efeitos que as variáveis estudadas exercem na máxima concentração de biomassa de *Nannochloropsis oculata* na região e condições de estudo empregadas no Experimento 2B.

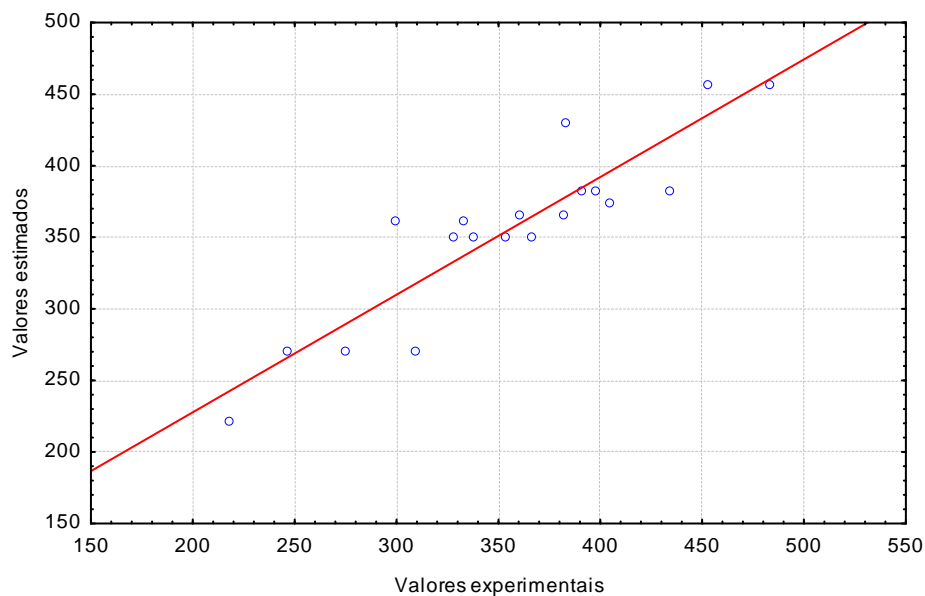


Figura 4.7: Valores experimentais e valores estimados do modelo reduzido de máxima concentração de biomassa do Experimento 2B.

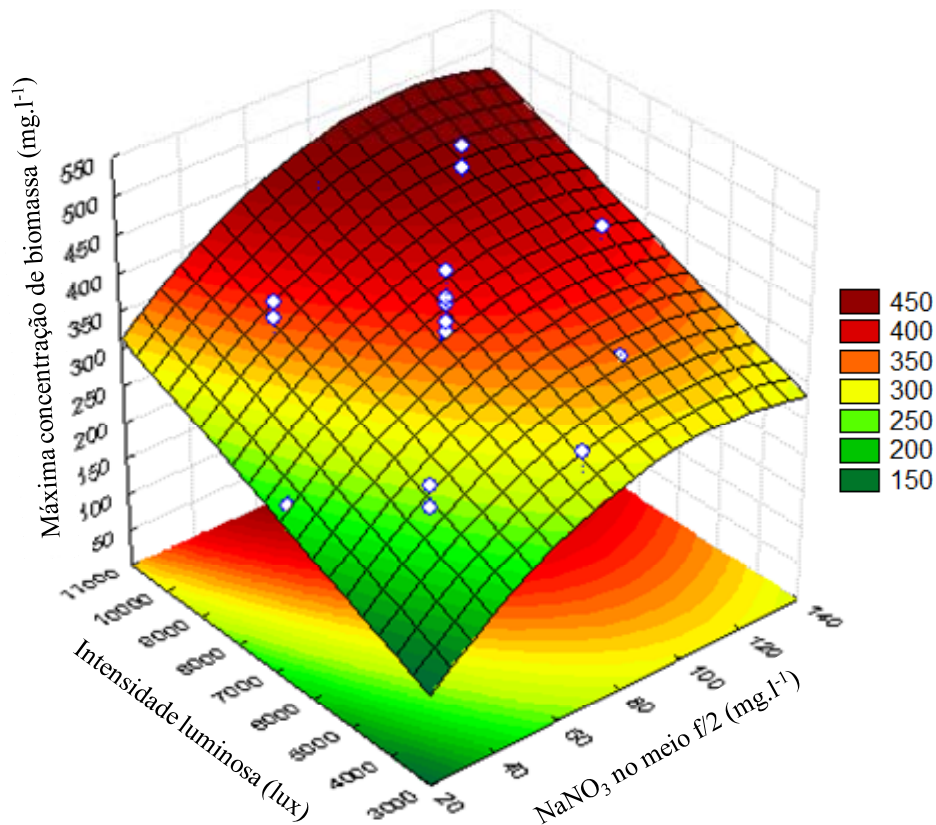


Figura 4.8: Superfície de resposta para o modelo reduzido de máxima concentração de biomassa do Experimento 2B. Os pontos brancos representam os valores experimentais.

Comparativamente ao estudo realizado por OHSE *et al.* (2009), que produziram *Nannochloropsis oculata* com concentração de 828 mg.l⁻¹ de biomassa, a maior concentração de biomassa máxima obtida experimentalmente nesse estudo, 482,7 mg.l⁻¹, é significativa, visto que as condições de cultivo foram bastante semelhantes, porém com luz contínua, ao contrário do fotoperíodo aqui empregado, com 12h: 12h luz/escuro. Porém, os resultados ficaram muito aquém da produção máxima reportada na literatura, que é de 60 g.l⁻¹, obtida em placas de vidro em regime semicontínuo (ZITELLI, RODOLFI & TREDICI, 2004; ZOU *et al.*, 2000), onde as condições empregadas foram muito distintas, com intensidade luminosa aproximadamente 25 vezes maior, caminho óptico de 2 cm, vigorosa agitação e substituição diária do meio de cultivo, promovendo constante suplementação de nitrogênio e eliminação de substâncias inibidoras do crescimento.

A maioria dos dados publicados em relação à produção de *Nannochloropsis oculata*, por serem relativos a estudos em regime semicontínuo, tem seus resultados expressados em unidades temporais, isto é, produção volumétrica por unidade de tempo, como aqueles

apresentados na Seção 2.4 do Capítulo 2. Considerando o período total de cultivo de 11 dias, a maior produção alcançada nesse estudo foi de 43,88 mg.l⁻¹.d¹, inferior a estudos com produtividades de 180 mg.l⁻¹.d¹ (RODOLFI *et al.*, 2009), 497 mg.l⁻¹.d¹ (SHENG-YI *et al.*, 2009) e 760 mg.l⁻¹.d¹ (ZITTELLI *et al.*, 1999), por exemplo.

4.3.2 Taxa Instantânea de Crescimento

A análise de variância apresentada na Tabela 4.4 mostra que, de acordo com o valor de p , três variáveis foram significativas, primeiramente se destacando o efeito linear da intensidade luminosa, seguido pelos efeitos quadráticos da temperatura e concentração de nitrato no meio de cultivo. Porém, também foi constatada a significância da falta de ajuste do modelo ajustado (p menor que 0,05) e F calculado inferior a F tabelado, com variação explicada de apenas 73,88% dos dados, considerando o modelo completo. Considerando apenas os fatores significativos pode ser considerado um modelo reduzido, que não apresentou falta de ajuste (embora p calculado seja de apenas 0,09). Nesse caso, verifica-se que F calculado é superior ao F tabelado, apontando significância do modelo, porém com um baixo valor para o coeficiente de correlação, que explicou a variação de apenas 66,32% dos dados. Por essa razão, nessa seção não será proposta uma equação ajustada que possa predizer a resposta da taxa instantânea de crescimento.

Como também verificado na análise de variância da máxima concentração de biomassa, na seção anterior, para a taxa instantânea de crescimento também houve efeito de bloco significativo devido à concentração inicial de células diferentes em cada uma das bateladas de experimentos (p menor que 0,05), o que no caso da taxa instantânea de crescimento causou maior disparidade entre os dados obtidos em cada bloco devido ao padrão de crescimento exponencial, muito dependente do número inicial de células.

Outra justificativa possível para a baixa adequação dos dados ao modelo proposto é que ele pode ser inadequado para expressar a taxa instantânea de crescimento, cujos valores calculados podem não representar as taxas aclimatadas. Segundo, WOOD, EVERROAD & WINGARD (2005), uma taxa de crescimento aclimatada de uma cultura é a taxa de

crescimento depois que a população fez todos os ajustes fisiológicos necessários para manter o mesmo ritmo de crescimento equilibrado através de várias transferências de série para novos meios.

Tabela 4.4: Análise de variância da taxa instantânea de crescimento do Experimento 2B.

Fonte de variação ¹	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	F tabelado	p-valor
Modelo completo						
Blocos	0,0034	1	0,0034	14,03	5,32	0,033205
T (L)	0,0008	1	0,0008	3,33	5,32	0,165709
T (Q)	0,0074	1	0,0074	30,74	5,32	0,011566
NaNO ₃ (L)	0,0020	1	0,0020	8,16	5,32	0,064734
NaNO₃ (Q)	0,0035	1	0,0035	14,68	5,32	0,031343
I (L)	0,0173	1	0,0173	72,20	5,32	0,003423
I (Q)	0,0001	1	0,0001	0,53	5,32	0,518986
T x NaNO ₃	0,0004	1	0,0004	1,53	5,32	0,303555
T x I	0,0003	1	0,0003	1,28	5,32	0,340961
NaNO ₃ x I	0,0000	1	0,0000	0,05	5,32	0,835842
Falta de ajuste	0,0114	5	0,0023	9,47	3,69	0,046737
Erro puro	0,0007	3	0,0002	0,11	4,07	
Total	0,0465	18				
Regressão	0,0344	10	0,0034	2,28	3,35	
Resíduos	0,0121	8	0,0015	% variação explicada (R ²) = 73,99		
Modelo reduzido (somente termos significativos)						
Falta de ajuste	0,0150	11	0,0014	5,66	2,57	0,090059
Erro puro	0,0007	3	0,0002	0,18	3,34	
Total	0,0150	11	0,0014			
Regressão	0,0309	4	0,0077	6,89	3,11	
Resíduos	0,0157	14	0,0011	% variação explicada (R ²) = 66,32		

¹ (L) = termo linear; (Q) = termo quadrático.

Ainda segundo WOOD, EVERROAD & WINGARD (2005), esses ajustes são influenciados pelas condições de incubação, por exemplo, e por definição para uma estimativa de crescimento equilibrado, feita com técnicas de cultivo em batelada, múltiplas transferências de série são necessárias, todas realizadas com a cepa ainda está em crescimento exponencial. No estudo desenvolvido nessa dissertação a cepa foi aclimatada aproximadamente nos valores médios do intervalo de estudo de cada uma das variáveis, conforme descrito no Capítulo 3, e não ponto a ponto em cada condição experimental, por questões práticas.

Em relação à taxa de crescimento máxima obtida, o valor experimentalmente verificado aqui, $0,5624\text{ d}^{-1}$, é inferior àquele reportado por SPOLAORE *et al.* (2006), equivalente a $0,8616\text{ d}^{-1}$, e superior ao determinado por CONVERTI *et al.* (2009), igual a $0,13\text{ d}^{-1}$.

4.3.3 Teor de Lipídios em Biomassa Liofilizada

Para a determinação do teor de lipídios, as três metodologias avaliadas, descritas no Capítulo 3, apresentaram os resultados da Tabela 4.5 para uma amostra teste de *Nannochloropsis oculata*, submetida aos mesmos processos de separação e secagem das amostras do Experimento 2B. A metodologia de Folch com ultrassom foi a mais eficiente na extração de lipídios, mas o método de Bligh & Dyer também teve bom desempenho. A maior eficiência dessas metodologias, que utilizam clorofórmio e metanol como solventes associado a um período de imersão em banho ultrassom, em detrimento de outras, é apontada pelos estudos de CONVERTI *et al.* (2009) e de D'OCA, VIÊGAS & MACHADO (2008).

Embora menos laborosa, a metodologia Soxhlet exige um tempo maior de análise (no caso quatro horas), o que poderia favorecer reações de peroxidação e hidrólise. Além disso, outra vantagem apresentada pelos métodos que utilizam clorofórmio e metanol como solventes é a sua maior capacidade de extração tanto de lipídios neutros quanto lipídios polares, o que pode explicar os resultados obtidos no teste de extração (BRUM, ARRUDA & REGITANO-D'ARCE, 2009).

Tabela 4.5: Análise de lipídios de uma amostra teste por diferentes metodologias.

Métodologia	Biomassa liofilizada utilizada (g)	Massa de lipídios determinada (g)	Teor de lipídios (%)
Soxhlet	0,5056	0,142	28,1
Folch com ultrassom	0,5012	0,182	36,3
Bligh e Dyer com ultrassom	0,5009	0,166	33,1

Os dados apresentados na Tabela 4.5 não trazem informações a respeito de desvio padrão das análises, pois foram obtidos sem repetições, ou seja, uma única análise da referida amostra foi realizada relativa a cada método, devido à pequena quantidade de biomassa disponível produzida nas mesmas condições experimentais. Embora os dados não tenham sido apresentados aqui, outras amostras (produzidas em condições diferentes) também foram analisadas em replicata única para cada método, com obtenção de resultados semelhantes, novamente tendo destaque os dois métodos que utilizam clorofórmio e metanol como solventes. Sendo assim, apesar da ausência de repetições para avaliar a significância estatística dos resultados apresentados, os dados foram considerados na determinação da metodologia de extração utilizada nesse trabalho principalmente por corroborarem os estudos já mencionados (CONVERTI *et al.*, 2009; D'OCA, VIÊGAS & MACHADO, 2008).

Por fim, em detrimento da metodologia de Bligh & Dyer com ultrassom, um detalhe operacional também contribuiu na escolha da metodologia de Folch com ultrassom para determinação do teor de lipídios dos experimentos nessa dissertação, o fato de contemplar uma etapa de separação da fase orgânica e de sólidos residuais por meio de centrifugação laboratorialmente mais eficiente que a etapa equivalente do método de Bligh e Dyer com ultrassom, realizada por filtração.

Cabe uma observação relativa à forma de expressar os dados. Nessa dissertação, o cálculo do teor percentual de lipídios foi realizado a partir de biomassa liofilizada, que possui um teor de umidade menor do que aquele apresentado por biomassa seca em estufa, utilizada para determinação de peso seco descrito no Capítulo 3. Por exemplo, para o experimento B1/P3-4, enquanto 1000 ml de cultura continham $465,40 \pm 7,64$ mg de biomassa determinada pela secagem em estufa, a partir um volume equivalente de cultura obteve-se aproximadamente 350 mg de biomassa liofilizada.

Como pode ser observado na Tabela 4.1, o maior teor de lipídios em biomassa foi obtido na condição experimental de 21 °C, 45 mg.l⁻¹ de NaNO₃ no meio f/2 e 5000 lux de intensidade luminosa na superfície do fotobiorreator (B1/P2-2), com 30,36%. Os dois pontos experimentais que se destacam depois desse estão nas condições de 27 °C, 105 mg.l⁻¹ de NaNO₃ e 9000 lux (B1/P3-3), com 29,22%, e 27 °C, 45 mg.l⁻¹ de NaNO₃ e 9000 lux

(B1/P3-1), com 29,00%. Por outro lado, o menor teor de lipídios foi verificado nas condições de 24 °C, 125 mg.l⁻¹ de NaNO₃ e 7000 lux (B2/P3-4).

A análise de variância apresentada na Tabela 4.6 mostra que, de acordo com o valor de *p*, foram significativos apenas os efeitos lineares da concentração de NaNO₃ no meio de cultivo e da intensidade luminosa, além do efeito de interação entre essas variáveis, do efeito quadrático da intensidade luminosa e do efeito relacionado aos blocos. Na mesma tabela estão apresentados os dados de uma análise de variância da regressão e da falta de ajuste tanto do modelo completo, quanto do modelo reduzido, nesse caso considerando apenas os efeitos significativos. Tanto o modelo completo quanto o modelo reduzido apresentaram regressão significativa (*F* calculado superior ao *F* tabelado), com coeficientes de correlação de 96,98% e 88,62%, respectivamente.

Quanto ao efeito de bloco observado (Tabela 4.6), supõe-se que as diferentes concentrações iniciais de células nas bateladas de experimentos 1 e 2 conduziram a um consumo de substrato (nitrogênio) em diferentes quantidades, promovendo sua escassez em maior ou menor velocidade e por fim influenciando na composição bioquímica da biomassa. O trabalho de SOARES (2010) evidenciou resultados semelhantes, onde diferentes densidades celulares iniciais no meio de cultura conduziram a teores totais de lipídios diferenciados no final dos cultivos.

Na Tabela 4.7 verifica-se que os valores positivos dos coeficientes de regressão significativos relacionados à intensidade luminosa indicam que o aumento do teor de lipídios da biomassa é favorecido com o aumento do valor da variável na região estudada. O mesmo ocorre com o efeito de interação entre a intensidade luminosa e a concentração de nitrato no meio de cultivo, indicando que o teor de lipídios cresce proporcionalmente ao aumento combinado das duas variáveis. Porém, o valor negativo do coeficiente de regressão linear significativo associado à concentração de nitrato no meio de cultivo mostra que a relação entre essa variável e o teor de lipídios é inversamente proporcional, resultado semelhante ao obtido por CONVERTI *et al.* (2009).

Tabela 4.6: Análise de variância do teor de lipídios do Experimento 2B.

Fonte de variação ¹	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	F tabelado	p-valor
Modelo completo						
Blocos	0,0094	1	0,0094	42,18	5,32	0,007413
T (L)	0,0001	1	0,0001	0,24	5,32	0,657668
T (Q)	0,0004	1	0,0004	2,02	5,32	0,250647
NaNO₃ (L)	0,0093	1	0,0093	41,77	5,32	0,007515
NaNO ₃ (Q)	0,0004	1	0,0004	1,62	5,32	0,293248
I (L)	0,0027	1	0,0027	11,99	5,32	0,040652
I (Q)	0,0031	1	0,0031	14,12	5,32	0,032939
T x NaNO ₃	0,0000	1	0,0000	0,03	5,32	0,878555
T x I	0,0017	1	0,0017	7,67	5,32	0,069642
NaNO₃ x I	0,0039	1	0,0039	17,67	5,32	0,024586
Falta de ajuste	0,0003	5	0,0001	0,28		0,896653
Erro puro	0,0007	3	0,0002	3,55		
Total	0,0323	18				
Regressão	0,0313	10	0,0031	25,60	3,35	
Resíduos	0,0010	8	0,0001	% variação explicada (R ²) = 96,98		
Modelo reduzido (somente termos significativos)						
Falta de ajuste	0,0030	10	0,0003	1,36	2,67	0,446566
Erro puro	0,0007	3	0,0002	0,74	3,41	
Total	0,0323	18				
Regressão	0,0286	5	0,0057	20,24	3,03	
Resíduos	0,0037	13	0,0003	% variação explicada (R ²) = 88,62		

¹ (L) = termo linear; (Q) = termo quadrático.

Tabela 4.7: Coeficientes de regressão estimados para o teor de lipídios do Experimento 2B.

Fatores ¹	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	t(3)	p-valor	Limite confiança inferior (-95%)	Limite confiança superior (95%)
Média	0,2220	0,0067	33,3429	0,000059	0,2008	0,2432
Bloco (1)	-0,0225	0,0035	-6,4942	0,007413	-0,0335	-0,0114
T (L)	0,0020	0,0040	0,4901	0,657668	-0,0109	0,0149
T (Q)	-0,0058	0,0041	-1,4202	0,250647	-0,0188	0,0072
NaNO₃ (L)	-0,0261	0,0040	-6,4631	0,007515	-0,0390	-0,0133
NaNO ₃ (Q)	0,0052	0,0041	1,2713	0,293248	-0,0078	0,0182
I (L)	0,0139	0,0040	3,4596	0,040652	0,0011	0,0268
I (Q)	0,0151	0,0040	3,7579	0,032939	0,0023	0,0279
T x NaNO ₃	0,0008	0,0053	0,1662	0,878555	-0,0159	0,0176
T x I	0,0146	0,0053	2,7687	0,069642	-0,0022	0,0313
NaNO₃ x I	0,0221	0,0053	4,2030	0,024586	0,0053	0,0389

¹ (L) = termo linear; (Q) = termo quadrático.

O diagrama de Pareto da Figura 4.9 permite comparar melhor os valores de t apresentados na Tabela 4.7 com o valor crítico tabelado, no caso 3,18, a partir do qual os efeitos são significativos. Na Figura 4.10 são apresentados os valores experimentais e previstos pelo modelo reduzido para o teor de lipídios em biomassa liofilizada. A linha contínua representa os valores teóricos e os pontos representam os valores experimentais. A partir desses dados, foi calculado o erro médio relativo de 5,29%, que representa um ajuste adequado para propósitos práticos. O modelo reduzido e codificado proposto para o teor de lipídios (% em biomassa liofilizada), na região e condições experimentais estudadas, é dado pela Equação 4.2

$$y = 22,20 - 2,61 \cdot x_2 + 1,39 \cdot x_3 + 1,51 \cdot x_3^2 + 2,21 \cdot x_2 \cdot x_3 \quad (4.2)$$

onde x_2 representa a concentração de NaNO_3 no meio de cultivo e x_3 representa a intensidade luminosa na superfície do fotobiorreator. A correspondência entre os valores reais e os valores codificados, que devem ser substituídos nessa equação, pode ser visualizada na Tabela 3.3 do Capítulo 3.

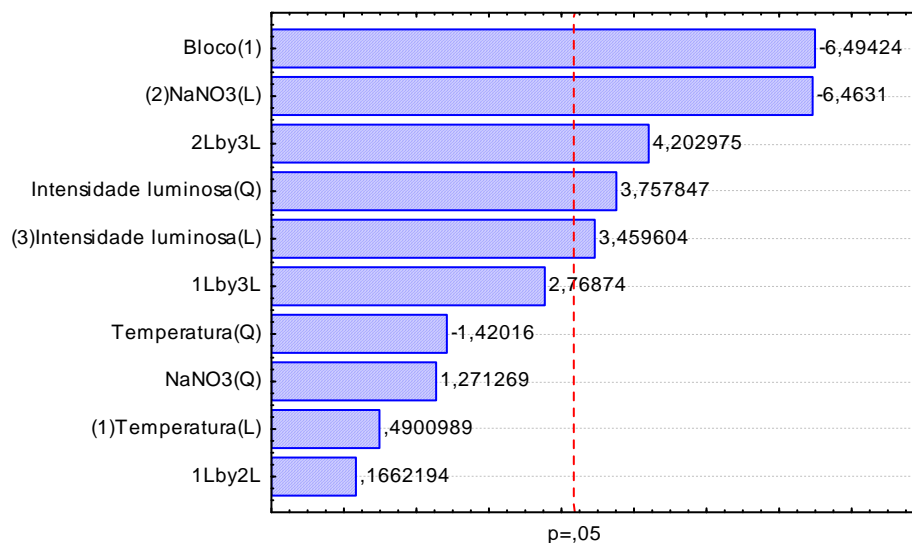


Figura 4.9: Diagrama de Pareto do teor de lipídios do Experimento 2B. (L) representa os termos lineares e (Q) representa os termos quadráticos.

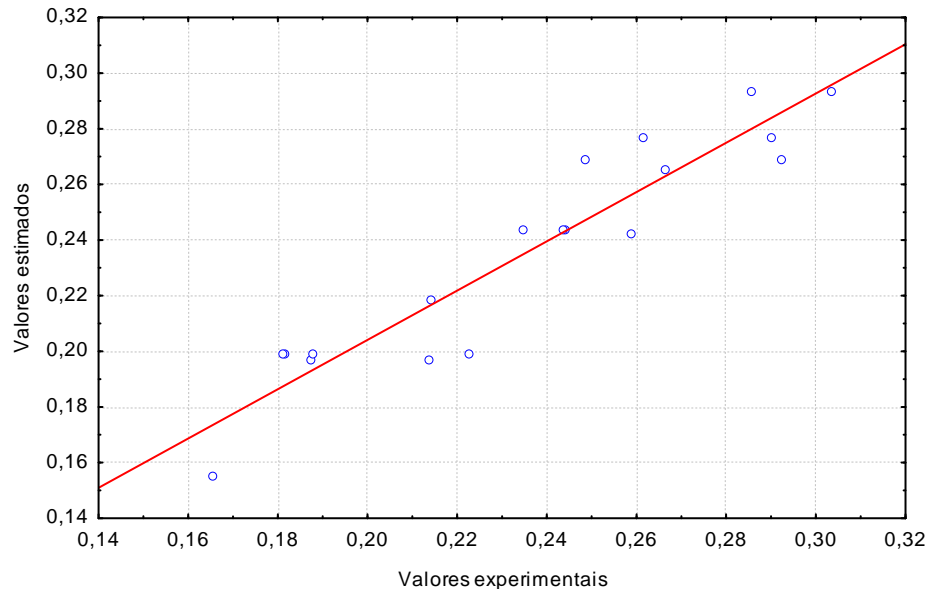


Figura 4.10: Valores experimentais e valores estimados do modelo reduzido do teor de lipídios do Experimento 2B.

A superfície de resposta apresentada na Figura 4.11, baseada no modelo ajustado da Equação 4.2, permite uma melhor visualização dos efeitos que as variáveis estudadas exercem no teor de lipídios da *Nannochloropsis oculata* na região e condições de estudo empregadas no Experimento 2B. Com relação a outros estudos publicados, os teores lipídicos máximos verificados experimentalmente nessa dissertação foram bastante satisfatórios. O valor máximo atingido, equivalente a 30,36% de lipídios em biomassa liofilizada, é maior que os valores máximos verificados nos estudos de CONVERTI *et al.* (2009), com 15,86%, SOARES (2010), com 8,9% e BORGES (2005), com 16,2%, semelhante ao valor máximo verificado no artigo de revisão de MATA, MARTINS & CAETANO (2010), com 29,7% e inferior ao obtido por RODOLFI *et al.* (2009), com 60% em situações de privação de nutrientes.

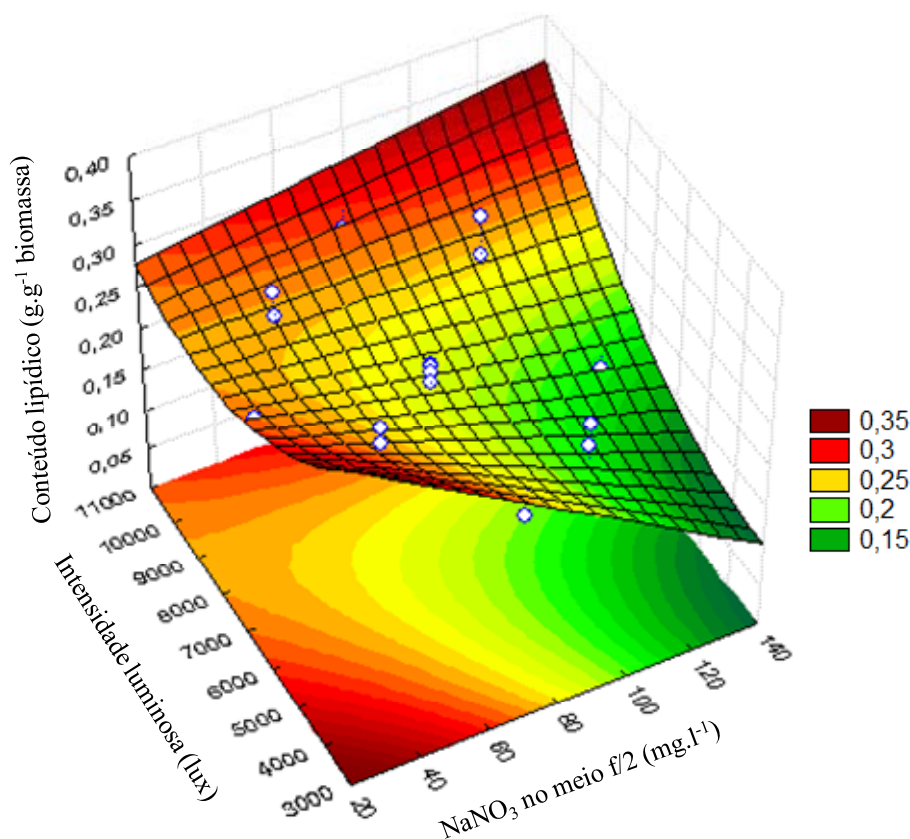


Figura 4.11: Superfície de resposta para o modelo reduzido do teor de lipídios no Experimento 2B. Os pontos brancos representam os valores experimentais.

Conforme a superfície de resposta da Figura 4.11, duas situações interessantes podem ser observadas em regiões de extrapolação do gráfico. Baixas concentrações de NaNO₃ combinadas com baixas intensidades luminosas conduzem a maiores conteúdos lipídicos, bem como altas concentrações de NaNO₃ combinadas com altas intensidades luminosas. É possível que essas condições estejam estressando a microalga, estimulando-a acumular mais lipídios. Logicamente, como essas regiões tratam-se de extrapolações do modelo ajustado, novos experimentos deverão ser realizados para verificar experimentalmente tais estimativas.

É importante dar atenção ao fato que geralmente a condição onde se verifica a maior produção de lipídios não coincide com aquela onde é evidenciada a maior concentração de biomassa máxima, conforme os resultados obtidos, sendo necessário levar em consideração os dois fatores na otimização final da produção de lipídios. Naturalmente, visando a produção em grande escala, ainda precisam ser levados em consideração alguns outros aspectos relativos à colheita e ao processamento posterior da biomassa. Logo, mais estudos precisarão ser realizados para que se chegue a melhor condição operacional de fato.

4.3.4 Biomassa *versus* Lipídios – Uma Abordagem Qualitativa

Mais importante do que analisar os resultados de máxima concentração de biomassa e de conteúdo lipídico isoladamente, é considerar a produção final de lipídios da biomassa, dada pela multiplicação das duas variáveis. Conforme observado na seção anterior, nessa dissertação a máxima concentração de biomassa e o teor de lipídios foram determinados a partir bases diferentes de cálculo (peso seco em estufa e a partir de biomassa liofilizada, respectivamente). Sendo assim, em função do diferente teor de umidade associado à biomassa seca pelos dois diferentes processos, quantitativamente essa análise pode conduzir a valores errôneos. Porém, qualitativamente é interessante avaliar os efeitos exercidos pelas variáveis de estudo sobre a produção final de lipídios.

A multiplicação dos valores experimentais de máxima concentração de biomassa (Figura 4.8) pelos valores experimentais de conteúdo lipídico (Figura 4.11) resulta nos valores apresentados na Tabela 4.8 e representados por pontos brancos na superfície de resposta da Figura 4.12, dada pelo modelo reduzido (somente com efeitos significativos) da variável resultante (máxima concentração de lipídios).

Como é possível observar, há uma tendência de aumento da concentração de lipídios com o aumento das variáveis significativas NaNO_3 no meio de cultivo e intensidade luminosa. Na região de extrapolação ao limite superior dessas variáveis, o modelo reduzido ajustado (variação explicada de 90,95%) indica para concentrações de lipídios maiores do que as calculadas. Essa constatação é interessante uma vez que, ao contrário da região onde está centralizado o experimento, extrapolando as variáveis para limites superiores, teoricamente tem-se tanto o aumento na concentração de biomassa quanto o aumento do teor de lipídios. É claro que o aumento do valor de concentração da biomassa é mais factível do que o aumento do conteúdo lipídico, uma vez que teores que podem ser considerados altos já foram atingidos (cerca de 30%), porém o comportamento do modelo ajustado deve e será considerado no planejamento de futuros experimentos para determinação das faixas operacionais associadas à concentração de NaNO_3 no meio de cultivo e à intensidade luminosa.

Tabela 4.8: Máxima concentração de lipídios do Experimento 2B (valores estimados).

Experimento	Condições experimentais	Máxima concentração de lipídios (mg.l ⁻¹)
B1/P2-2	[21 °C, 45 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 5000 lux]	83,4
B1/P2-1	[27 °C, 45 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 5000 lux]	70,2
B1/P2-4	[21 °C, 105 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 5000 lux]	71,2
B1/P2-3	[27 °C, 105 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 5000 lux]	56,1
B1/P3-2	[21 °C, 45 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 9000 lux]	99,9
B1/P3-1	[27 °C, 45 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 9000 lux]	104,4
B1/P3-4	[21 °C, 105 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 9000 lux]	120,0
B1/P3-3	[27 °C, 105 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 9000 lux]	132,4
B1/P1-1	[24 °C, 75 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 7000 lux]	95,4
B1/P1-2	[24 °C, 75 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 7000 lux]	96,7
B1/P1-3	[24 °C, 75 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 7000 lux]	101,8
B2/P3-1	[19 °C, 75 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 7000 lux]	59,6
B2/P3-2	[29 °C, 75 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 7000 lux]	61,3
B2/P3-3	[24 °C, 25 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 7000 lux]	56,4
B2/P3-4	[24 °C, 125 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 7000 lux]	66,8
B2/P2-1	[24 °C, 75 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 3636 lux]	66,3
B2/P2-2	[24 °C, 75 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 10364 lux]	102,1
B2/P2-3	[24 °C, 75 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 7000 lux]	78,8
B2/P2-4	[24 °C, 75 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 7000 lux]	68,8

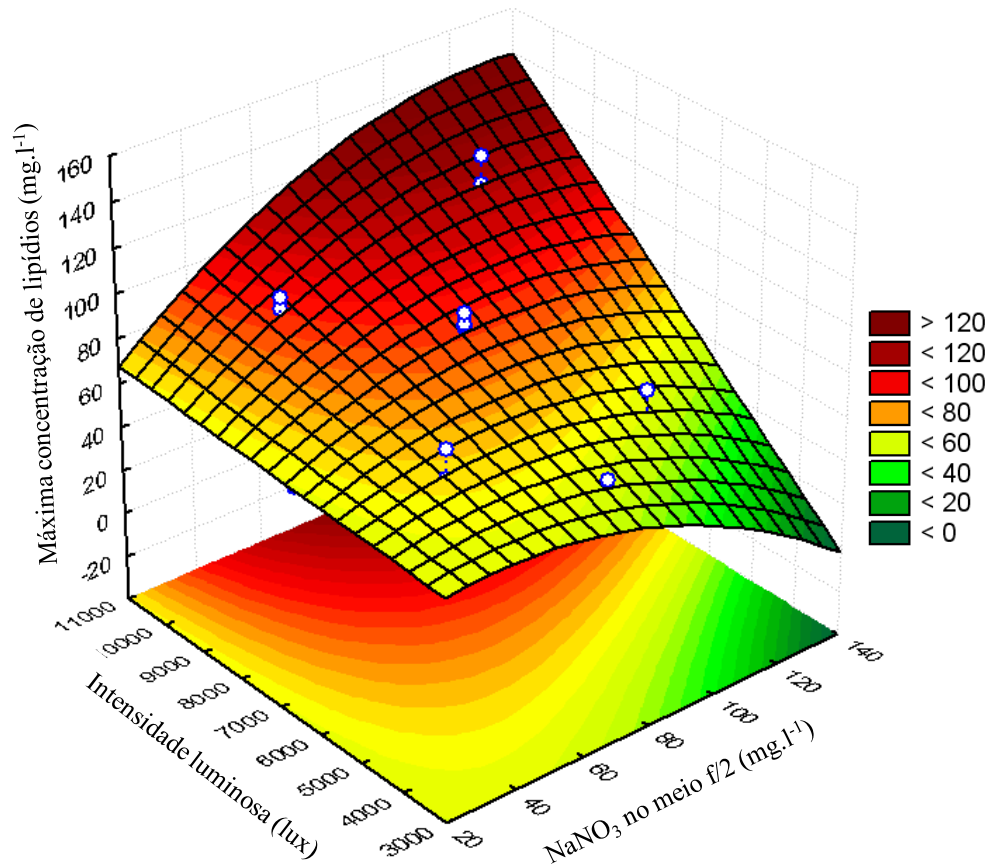


Figura 4.12: Superfície de resposta para o modelo reduzido da máxima concentração de lipídios do Experimento 2B. Os pontos brancos representam os valores estimados.

4.4 Determinação do k_La do Fotobiorreator *Airlift*

O k_La do fotobiorreator *airlift* de circulação interna em estudo foi determinado na temperatura de 19 °C e apresentou os seguintes valores: 21,24 h⁻¹, 28,62 h⁻¹ e 31,68 h⁻¹ nas vazões de 500, 750 e 1000 ml.min⁻¹ de ar, respectivamente; a relação linear entre k_La e vazão, apresentada na Figura 4.13 apresenta um alto coeficiente de correlação, de 99,84%. Mais detalhes dos resultados obtidos nas determinações podem ser verificados no Apêndice B Seção B.3. Os valores determinados são da mesma ordem de grandeza de fotobiorreatores *airlift* de tamanho semelhante (CERRI, 2009).

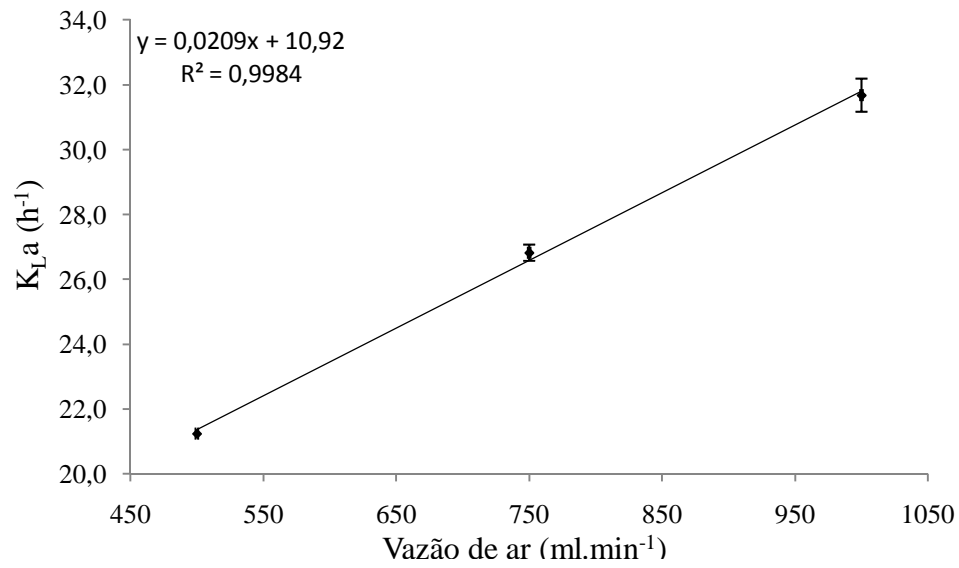


Figura 4.13: Relação entre k_{La} e vazão de ar determinada para o fotobiorreator *airlift* utilizado nessa dissertação.

Capítulo 5

Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros

Na presente dissertação, foram estudados os efeitos das variáveis temperatura, concentração de NaNO_3 no meio de cultivo (f/2) e intensidade luminosa, na produção de biomassa, taxa de crescimento exponencial e teor de lipídios da microalga marinha *Nannochloropsis oculata* em fotobiorreatores do tipo *airlift*. Para realização do estudo, foi adotado um delineamento composto central rotacional, para o qual foi montada uma planta laboratorial que poderá ser utilizada em trabalhos futuros.

Nas faixas de trabalho estudadas, foi proposto um modelo para a máxima concentração de biomassa, com coeficiente de correlação de 82,18%, onde a concentração de NaNO_3 no meio f/2 e a intensidade luminosa apresentaram efeitos lineares positivos e a concentração de NaNO_3 no meio f/2 apresentou efeito quadrático negativo. A maior concentração de biomassa máxima alcançada foi de $482,7 \text{ mg.l}^{-1}$, nas condições experimentais de $21 \text{ }^\circ\text{C}$, 105 mg.l^{-1} de NaNO_3 no meio f/2 e 9000 lux.

Também foi ajustado um modelo para o teor de lipídios em biomassa liofilizada, com coeficiente de correlação de 88,62%, onde foi verificada influência significativa da intensidade luminosa, com fatores linear e quadrático positivos, bem com sua interação com a concentração de NaNO_3 no meio f/2; porém o efeito linear desta última variável foi negativo, confirmando a tendência de acúmulo de lipídios em situações de privação de nitrogênio. O maior teor percentual de lipídios em biomassa liofilizada obtido foi de 30,36%, nas condições

experimentais de 21 °C, 45 mg.l⁻¹ de NaNO₃ no meio f/2 e 5000 lux.

Quanto à taxa instantânea de crescimento, a falta de ajuste dos dados não permitiu a proposição de um modelo na região estudada, porém os três fatores estudados parecem ter influenciado esta variável. Isto expõe a necessidade de mais estudos futuros, com culturas aclimatadas e em regime semicontínuo. Nas faixas de trabalho estudadas a maior taxa instantânea, verificada em período exponencial de crescimento, foi de 0,5624 d⁻¹, nas condições experimentais de 24° C, 75 mg.l⁻¹ de NaNO₃ no meio f/2 e 7000 lux, em um dos pontos centrais do planejamento experimental proposto.

A análise qualitativa da multiplicação dos valores de máxima concentração de biomassa e conteúdo lipídico foi realizada, para avaliação global da concentração de lipídios produzida. Essa análise foi interessante, pois, segundo a superfície de resposta dada pelo modelo ajustado, foi verificado que o acúmulo de óleo é favorecido em altas concentrações de NaNO₃ no meio de cultivo e altas intensidades luminosas, principalmente na região em que se extrapolou o limite superior dessas variáveis. Para trabalhos futuros, sugere-se a realização de experimentos nessa região experimental, pela possibilidade de obtenção de resultados superiores ao obtidos nessa dissertação.

De maneira geral, em todas as respostas avaliadas se destacou a importância do fator luminosidade, conforme afirmado por muitos autores. Na análise de todas as respostas estudadas os coeficientes de regressão calculados foram positivos, o que evidencia a necessidade de novos estudos em valores maiores de intensidade luminosa. A concentração de biomassa máxima reportada na literatura para *Nannochloropsis oculata* até o momento, de 60 g.l⁻¹ em fluxo de fótons de 3000 μmol.m².s⁻¹, é um ótimo exemplo para isso. (ZITELLI, RODOLFI & TREDICI, 2004 ; ZOU, 2000).

Embora não tenha sido possível dar prosseguimento aos estudos com enriquecimento da corrente de aeração com CO₂, em função do tempo disponível para conclusão dessa dissertação, pretende-se continuar trabalhando para avaliar a influência desta variável na produção e acúmulo de lipídios da *Nannochloropsis oculata* e de outras microalgas, pois acreditamos que os resultados podem ser extremamente significativos. Embora os problemas operacionais verificados no Experimento 1, foi com a injeção de CO₂ nos fotobiorreatores que

se obtiveram as maiores produtividades entre todos os experimentos realizados. Além disso, uma estratégia interessante seria utilizar a injeção de CO₂ para controle de pH em cultivos em batelada e semicontínuos.

Muitos avanços em engenharia genética são esperados e necessários para o aproveitamento de microalgas no setor energético (*NREL*, 2008; *TREDICI*, 2004) e também fundamental que pesquisas básicas em engenharia prossigam. Em relação ao desenvolvimento de fotobiorreatores, o principal desafio é sua escalabilidade, pois alguns dos melhores resultados experimentais são verificados em sistemas com pequeno caminho óptico (*ZITELLI, RODOLFI & TREDICI*, 2004). Também há muito a ser realizado quanto aos métodos de separação e processamento de biomassa algácea. Neste aspecto, o grupo de trabalho no qual esse trabalho está inserido direcionará seus próximos esforços ao escalonamento de fotobiorreatores, estudo do crescimento e acúmulo de lipídios de microalgas por espectrofluorometria 2D e processamento da biomassa por pirólise rápida.

Referências Bibliográficas

AMIN, S. Review on biofuel and gas production processes from microalgae. **Energy Conversion and Management**. Indonesia, 50, 1834-1840, 2009.

ARAÚJO, O. Q. F.; GOBBI, C.N.; CHALOUB, R.M.; COELHO, M.A.Z. Assessment of the impact of salinity and irradiance on the combined carbon dioxide sequestration and carotenoids production by *Dunaliella salina*: a mathematical model. **Biotechnology and Bioengineering**. Brazil, 102, 425–435, 2009.

ARAÚJO, S. de C.; GARCIA, V. M. T. Growth and biochemical composition of the diatom *Chaetoceros cf. wighamii* brightwell under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. I. Protein, carbohydrates and lipids. **Aquaculture**. Brazil, 246, 405– 412, 2005.

BEHRENS, P. W. Photobioreactors and fermentors: the light and dark sides of growing algae. In ANDERSEN, R. A. **Algal Culturing Techniques**. United States of America: Elsevier Inc, 2005. p.189-203.

BORGES, L. do V. **Caracterização do potencial de absorção do dióxido de carbono atmosférico por microalgas utilizadas na aquicultura para geração de um mecanismo de desenvolvimento limpo (MDL)**. 57f. Dissertação de Mestrado, Departamento de Oceanografia, FURG, Rio Grande, RS, Brasil, 2005.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**. Australia, 70, 313–321, 1999.

BOROWITZKA, M. A. Culturing microalgae in outdoor ponds. In ANDERSEN, R. A. **Algal Culturing Techniques**. United States of America: Elsevier Inc, 2005. p.205-218.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae – a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and coproducts. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. Ireland, 14, 557-577, 2010.

BROWN, R.; JEFFREY, S.W.; VOLKMAN, J.K.; DUNSTAN, G.A. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**. Australia, 51, 315-331, 1997.

BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**. Brasil: 32, nº 4, 849-854, 2009.

CAMPOS, V. B.; BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. de O. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. **Ciência Rural**. Brasil, 40, nº 2, 339-347, 2010.

CERRI, M. O. **Hidrodinâmica e transferência de oxigênio em três biorreatores airlift de circulação interna geometricamente semelhantes**. 178f. Tese de Doutorado, Centro de Ciências e Tecnologia, UFSCar, São Carlos, SP, Brasil, 2009.

CHISTI, M. Y. **Airlift Bioreactors**. England: Elsevier, 1989.

- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**. New Zeland, 25, 294-306, 2007.
- CONVERTI, A.; CASAZZA, A. A.; ORTIZ, E.Y.; PEREGO, P.; BORGHI, M. D. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing**. Italy, 48, 1146–1151, 2009.
- DIETZ, W. A. Response factors for Gas Chromatographic Analyses. **Journal of Gas Chromatographic**. United States of America, 1967.
- D'OCA, M. G. M.; VIÊGAS, C. V.; MACHADO, D. O. Extração de óleo da microalga *Chlorella pyrenoidosa* visando a produção de biodiesel. **XVI Encontro de Química da Região Sul**. Brasil, Novembro, 13-15, 2008.
- ENVIRONMENTAL GROWTH CHAMBERS (EGC). **Lighting Radiation Conversion**. United States of America, 2010. Disponível em <www.egc.com/useful_info_lighting.php>. Acesso em 31 mar. 2010.
- GRIMA, E. M.; BELARBIA, E.-H.; FERNÁNDEZ, F. G.; MEDINA, A. R.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**. Spain, 20, 491–515, 2003.
- GRIMA, E. M.; FERNANDÉZ, F. G. A.; MEDINA, A. R. Downstream processing of cell-mass and products. In RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. England: Blackwell Publishing, 2004. p.215-251.
- GROBBELAAR, J. U. Algal nutrition – Mineral nutrition. In RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. England: Blackwell Publishing, 2004. p.97-115.
- HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**, 6^a ed. Brasil: LTC, 2005.
- HARRISON, P. J.; BERGES, J. A. Marine culture Mmdia. In ANDERSEN, R. A. **Algal Culturing Techniques**. United States of America: Elsevier Inc, 2005. p.21-33.
- IPCC, Fourth Assessment Report: Climate Change**, 2007. Disponível em: <http://www.ipcc.ch/publications_and_data/ar4/syr/en/main.html>. Acesso em: 11 jan. 2011.
- JACOBI, A; IVANOVA, B.; POSTEN, C. Photobioreactors: hydrodynamics and mass transfer. **Proceedings of the 11th International Symposium on Computer Applications in Biotechnology**. Belgium, July, 7-9, 2010.
- KAWACHI, M.; NOEL, M-H. Sterilization and sterile technique. In ANDERSEN, R. A. **Algal Culturing Techniques**. United States of America: Elsevier Inc, 2005. p.65-81.
- LOURENÇO, S. de O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. Brasil: RiMa, 2006.

MASOJÍDEK, J.; KOBLÍŽEK, M.; TORZILLO, G. Photosynthesis in microalgae. In RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. England: Blackwell Publishing, 2004. p.20-39.

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

MENG, X.; YANG, J.; XU, X.; ZHANG, L.; NIE, Q.; XIAN, M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**. China, 34, 1-5, 2009.

MERCHUK, J. C.; GLUZ, M. **Bioreactors, Air-lift Reactors**. In: **Encyclopedia of Bioprocess Technology**. John Wiley & Sons, Inc. All, 2002.

MIRÓN, A. S.; GARCIA, M. C. C.; GÓMEZ, A. C.; CAMACHO, F. C.; GRIMA, E. M.; CHISTI, Y. Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. **Biochemical Engineering Journal**. Spain, 16, 287–297, 2003.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**, 5^a ed. United States of America: John Wiley & Sons, Inc. 2001.

NREL. A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae. Colorado, United States, 1998. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/docs/legosti/fy98/24190.pdf>>. Acesso em: 12 jan. 2011.

OHSE, S.; DERNER, R. B.; OZÓRIO, R. A.; CUNHA, P. C. R.; LAMARCA, C. P.; DOS SANTOS, M. E.; MENDES, L. B. B. Revisão: sequestro de carbono realizado por microalgas e florestas e a capacidade de produção de lipídios pelas microalgas. **INSULA**. Brasil, 36, 39-74, 2007.

OHSE, S.; DERNER, R. B.; OZÓRIO, R. A.; BRAGA, M. V. da C.; CUNHA, P.; LAMARCA, C. P.; DOS SANTOS, M. E. Produção de biomassa e teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e proteína em microalgas. **Ciência Rural**. Brasil, 39, nº 6, 1760-1767, 2009.

PEDRONI, P.; DAVISON, J.; BECKERT, H.; BERGMAN, P.; BENEMANN, J. **A proposal to establish an international network on biofixation of CO₂ and greenhouse gas abatement with microalgae**. Canada, 2001. Disponível em <<http://www.co2captureandstorage.info/networks/Biofixation.htm>>. Acesso em 12 jan. 2011.

POSTEN, C. Review: Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. **Engineering in Life Sciences**. Germany, 9, nº 3, 165–177, 2009.

RAGHAVAN, G.; HARIDEVI, C. K.; GOPINATHAN, C. P. Growth and proximate composition of the *Chaetoceros calcitrans f. pumilus* under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. **Aquaculture Research**. India, 39, 1053-1058, 2008.

- RICHMOND, A. Biological principles of mass Cultivation. In RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. England: Blackwell Publishing, 2004. p.125-177.
- RECH, R. **Bioengenharia para Engenharia Química (ITA 02003)**. Brasil: UFRGS, 2003.
- RANJAN, A.; PATIL, C.; MOHOLKAR, V. S. Mechanistic assessment of microalgal lipid extraction. **Industrial & Engineering Chemistry Research**. India, 49, 2979–2985, 2010.
- RODOLFI, L.; ZITTELLI, G. C.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G.; TREDICI, M. R. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**. Italy, 102, 1, 100-102, 2009.
- RODRIGUES, M. I. & IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos & Otimização de Processos**, 2ª ed. Brasil: Cárita, 2009.
- SHENG-YI, C.; CHIEN-YA, K.; MING-TA, T.; SEOW-CHIN, O.; CHIUN-HSUN, C.; CHIH-SHENG, L. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. **Bioresource Technology**. Taiwan, 100, 833–838, 2009.
- SOARES, D. **Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídios de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo**. 107f. Dissertação de Mestrado, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR, Curitiba, PR, Brasil, 2010.
- SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Optimization of *Nannochloropsis oculata* growth using the response surface method. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, France, 81, 1049–1056, 2006.
- TREDICI, M. Mass production of microalgae: photobioreactors. In RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. England: Blackwell Publishing, 2004. p.178-214.
- TOMASELLI, L. The microalgal cell. In RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. England: Blackwell Publishing, 2004. p.3-19.
- UGWU, C. U.; AOYAGI, H.; UCHIYAMA, H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. **Bioresource Technology**. Japan, 99, 4021–4028, 2008.
- VONSHAK, A; TORZILLO, G. Environmental stress physiology. In RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. England: Blackwell Publishing, 2004. p.57-82.
- WANG, B.; LI, Y.; WU, N.; LAN, C. Q. CO₂ bio-mitigation using microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Germany, 79, 707–718, 2008.
- WOOD, A. M.; EVERROAD, R. C.; WINGARD, L. M. Measuring growth rates in microalgal cultures. In ANDERSEN, R. A. **Algal Culturing Techniques**. United States of America: Elsevier Inc, 2005. p.269-285.

YUAN-KUN, L. & HUI, S. Basic culturing techniques. In RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. England: Blackwell Publishing, 2004. p. 40-56.

ZITTELLI, G. C.; LAVISTA, F.; BASTIANINI, A.; RODOLFI, N.; VINCENZINI, M.; TREDICI, M. R. Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis sp.* cultures in outdoor tubular photobioreactors. **Journal of Biotechnology**. Italy, 70, 299–312, 1999.

ZITTELLI, G. C.; RODOLFI, L.; TREDICI, M. R. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products – species of high potential. Mass cultivation of *Nannochloropsis* in closed systems. In RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Oxford: Blackwell Publishing, 2004. p.298-303.

ZOU, N.; ZHANG, C.; COHEN, Z.; RICHMOND, A. Production of cell mass and eicosapentaenoic acid (EPA) in ultrahigh cell density cultures of *Nannochloropsis sp.* (*Eustigmatophyceae*). **European Journal of Phycology**. 35: 2, 127 -133, 2000.

Apêndice A

Informações Adicionais

A.1 Infraestrutura Para o Cultivo de Microalgas

Há vários fatores que influenciam o crescimento de microalgas: fatores abióticos, como luz (comprimento de onda, intensidade), temperatura, concentração de nutrientes (N, P, Si, Fe, vitaminas, metais, etc.), O₂, CO₂, pH, e salinidade; fatores bióticos, como competição por patógenos (bactérias, fungos, vírus, mais frequente em cultivos não salinos) e por outras algas; e ainda fatores operacionais, tais como o cisalhamento produzido pela mistura, a taxa de diluição, a penetração de luz, a frequência de colheita e a adição de fontes de carbono orgânicas e inorgânicas (bicarbonato). Em função dessas necessidades, o cultivo de microalgas requer a disponibilidade de instalações apropriadas, bem como uma série de materiais para viabilizar sua realização, como equipamentos, vidrarias adequadas, água de boa qualidade e reagentes para preparação de meios de cultivo (BRENNAN & OWENDE, 2010; CHISTI, 2007; LOURENÇO, 2006; MATA *et al.*, 2010).

Em um laboratório de cultivo de microalgas, a existência de sistemas de controle de temperatura possibilita a sua manutenção em valores estáveis, o que é desejável no cultivo de microalgas, pois proporcionam mais estabilidade em experimentos e mesmo em operações de rotina de cultivo, sendo adequado determinar os valores desejados de acordo com a

característica específica das espécies e dos interesses do cultivo. Em consequência há a tendência de maior reprodutibilidade e previsibilidade das respostas das espécies, pois temperatura é um dos fatores fundamentais na taxa metabólica dos organismos. (LOURENÇO, 2006).

A iluminação é outra variável importante no cultivo de microalgas. No mercado há diversos tipos de lâmpadas fluorescentes, cuja iluminação proporciona os melhores resultados no cultivo de microalgas. As lâmpadas do tipo luz do dia são as que melhor simulam a amplitude de comprimentos de onda necessária para a fotossíntese (350-700 nm) e geralmente utiliza-se lâmpadas de 40W ou 20W. É adequado que o sistema elétrico que controla a iluminação seja dotado de um temporizador acoplado para ajustes de fotoperíodo, comumente padronizado em 12 h: 12 h luz/escuro para manutenção de cultivos em laboratório. Outros regimes de fotoperíodo (18 h: 6 h luz/escuro, por exemplo) são mais comuns em sistemas experimentais, mas isso geralmente não acarreta aumento significativo no crescimento de espécies de microalgas. Espécies oceânicas, por exemplo, geralmente não toleram cultivo sob luz contínua. (LOURENÇO, 2006).

Quanto à intensidade da luz, para cultivos de rotina de microalgas geralmente utiliza-se densidade de fluxo fotônico de 60 a 70 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, enquanto que para manutenção de cepas em tubos de ensaio 20 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Para medir a frequência da radiação luminosa pode-se utilizar um irradiômetro e para medir sua intensidade pode-se utilizar um luxímetro, porém a maioria desses equipamentos limita-se a medidas na superfície dos frascos de cultivo (LOURENÇO, 2006).

Para manipulação dos cultivos, é adequado utilizar uma câmara de transferência, ambiente cujo objetivo é apresentar o mínimo de pó e probabilidade de contaminação. As capelas de fluxo laminar são a forma clássica dessas câmaras, que faz circular ar livre de micro-organismos na área interna de trabalho. Isto é atingido em função das capelas serem dotadas de filtros de ar especial de alta eficiência e de lâmpadas ultravioletas que irradiam o ambiente pré-operação para destruição de micro-organismos, com radiação de aproximadamente 260 nm por 10 ou 15 minutos. Antes de iniciar o trabalho estéril a superfície da câmara deve ser limpa com álcool 70% para remover a poeira e esporos e

assegurar um bom estado do meio ambiente de trabalho. (LOURENÇO, 2006; KAWACHI & NOEL, 2005).

Em experimentos de laboratório deseja-se a obtenção controlada de biomassa algácea, porém micro-organismos como bactérias e fungos são competidores por nutrientes disponíveis em meios de cultura. A esterilização de materiais e reagentes pode ser realizada através de vários métodos, como calor úmido, calor seco, filtração, aplicação de radiação ultravioleta, esterilização em forno de micro-ondas e cloração. Após os tratamentos de esterilização, os materiais devem ser armazenados em recipientes limpos e livres de poeira, armários ou prateleiras e armazenamento refrigerado é frequentemente usado para meios de cultura. (LOURENÇO, 2006; KAWACHI & NOEL, 2005).

Os frascos de cultivo mais comumente usados em cultivo de microalgas em volumes pequenos incluem erlenmeyers, tubos e balões confeccionados em vidro, sendo os de borossilicato preferidos em função de sua durabilidade e resistência a tratamentos térmicos de esterilização. Os frascos de cultivo maiores que 100 ml são geralmente tampados com algodão hidrófobo envolvido com capa de gaze. Para frascos pequenos e tubos utiliza-se tampas de metal ou plástico e também folhas de papel alumínio, para evitar a contaminação do conteúdo estéril. Para os procedimentos de inoculação pode-se utilizar instrumentos metálicos, como as alças, de vidro, como pipetas de Pasteur, ou de plástico, como ponteiras, porém todos devem ser resistentes a tratamento químico para esterilização (LOURENÇO, 2006).

Para tratamento de materiais novos, recomenda-se a imersão em solução de ácido diluída (1M HCl) por uma semana. De forma eficiente, mas menos rigorosa, pode-se realizar a lavagem com detergente de laboratório neutro (sem fósforo). Após o procedimento deve-se lavar com água de torneira corrente e enxaguar com água destilada e deionizada. Já materiais sujos que foram utilizados para culturas devem ser autoclavados para matar as células. Se houver líquidos, após a autoclavagem devem ser descartados e os recipientes lavados com água corrente. Os recipientes devem ser imersos em um banho com detergente neutro por toda noite e após lavados com escova ou esponja e enxaguados abundantemente com água corrente. O enxágue final deve ser feito com água destilada ou deionizada, após a vidraria

pode ser colocada em estufa para secagem e abrigada em área seca e protegida de poeira (KAWACHI & NOEL, 2005).

A esterilização de meios líquidos de cultura é normalmente realizada por autoclavagem, seguido por um período de resfriamento. A aparência do meio de cultura deve ser verificada e caso haja alteração de cor ou formação de precipitado, este deve ser descartado. De maneira geral, as soluções estoque de cada componente do meio são preparadas em frascos autoclaváveis separadamente e também são submetidas ao processo de autoclavagem, sendo posteriormente armazenadas em refrigeração. Para manter a esterilidade as soluções devem ser manuseados assepticamente. Se o crescimento de fungos ou bactérias for descoberto, os meios de cultura e soluções-estoque devem ser substituídos. (KAWACHI & NOEL, 2005).

Para itens cujo material, tamanho ou outra característica não permite a autoclavagem, alternativamente é adequado realizar a desinfecção com hipoclorito de sódio, método que é utilizado para grandes volumes de água na aquicultura. O procedimento requer neutralização do cloro não consumido com tiosulfato de sódio. Para líquidos com componentes sensíveis ao calor, a esterilização pode ser realizada com filtros de poro menores que 2 μm , como é o caso das vitaminas, que por ser instáveis ao calor, são adicionadas ao meio de cultura após a autoclavagem. Para a corrente de aeração, quando utilizada, deve-se adotar a filtração do ar para retenção de microorganismos indesejados, seja por meio de membranas específicas (0,22 μm de poro) ou por meio de filtros artesanais com camadas de lã de vidro e algodão dentro de cilindros de vidro ou plástico. (LOURENÇO, 2006. KAWACHI & NOEL, 2005).

A.2 Operação da Capela de Fluxo Laminar

Os seguintes procedimentos gerais foram adotados para preparação de meios de cultivo, manuseio de materiais esterilizados, repicagem do banco de células e de inóculos na capela de fluxo laminar:

1. Limpeza da superfície de trabalho com solução aquosa de etanol a 70%.
2. Motor e lâmpadas ultravioletas são ligadas por 10 min com a capela fechada.
3. Desligamento das lâmpadas ultravioletas.
4. Colocação do material de trabalho devidamente organizado no interior da capela (erlenmeyers, tubos, pipetas, frascos de soluções, etc).
5. Lâmpadas ultravioletas ligadas por mais 10 min.
6. Colocação de avental e luvas descartáveis pelo operador.
7. Higienização das luvas com solução aquosa de etanol a 70%.
8. Desligamento das lâmpadas ultravioletas.
9. Início do manuseio de material com a capela semi-aberta, de acordo com a recomendação do fabricante do equipamento.
10. Retirada do material após manuseio.
11. Limpeza da superfície de trabalho com solução aquosa de etanol a 70%.
12. Lâmpadas ultravioletas ligadas por mais 10 min.
13. Desligamento de lâmpadas ultravioletas e do motor.

A.3 Operação da Autoclave

O seguinte procedimento foi adotado para utilização da autoclave na esterilização de materiais limpos e sujos:

1. Preenchimento do compartimento de aquecimento com água destilada até o nível estabelecido pelo fabricante.
2. Colocação do material a ser esterilizado no interior do cesto.
3. Fechamento da tampa da autoclave de acordo com o procedimento estabelecido pelo fabricante.
4. Com a válvula de saída de vapor aberta, a autoclave é ligada em potência máxima para aquecimento da água.
5. Após verificação da saída de vapor pela válvula, a mesma é fechada até a pressão de vapor atingir 2 bar (121°C), quando diminui-se a potência de aquecimento

- suficientemente para manter essas condições por 30 min (material limpo) ou 45 min (material sujo).
6. Após transcorrido o período de esterilização, a autoclave é desligada e a válvula de saída do vapor é lentamente aberta até atingir equilíbrio com a pressão externa.
 7. Após resfriado o material pode ser retirado da autoclave.

A.4 Especificações de Materiais e Equipamentos Utilizados

A.4.1 Reagentes

Sal marinho Red Sea

Nitrato de sódio (NaNO_3) P. A. Vetec

Fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) P. A. Vetec

Metassilicato de sódio ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) P. A. Vetec

Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) P. A. Vetec

Sulfato de zinco heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) P. A. Vetec

Cloreto de cobalto II hexahidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) P. A. Vetec

Cloreto de manganês II tetra hidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) P. A. Vetec

Molibdato de sódio dihidratado ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) P. A. Vetec

Cloreto de ferro III hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) P. A. Vetec

EDTA sal dissódico (Na_2EDTA) P. A. Vetec

Tiamina (B_1) importada

Cianocobalamina (B_{12}) importada

Biotina (B_7) importada

Tris-(hidroximetil)-aminometano ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) P. A. Vetec

Ácido clorídrico (HCl) P. A. Vetec

Hipoclorito de sódio (NaClO) 10-12% Aracruz

Tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) P. A. Vetec

Hexano (C_6H_{14}) P. A. Dinâmica

Clorofórmio (CHCl_3) P. A. Vetec

Metanol (CH_3OH) P. A. F. Maia

Sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) Synth

Cloreto de potássio (KCl) P. A. Vetec

Cloreto de sódio (NaCl) P. A. Vetec

A.4.2 Material e Equipamentos de Laboratório

Agitador Tecnal TE-0851

Algodão hidrófobo Cremer

Atadura de crepom Neve

Autoclave Vertical CS Primatec

Balança Analítica Bosch SAE 200

Balança Analítica Marte AY220

Balança Analítica Shimadzu AY220

Balança Semi-analítica Marte

Bomba de vácuo Marconi MA 760

Bomba peristáltica DM 900/ AW 900 Provitec

Câmara de Neubauer Brand Improved Bright-Line $0,0025 \text{ mm}^2$ profundidade 0,100 mm

Capela de fluxo laminar vertical Pachane PA 50

Centrífuga refrigerada Cientec CT-5000R

Espectrofotômetro UV-1600 Pró-Análise

Estufa Biomatic

Filtros de microfibras de vidro de $0,2 \mu\text{m}$ poro 47 mm diâmetro Hexis Sartorius

Filtros de microfibras de vidro de $0,7 \mu\text{m}$ poro (GF-3) 125 mm diâmetro Marcherey-Nagel

Freezer Electrolux H210

Liofilizador Terroni LS6000

Luxímetro Instrutherm LD-200

(Escala de 0,01 a 200.000 lux em quatro faixas. Precisão de $\pm 3\%$ em valores menores que 10.000 lux e $\pm 4\% \pm 10\%$ dígitos em valores acima de 10.000 lux)

Manta de aquecimento Fisatom 202

Medidor de oxigênio dissolvido Digimed DM-4P

Medidor de pH Digimed DM-22

Medidor digital de fluxo Varian ®

Microscópio com câmera USB Opton TIM-108

N_2 gasoso White Martins 5.0 Analítico

Papel indicador pH 0-14 Merck
Refratômetro Instrutherm RTS-101ATC
(Resolução 1%)
Refrigerador Consul Biplax CRM45 Frost Free
Rotaevaporador Quimis Q-344B2
Sistema de purificação de água Direct-Q 3 Millipore
Termômetro de bulbo Incoterm L-203
(Divisão 1 °C)
Ultrafreezer Terroni
Ultrassom Unique 1400A MaxiClean 40kHz

A.4.3 Incubadora

Aquecedor termoventilador Ventisol A-02
Compressor Big Air A320
Controlador e indicador de temperatura Novus N322
(Resolução de 0,1 °C)
Lâmpadas fluorescentes Universal Duramax Super Luz do Dia 20W (4)
Refrigerador Electrolux R280
Rotâmetro de ar Dwyer Instruments MMA-21
(Acuracidade $\pm 10\%$ da escala completa)
Temporizador Novus TM 6331

A.4.4 Planta de Fotobiorreatores

Agitadores de aquário Sarlobetter S300 (2)
Aquecedores Hot 100 e 150W (3)
Ar condicionado Springer
Bomba submersível Atman PH-400
CO₂ gasoso Industrial Air Liquide
Compressores eletromagnéticos Boyu ACQ-003 (2)
Controladores de temperatura Fullgauge TIC-17RGTi (3)
(Resolução de 0,1 °C)
Mangueiras de silicone Silitec
Miniválvula solenóide SIER SL 030

Pedras porosas 15 mm diâmetro (50)
Pressurizadores Texius TPGC-Mini 120W (2)
Regulador de pressão para cilindro Condor
Temporizadores Novus TM 6331 (3)
Banho refrigerador Servilab SE 100-AG 1000W
Válvula agulha
Ventilador Mallory
Rotômetros de ar em plástico 250 - 2500 ml Dwyer Instruments MMA-21 (14)
(Acuracidade $\pm 10\%$ da escala completa)
Rotômetro de ar em plástico 1 - 10 l Dwyer Instruments MMA-23 (1)
(Acuracidade $\pm 10\%$ da escala completa)
Rotômetro de ar em plástico 2,5 - 25 l Dwyer Instruments MMA-24 (1)
(Acuracidade $\pm 10\%$ da escala completa)
Rotômetros de ar em metal 100 ml Dwyer Instruments RMA-150-SSV (2)
(Acuracidade $\pm 4\%$ da escala completa)
Rotômetro de ar em metal 250 ml Dwyer Instruments RMA-11-SSV (1)
(Acuracidade $\pm 4\%$ da escala completa)
Rotômetros de ar em metal 500 ml Dwyer Instruments RMA-12-SSV (3)
(Acuracidade $\pm 4\%$ da escala completa)

A.5 Preparação de Soluções Estoque

A.5.1 Solução salina (Sal marinho) 33,3 g.l⁻¹

Em um erlenmeyer de 6 l foram solubilizados 199,8 g do sal em água destilada, com auxílio de um agitador magnético. Após 30 minutos de solubilização, a solução foi filtrada com filtros de 0,7 μm de poro e armazenada em frascos Duran de 1 l para autoclavagem.

A.5.2 Nitrato (NaNO_3) 75 g.l⁻¹

Em um balão volumétrico foram solubilizados 7,5000 g do sal em água destilada até completar 100 ml. O conteúdo foi armazenado em frasco de vidro âmbar de 100 ml para autoclavagem.

A.5.3 Fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 5 g.l⁻¹

Em um balão volumétrico foram solubilizados 0,5000 g do sal em água destilada até completar 100 ml. O conteúdo foi armazenado em frasco de vidro âmbar de 100 ml para autoclavagem.

A.5.4 Silicato ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) 30 g.l⁻¹

Em um balão volumétrico foram solubilizados 3,0000 g do sal em água destilada até completar 100 ml. O conteúdo foi armazenado em frasco plástico de 100 ml para autoclavagem.

A.5.5 Metais

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 9,8 mg.l⁻¹

Em um balão volumétrico foram solubilizados 0,9800 g do sal em água destilada até completar 100 ml. O conteúdo foi armazenado em frasco de 100 ml para preparação final da solução de metais.

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22,2 mg.l⁻¹

Em um balão volumétrico foram solubilizados 2,2200 g do sal em água destilada até completar 100 ml. O conteúdo foi armazenado em frasco de 100 ml para preparação final da solução de metais.

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 mg.l⁻¹

Em um balão volumétrico foram solubilizados 1,0000 g do sal em água destilada até completar 100 ml. O conteúdo foi armazenado em frasco de 100 ml para preparação final da solução de metais.

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 180 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$

Em um balão volumétrico foram solubilizados 18,0000 g do sal em água destilada até completar 100 ml. O conteúdo foi armazenado em frasco de 100 ml para preparação final da solução de metais.

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 6,3 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$

Em um balão volumétrico foram solubilizados 0,6300 g do sal em água destilada até completar 100 ml. O conteúdo foi armazenado em frasco de 100 ml para preparação final da solução de metais.

Após a preparação de cada uma das soluções de metais, em um balão de 1000 ml foram solubilizados 3,15 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 4,36 g de Na_2EDTA em água destilada (aproximadamente 500 ml). Após a solubilização desses componentes, foram adicionados 1 ml de cada uma das soluções de metais previamente preparadas e o volume foi completado com água destilada até 1 l. O conteúdo foi armazenado em frasco âmbar de 1000 ml para autoclavagem.

A.5.6 Vitaminas

Cianocobalamina (B_{12}) 0,5 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$

Em um balão volumétrico foram solubilizados 0,5000 g da vitamina em água destilada até completar 1000 ml. O conteúdo foi armazenado em frasco de 1000 ml para preparação final da solução de vitaminas.

Biotina (B_7) 0,5 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$

Em um balão volumétrico foram solubilizados 0,5000 g da vitamina em água destilada até completar 1000 ml. O conteúdo foi armazenado em frasco de 1000 ml para preparação final da solução de vitaminas.

Tiamina (B₁) 100 mg.l⁻¹

Em um balão volumétrico de 1000 ml foram solubilizados 0,1000 g da vitamina em água destilada (aproximadamente 750 ml). Após a solubilização desse componente, foram adicionados 1 ml de cada uma das soluções de vitaminas previamente preparadas e o volume foi completado com água destilada até 1 l. O conteúdo foi submetido a procedimento de esterilização por filtração em sistema dotado de membrana de 0,2 µm de poro em capela de fluxo laminar. A solução foi armazenada em frascos âmbar de diferentes volumes (50, 250 ml), envolvidos com folhas de alumínio e congelados para utilização conforme a demanda de preparação de meio de cultivo.

A.5.7 Solução tampão de tris-HCl

Em um béquer de 500 ml foram solubilizados 50 g de tris (hidroximetil)-aminometano em água destilada (aproximadamente 150 ml), com auxílio de um agitador magnético. Entre 25 a 30 ml de ácido clorídrico foram lentamente adicionados para ajustar o valor de pH entre 7,1 a 7,3, monitorado por um sensor inserido na solução. Após o ajuste de pH e a solubilização o volume foi completado a aproximadamente 200 ml e a solução foi armazenada em frasco de vidro para posterior autoclavagem. Na preparação do meio f/2 com tampão, 1 ml dessa solução foi adicionado após a adição das demais soluções estoque (GUILLARD, 1975 apud MEINERZ, 2007).

A.5.8 Tiosulfato de sódio 50 g.l⁻¹

Em um balão volumétrico foram solubilizados 50,0000 g do sal em água destilada até completar 1000 ml. O conteúdo foi armazenado em frasco plástico de 1000 ml. Esta solução não faz parte do meio de cultivo, somente é utilizada para neutralização de hipoclorito de sódio remanescente dos procedimentos de assepsia dos fotobiorreatores.

A.5.9 Cloreto de potássio 0,88 %

Em um balão volumétrico foram solubilizados 8,8000 g do sal em água destilada até completar 1000 ml. O conteúdo foi armazenado em frasco de 1000 ml para utilização na determinação de lipídios.

A.5.10 Cloreto de sódio 1%

Em um balão volumétrico foram solubilizados 10,0000 g do sal em água destilada até completar 1000 ml. O conteúdo foi armazenado em frasco de 1000 ml para utilização na determinação de lipídios.

A.6 Imagens

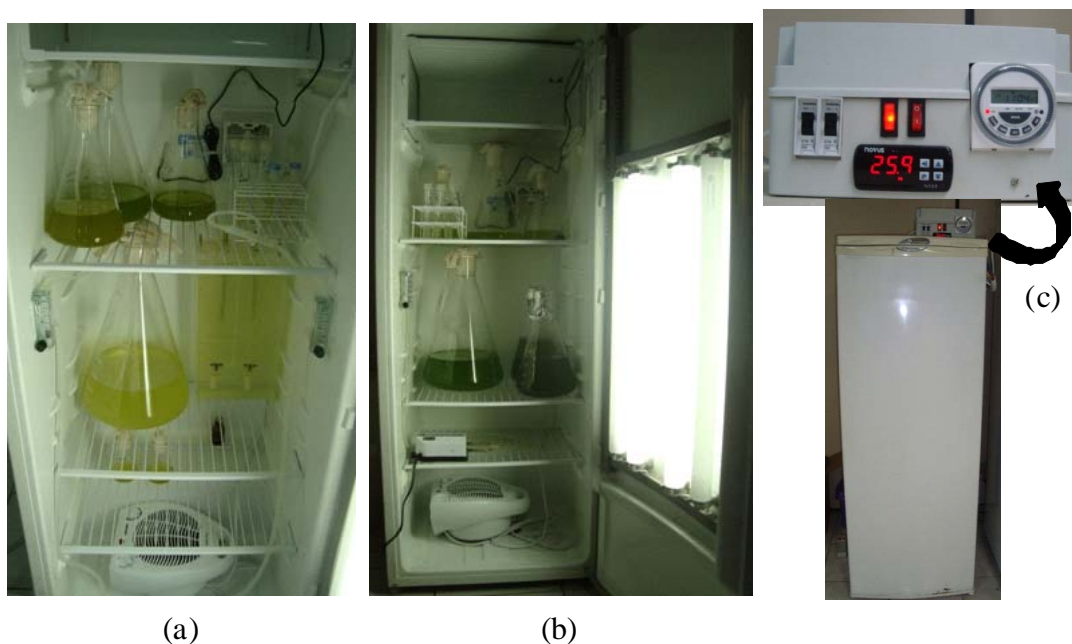


Figura A.1: Câmara incubadora utilizada para manutenção do banco de células e inóculos. (a) e (b) Incubadora em utilização. c) Painel para controle de temperatura e fotoperíodo.

A.7 Calibração dos Rotômetros

Para recalibração dos rotômetros utilizados, foi utilizado um bolhometro de vidro graduado de 100 ml, com precisão de ± 1 ml. O bolhometro foi internamente molhado com água destilada e detergente, numa composição suficiente para formação de bolhas. À sua extremidade inferior foi conectado o rotômetro que desejava-se calibrar por meio de uma mangueira de silicone. Com o escoamento do ar (ou CO₂) pela coluna do instrumento ocorreu a formação de uma bolha, cuja interface foi visualmente acompanhada até percorrer uma “distância” de 30 ml; o tempo necessário para isto ocorrer foi cronometrado, o que permitiu o cálculo da respectiva vazão (ml.min⁻¹) dada no respectivo ponto de calibração do rotômetro. Os rotômetros de 2500 ml responsáveis pelas vazões de cada fotobiorreator foram calibrados em triplicatas em três vazões, 500, 750 e 1000 ml.min⁻¹, pois a vazão de trabalho durante os experimentos com microalgas foi de 750 ml.min⁻¹. Os rotômetros de CO₂ de 100, 250 e 500 ml foram calibrados em mais pontos também em triplicatas. Além dos procedimentos mencionados, foi utilizado um medidor digital de fluxo para confirmação da calibração e localização da vazão de trabalho.

As curvas de calibração obtidas para cada rotômetro podem ser vistas nas Figuras A.2 a A.15. O ponto vermelho indica a correspondência entre o valor desejado (750 ml.min⁻¹) e a escala original do rotômetro. Nas Figuras A.13 a A.15 não são apresentados os desvios padrão das medidas por fins de simplificação, já que os mesmos ficaram bem próximos de zero (entre 0,1 e 6,8%).

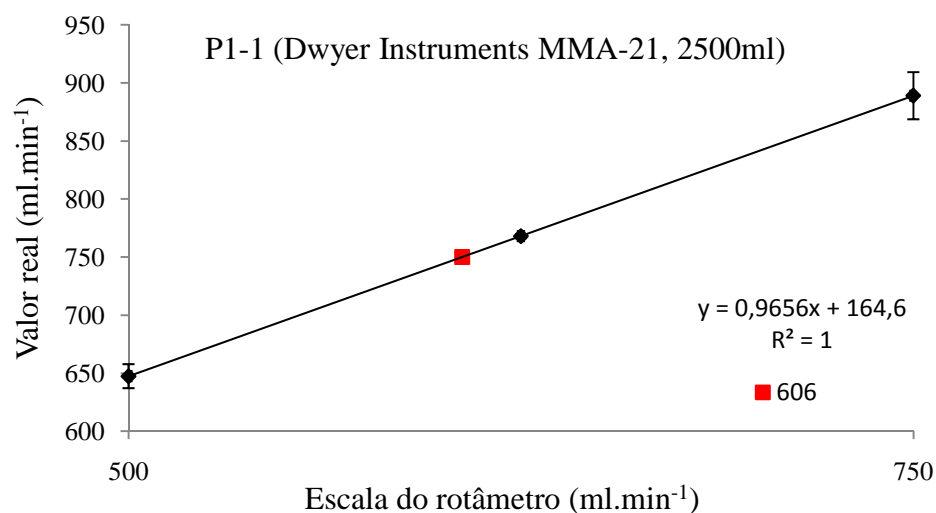


Figura A.2: Rotâmetro utilizado na medição de vazão do fotobiorreator P1-1.

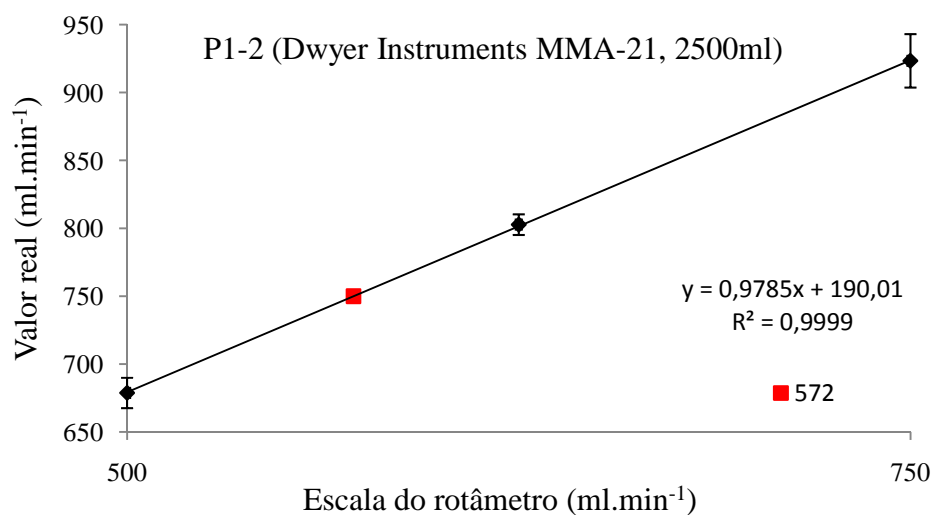


Figura A.3: Rotâmetro utilizado na medição de vazão do fotobiorreator P1-2.

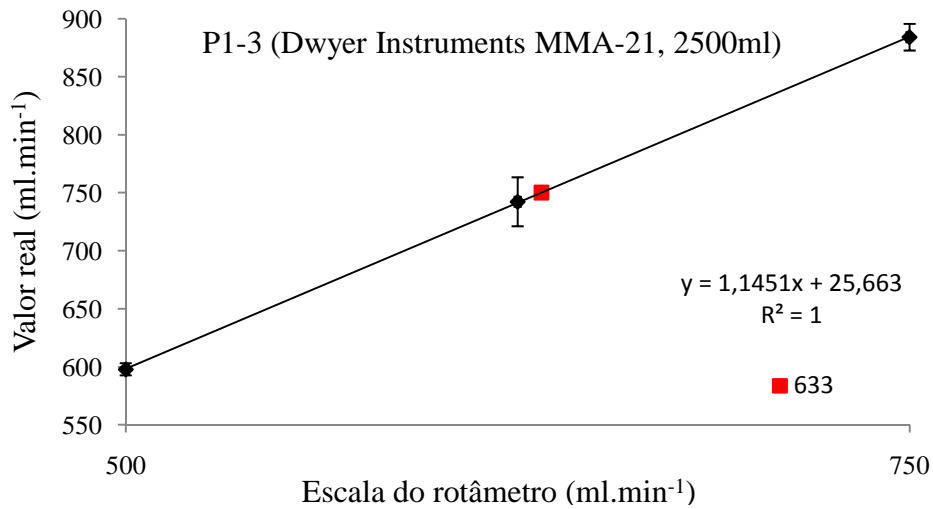


Figura A.4: Rotômetro utilizado na medição de vazão do fotobiorreator P1-3.

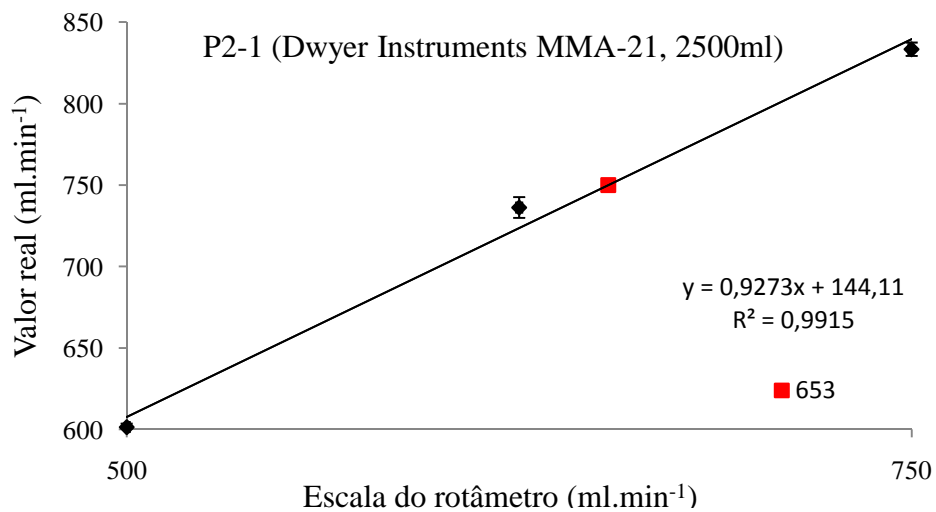


Figura A.5: Rotômetro utilizado na medição de vazão do fotobiorreator P2-1.

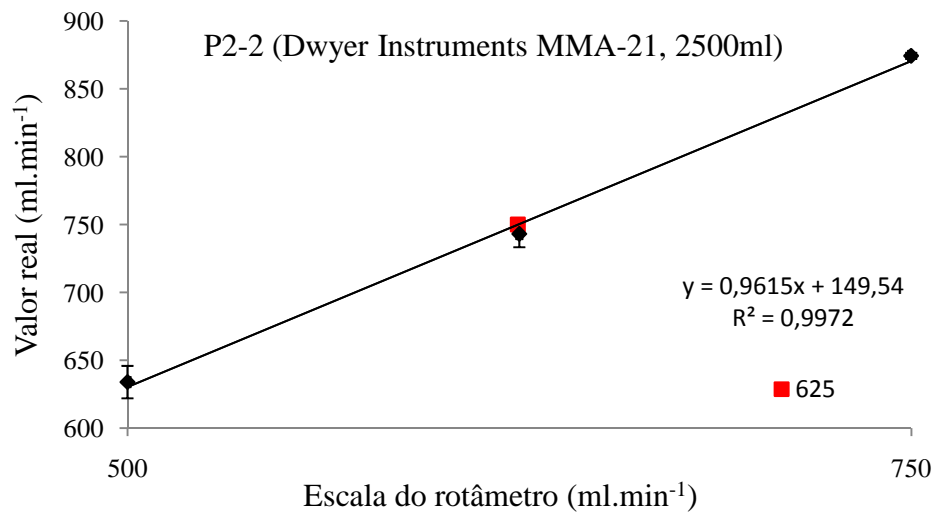


Figura A.6: Rotômetro utilizado na medição de vazão do fotobiorreator P2-2.

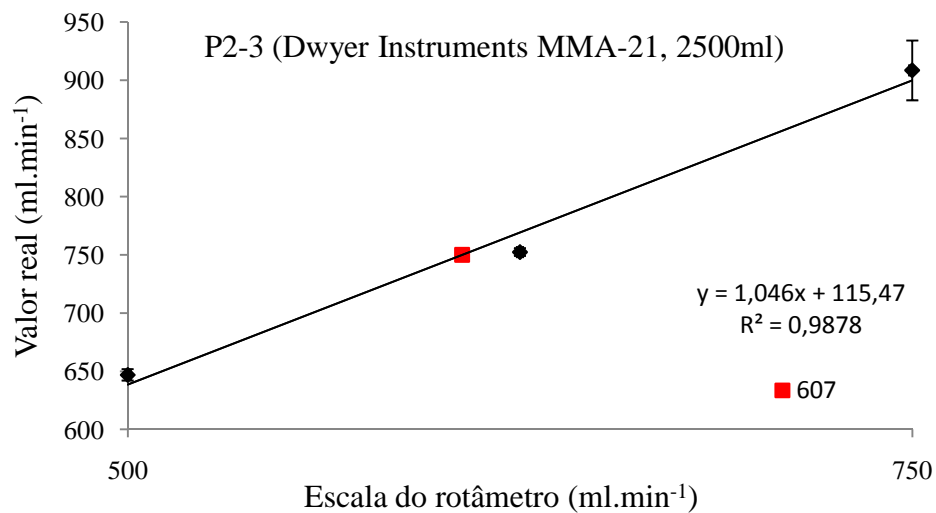


Figura A.7: Rotômetro utilizado na medição de vazão do fotobiorreator P2-3.

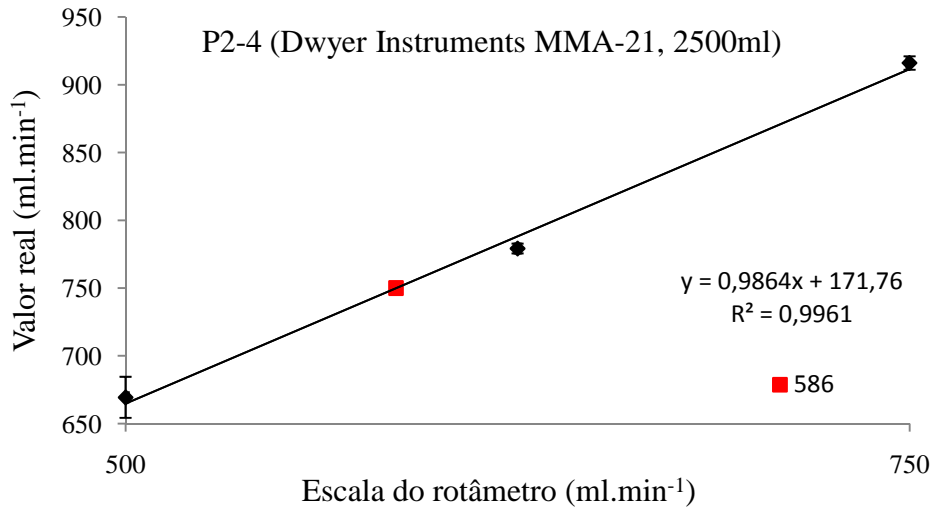


Figura A.8: Rotâmetro utilizado na medição de vazão do fotobiorreator P2-4.

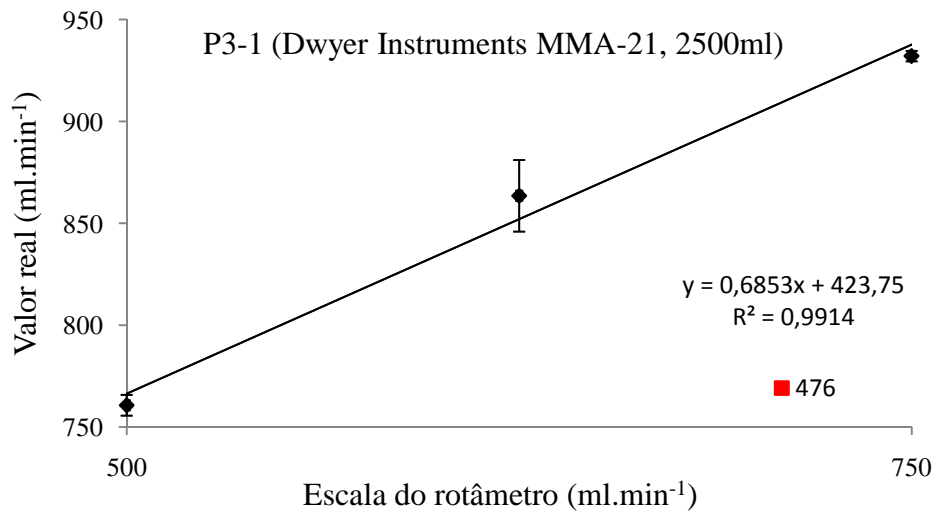


Figura A.9: Rotâmetro utilizado na medição de vazão do fotobiorreator P3-1.

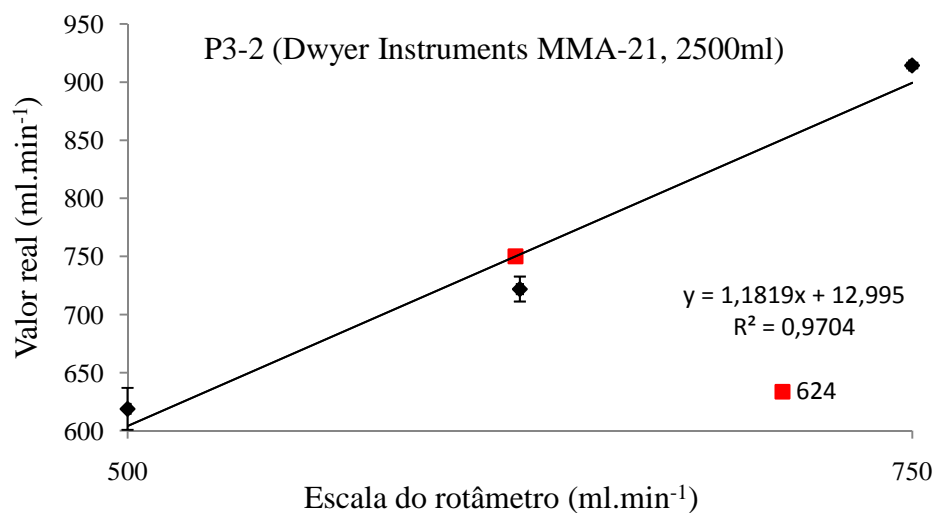


Figura A.10: Rotâmetro utilizado na medição de vazão do fotobiorreator P3-2.

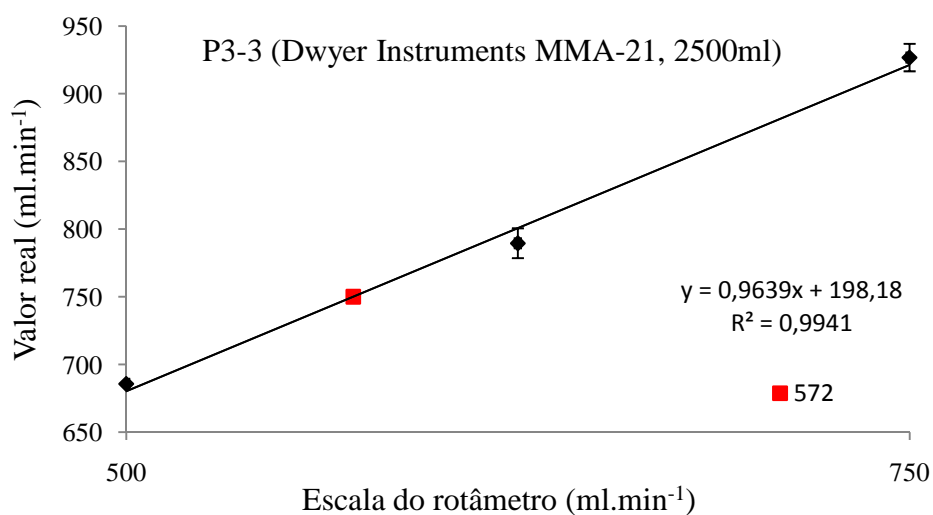


Figura A.11: Rotâmetro utilizado na medição de vazão do fotobiorreator P3-3.

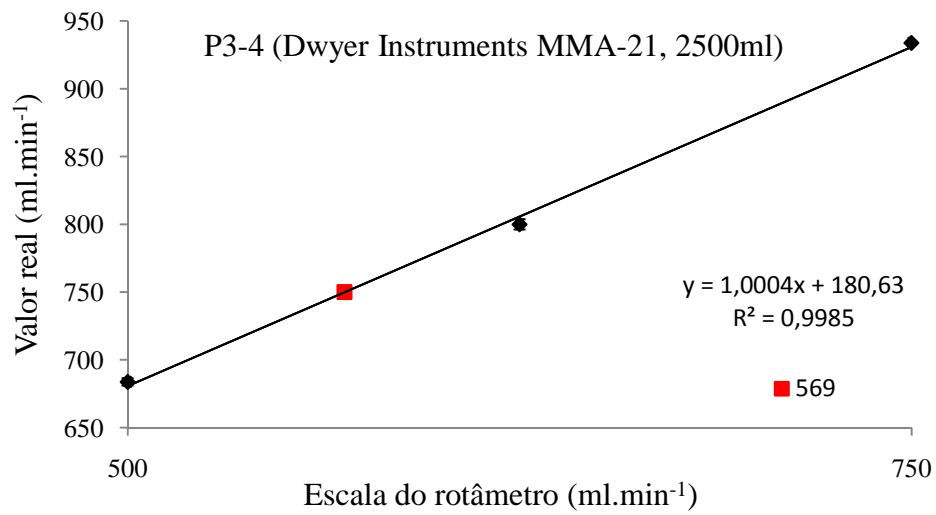
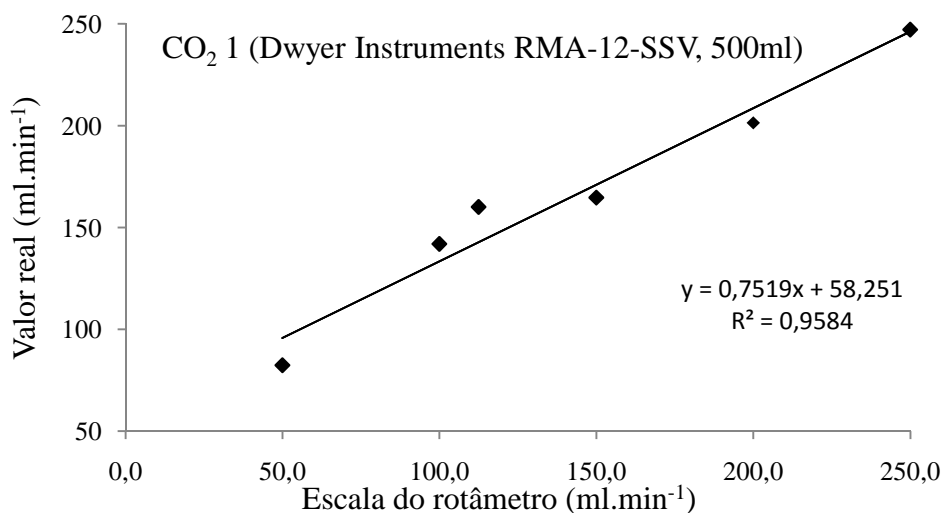
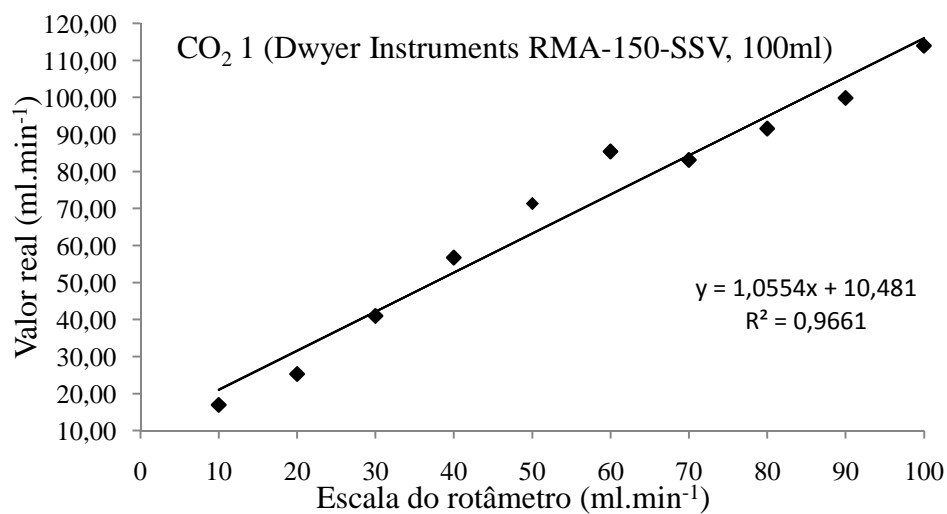


Figura A.12: Rotâmetro utilizado na medição de vazão do fotobiorreator P3-4.

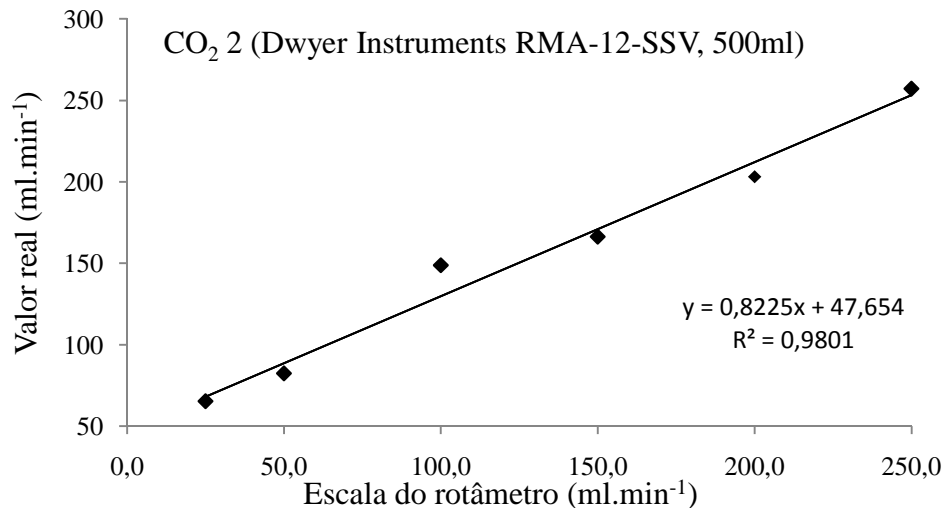


(a)

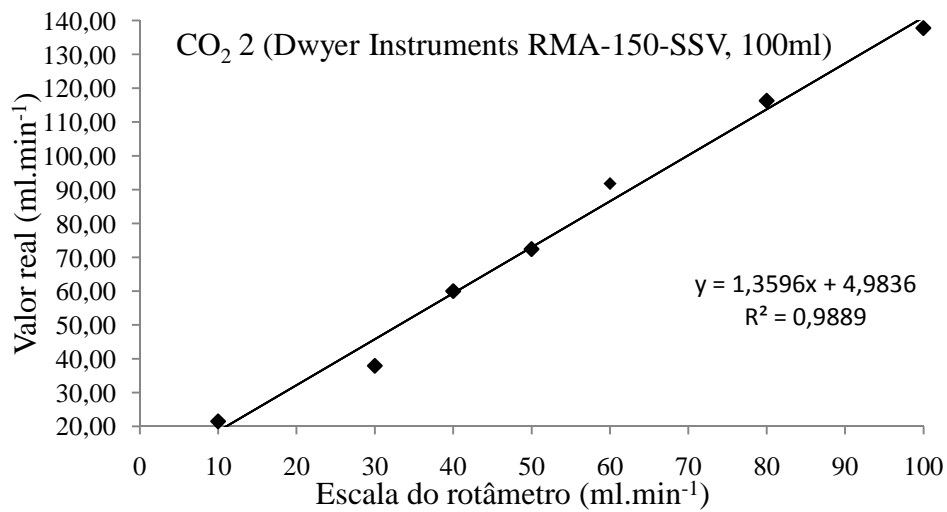


(b)

Figura A.13: Rotômetros utilizados para dosagem de CO₂ na mistura 1.

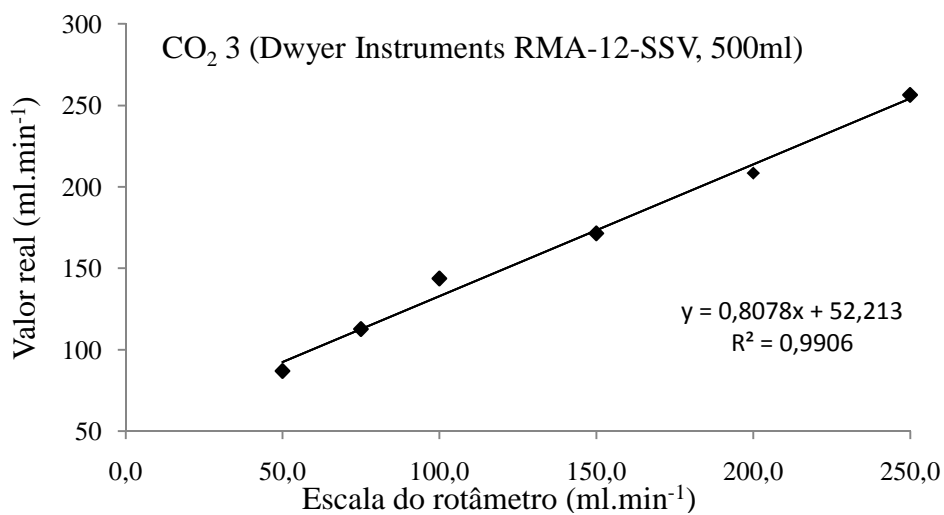


(a)

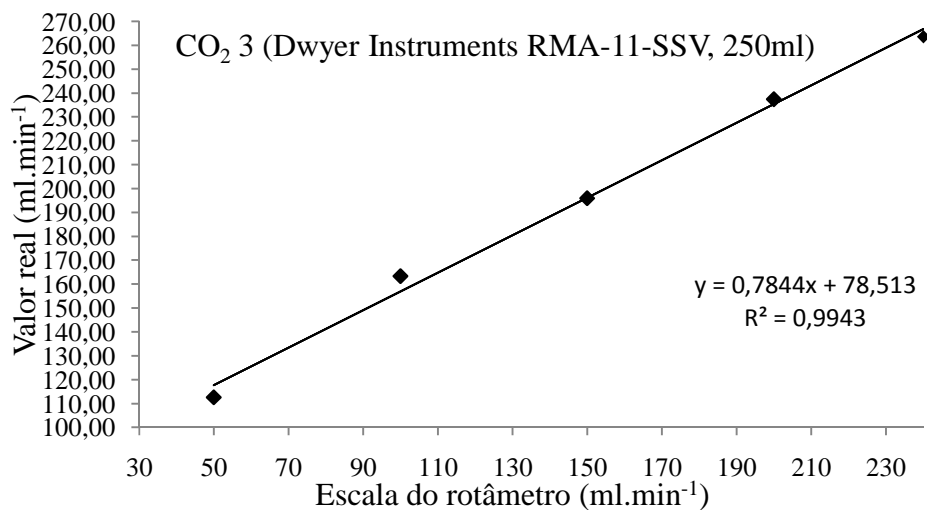


(b)

Figura A.14: Rotômetros utilizados para dosagem de CO₂ na mistura 2.



(a)



(b)

Figura A.15: Rotômetros utilizados para dosagem de CO₂ na mistura 3.

Apêndice B

Resultados Complementares

B.1 Experimento 1

Os resultados obtidos nas análises das correntes de aeração realizadas por cromatografia gasosa podem ser vistas na Tabela B.1, calculados pela Equação B.1, onde F representa os fatores de resposta e A as áreas de picos correspondentes.

$$\%CO_2 = \frac{A_{CO_2} \cdot F_{CO_2}}{(A_{CO_2} \cdot F_{CO_2}) + (A_{Ar} \cdot F_{N_2} \cdot 0,79) + (A_{Ar} \cdot F_{O_2} \cdot 0,21)} \quad (B.1)$$

Tabela B.1: Resultados obtidos nas análises cromatográficas das correntes de aeração do Experimento 1.

Percentual desejado	Replicata	Área do pico de ar	Área do pico de CO ₂	% CO ₂ medido ¹	Vazão correspondente na escala do rotâmetro de 500 ml.min ⁻¹	Vazão total da mistura ar/CO ₂
2	1	2526219,29	47697,58	2,4	~ 25	3 l.min ⁻¹ para 4 fotobiorreatores
2	2	2481766,14	46734,97	2,4	~ 25	
2	3	2631082,15	50184,48	2,4	~ 25	
2	4	2014186,79	36080,59	2,3	~ 25	
3	1	3019365,31	68042,32	2,9	~ 112,5	2,25 l.min ⁻¹ , para 3 fotobiorreatores
3	2	2597382,78	60788,68	3,0	~ 112,5	
3	3	2428229,29	53065,55	2,8	~ 112,5	
3	4	2542761,4	52146,21	2,6	~ 112,5	
4	1	2313115,11	65474,59	3,6	~ 60	3 l.min ⁻¹ , para 4 fotobiorreatores
4	2	2558999,58	65587,15	3,3	~ 60	
4	3	2674654,18	78344,9	3,7	~ 75	
4	4	2575297,78	82297,87	4,0	~ 75	

¹ Fatores de resposta: N₂ = 0,67; O₂ = 0,8; CO₂ = 0,915 (DIETZ, 1967).

Embora as composições tenham sido ajustadas antes do início dos experimentos, a posterior calibração dos rotâmetros de 500 ml utilizados mostrou a baixa precisão dos instrumentos nas faixas de trabalho (entre 25 e 125 ml.min⁻¹ na escala original dos rotâmetros), como pode ser visto nas Figuras A.13 a, A.14 a e A.15 a do Apêndice A. Ou seja, manter as vazões de CO₂ nos valores determinados por cromatografia foi complicado em função dos valores estarem no fundo de escala dos instrumentos. A substituição dos rotâmetros de 500 ml por rotâmetros de 100 e 250 ml trouxe maior proximidade entre os valores que se desejava medir e a escala dos instrumentos (Figuras A.13 b, A.14 b e A.15 b do Apêndice A), porém não foi possível confirmar a composição das misturas por cromatografia, conforme discutido no Capítulo 4.

Apesar de o fotoperíodo utilizado no Experimento 1 tenha sido de 12h: 12h luz/escuro, as correntes de aeração foram introduzidas durante 24 horas por dia, continuamente enriquecidas com CO₂. Isto pode ter ocasionado inibição no crescimento, já que há estudos aponta o pH ótimo de crescimento igual a 8,4 para cultivo de *Nannochloropsis oculata*. (SPOLAORE *et al.*, 2006) e verificou-se que o pH manteve-se próximo de 6 em todo período dos cultivos. Para futuros estudos com alimentação de CO₂ foi adaptada uma válvula solenóide à tubulação do gás, conectada a um temporizador, que permite determinar a duração

e o período da injeção.

Além da dosagem de CO₂, outro problema operacional significativo ocorreu nos experimentos do Experimento 1. Para evitar vazamentos de CO₂ no ambiente laboratorial onde a planta esteve inserida, foram utilizadas borrachas para vedação na tampa dos fotobiorreatores e os orifícios para saída de gases de cada um dos sistemas foram conectados por uma mangueira de silicone, a fim de direcionar sua saída para o ambiente externo. A comunicação entre as saídas de gases e a injeção contínua de gases acabou por promover a pressurização dos fotobiorreatores, ocasionando arraste de cultura pelos orifícios, culminando na troca de massa entre os sistemas.

Verificado o problema, as mangueiras ligando as saídas de ar foram desconectadas, mas continuou ocorrendo arraste de líquido para o exterior dos sistemas, devido à pressurização promovida pela injeção de ar, uma vez que as borrachas de vedação impediam sua saída. Nesse processo, não somente meio de cultura, mas também microalgas foram arrastadas para fora dos fotobiorreatores. Como o separador de gases do sistema deste estudo tem aproximadamente cinco centímetros de altura, no decorrer do experimento foram necessárias reposições de meio de cultura para que se mantivesse o fluxo no interior do sistema *airlift*; o volume necessário para cada sistema foi diferente, também devido às diferentes temperaturas em cada sistema, o que, juntamente com a perda de células, constitui uma das principais fontes de distúrbio e conseqüentemente de erro nos experimentos deste experimento.

Nos experimentos seguintes, relativos ao Experimento 2, não foram utilizadas borrachas para vedação nas tampas dos fotobiorreatores, e um pequeno condensador em formato de balão (Capítulo 3 Figura 3.1 foi utilizado para diminuir arraste de meio de cultivo. Essas medidas eliminaram por completo o problema de arraste de líquido ocorrido na batelada 1.

Os resultados obtidos no conjunto de experimentos relativos ao Experimento 1 podem ser vistos nas Figuras B.1 a B.3 e também na Tabela B.2. A relação entre absorvância e peso seco determinada após o término dos experimentos foi realizada a partir dos ensaios

codificados como P1-1 e P1-3, pois estes se destacaram entre os experimentos de maior absorvância.

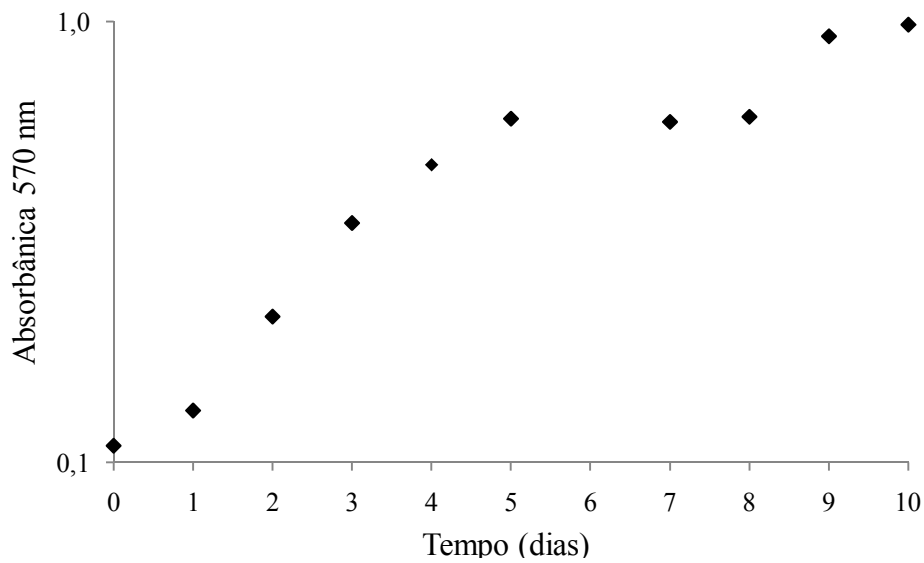


Figura B.1: Curva típica do inóculo utilizado nos experimentos do Experimento 1.

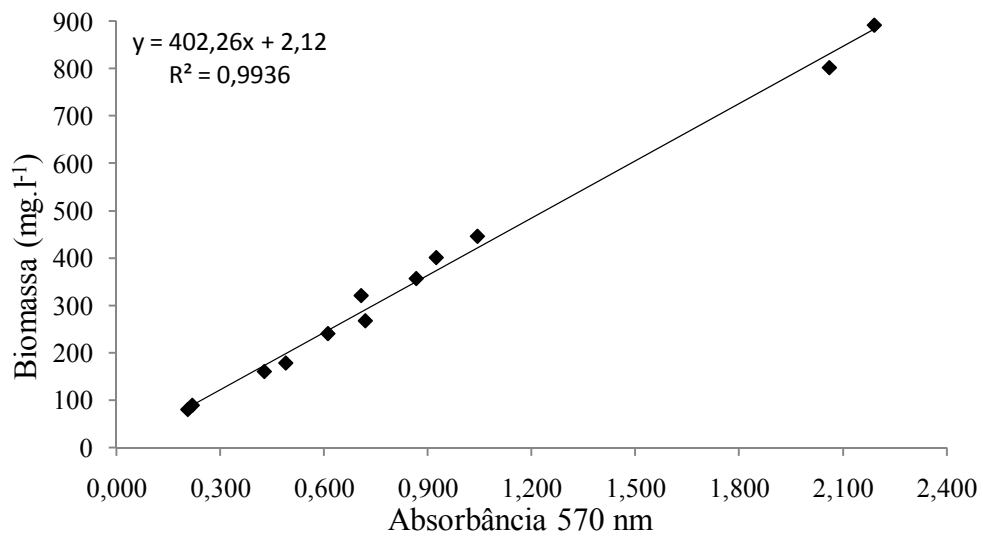


Figura B.2: Relação entre absorvância e peso seco para os experimentos do Experimento 1.

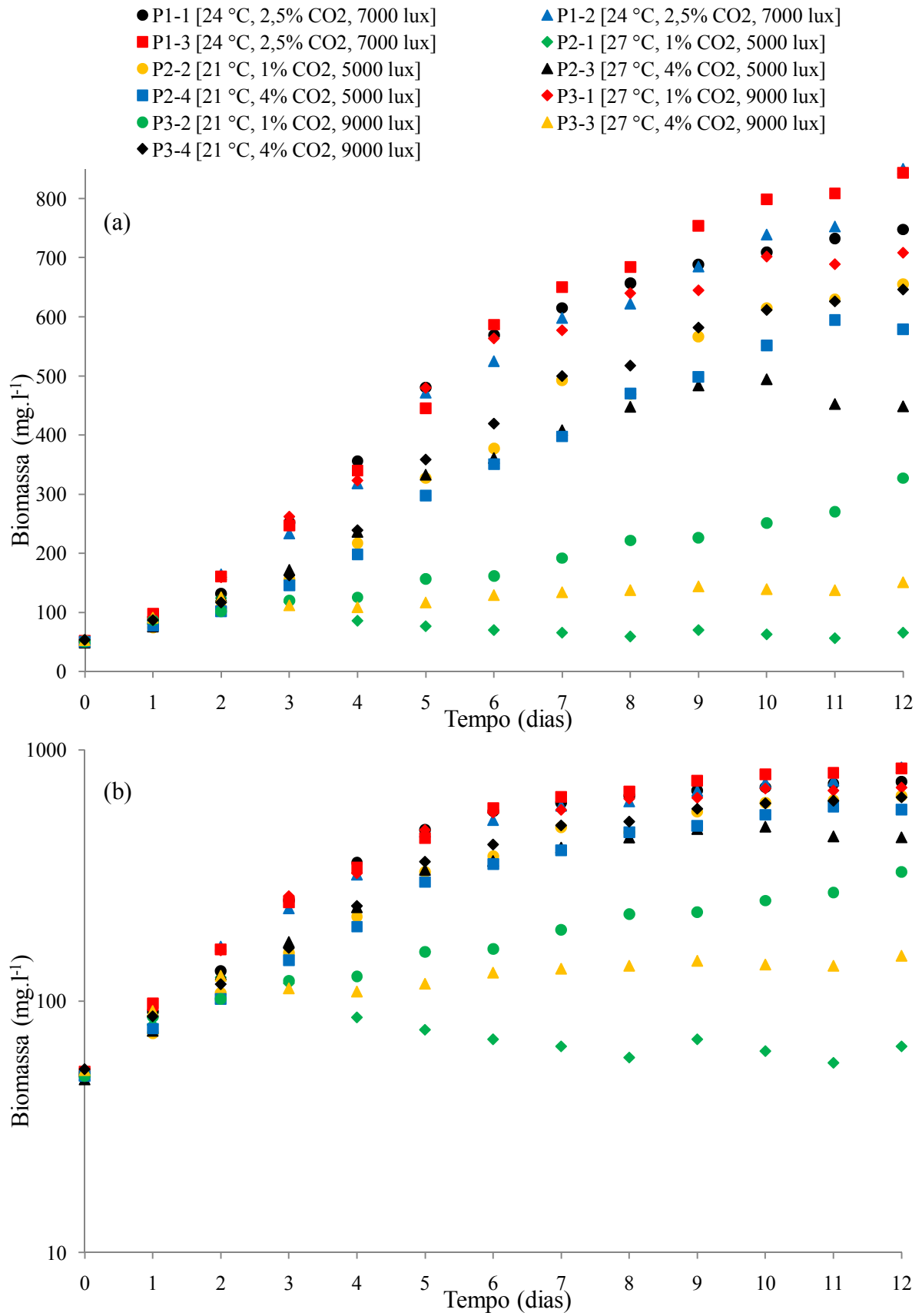


Figura B.3: Curvas de crescimento obtidas nos experimentos do Experimento 1. (a) Valores de biomassa expressos em escala normal. (b) Valores de biomassa expressos em escala logarítmica.

Tabela B.2: Resultados obtidos no Experimento 1.

Experimento	Máxima concentração de biomassa (mg.l ⁻¹)	Taxa instantânea de crescimento (d ⁻¹) - período considerado	Teor de lipídios
B1/P2-2 [21 °C, 2% CO ₂ , 5000 lux]	655,1	0,3568 1° ao 4° dia	não determinado
B1/P2-1 [27 °C, 2% CO ₂ , 5000 lux]	66,1	0,4345 1° ao 2° dia	não determinado
B1/P2-4 [21 °C, 4% CO ₂ , 5000 lux]	578,7	0,3116 1° ao 4° dia	não determinado
B1/P2-3 [27 °C, 4% CO ₂ , 5000 lux]	448,3	0,3774 1° ao 4° dia	não determinado
B1/P3-2 [21 °C, 2% CO ₂ , 9000 lux]	327,1	0,1240 1° ao 4° dia	não determinado
B1/P3-1 [27 °C, 2% CO ₂ , 9000 lux]	708,2	0,4165 1° ao 4° dia	não determinado
B1/P3-4 [21 °C, 4% CO ₂ , 9000 lux]	646,2	0,3369 1° ao 4° dia	não determinado
B1/P3-3 [27 °C, 4% CO ₂ , 9000 lux]	151,4	0,3209 1° ao 2° dia	não determinado
B1/P1-1 [24 °C, 3% CO ₂ , 7000 lux]	747,6	0,4306 2° ao 5° dia	não determinado
B1/P1-2 [24 °C, 3% CO ₂ , 7000 lux]	849,9	0,4203 1° ao 4° dia	não determinado
B1/P1-3 [24 °C, 3% CO ₂ , 7000 lux]	843,4	0,4152 1° ao 4° dia	não determinado

As Tabelas B.3 B.4 trazem a análise estatística dos dados obtidos, realizada no software *Statistica 7.1 (StatSoft Incorporation)*. Os valores de p abaixo de 0,05 para falta de ajuste em ambos os casos indica que os dados não se ajustaram ao modelo proposto, com efeitos lineares e de interação entre as variáveis de estudo. A falta de ajuste dos dados pode ser atribuída basicamente a duas razões: o modelo utilizado não é adequado, o que poderia ser verificado pela realização de experimentos em pontos axiais e conseqüente inclusão de termos quadráticos; ou por erro experimental, o que é mais provável devido aos distúrbios ocorridos e já discutidos. Embora o valor calculado para o erro puro seja baixo, cabe salientar que as informações a respeito da reprodutibilidade do experimento são oriundas das três replicatas no ponto central, onde as condições experimentais estiveram sujeitas ao mesmo sistema de controle de temperatura, intensidade luminosa e concentração de CO₂. Portanto, por mais que tenha ocorrido flutuação nas condições experimentais desejadas, os três pontos experimentais sofreram a mesma interferência.

Tabela B.3: Análise de variância da máxima concentração de biomassa do Experimento 1.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	F tabelado	p-valor
T	86757,0	1	86757,0	26,44	7,71	0,035798
CO ₂	579,7	1	579,7	0,18	7,71	0,715089
I	896,8	1	896,8	0,27	7,71	0,653253
T x CO ₂	21767,4	1	21767,4	6,63	7,71	0,123430
T x I	45859,1	1	45859,1	13,98	7,71	0,064679
CO ₂ x I	36924,0	1	36924,0	11,25	7,71	0,078530
Falta de ajuste	514872,3	2	257436,1	78,47	6,94	0,012584
Erro puro	6561,7	2	3280,9	0,01	6,94	
Total	714217,9	10				
Regressão	192783,9	6	32130,7	0,25	6,16	
Resíduos	521434,0	4	130358,5	% variação explicada (R ²) = 26,99		

Tabela B.4: Análise de variância da taxa instantânea de crescimento do Experimento 1.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	F tabelado	p-valor
T	0,0221	1	0,0220	358,28	7,71	0,002779
CO ₂	0,0000	1	0,0000	0,46	7,71	0,568726
I	0,0099	1	0,0099	161,52	7,71	0,006134
T x CO ₂	0,0128	1	0,0128	208,50	7,71	0,004762
T x I	0,0022	1	0,0022	35,93	7,71	0,026723
CO ₂ x I	0,0060	1	0,0060	97,95	7,71	0,010056
Falta de ajuste	0,0276	2	0,0138	224,15	6,94	0,004441
Erro puro	0,0001	2	0,0001	0,00	6,94	
Total	0,0808	10				
Regressão	0,0531	6	0,0088	1,28	6,16	
Resíduos	0,0277	4	0,0069	% variação explicada (R ²) = 65,70		

B.2 Experimento 2A

Os resultados obtidos no conjunto de experimentos relativos ao Experimento 2A podem ser vistos nas Figuras B.4 a B.8 e também na Tabela B.5.

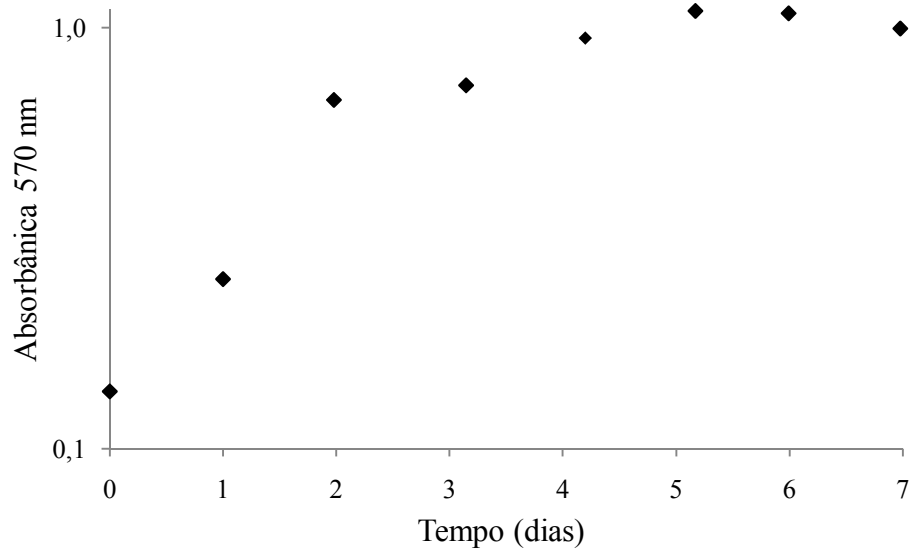


Figura B.4: Curva do inóculo utilizado nos experimentos da batelada 1 do Experimento 2A.

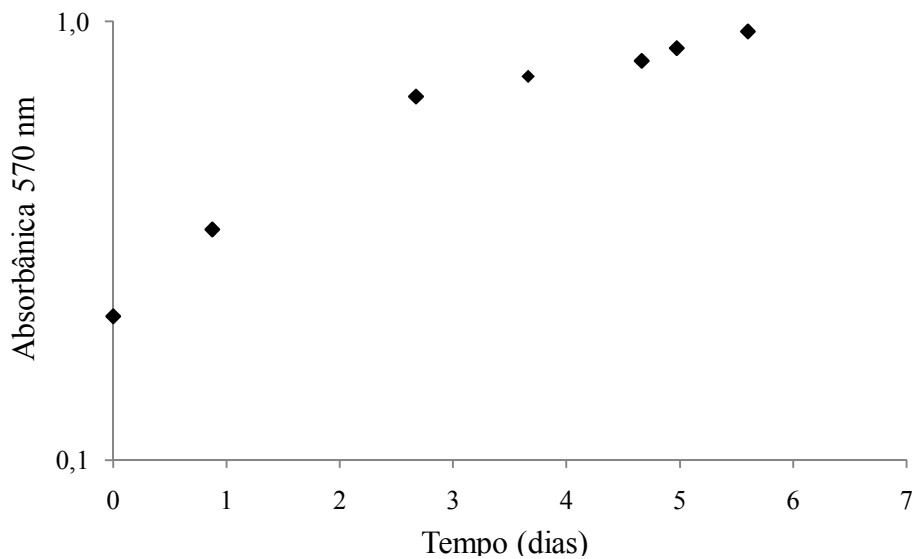


Figura B.5: Curva do inóculo utilizado nos experimentos da batelada 2 do Experimento 2A.

As relações entre absorbância e peso seco determinadas após o término dos experimentos foram realizadas a partir dos ensaios codificados como P1-1, P1-2 e P1-3 na batelada 1 e P2-2 e P2-3 e P2-4 na batelada 2, respectivamente.

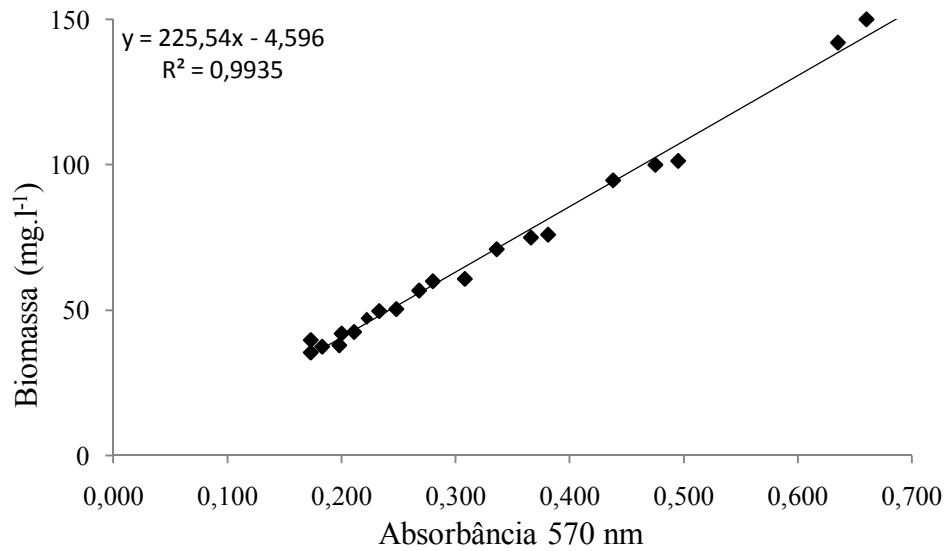


Figura B.6: Relação entre absorvância e peso seco utilizada para os experimentos da batelada 1 do Experimento 2A.

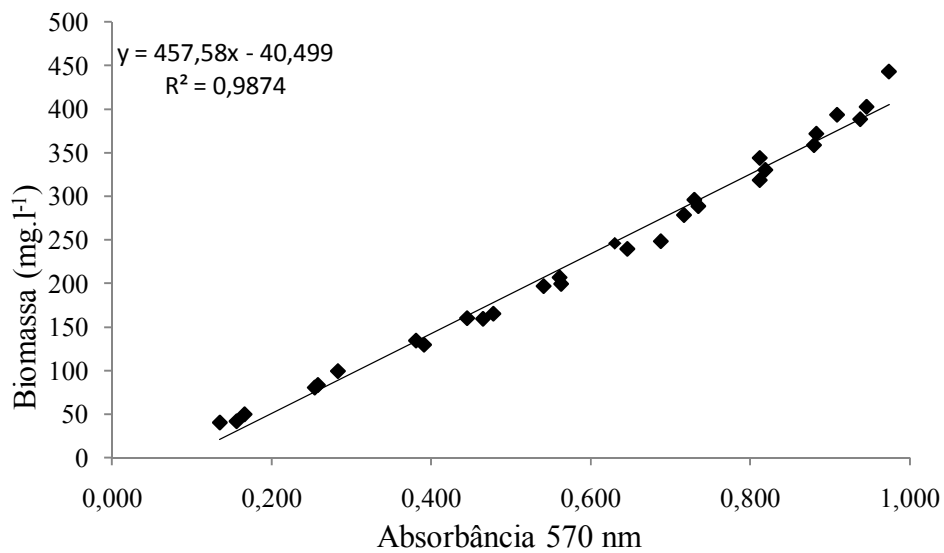


Figura B.7: Relação entre absorvância e peso seco utilizada para os experimentos da batelada 2 do Experimento 2A.

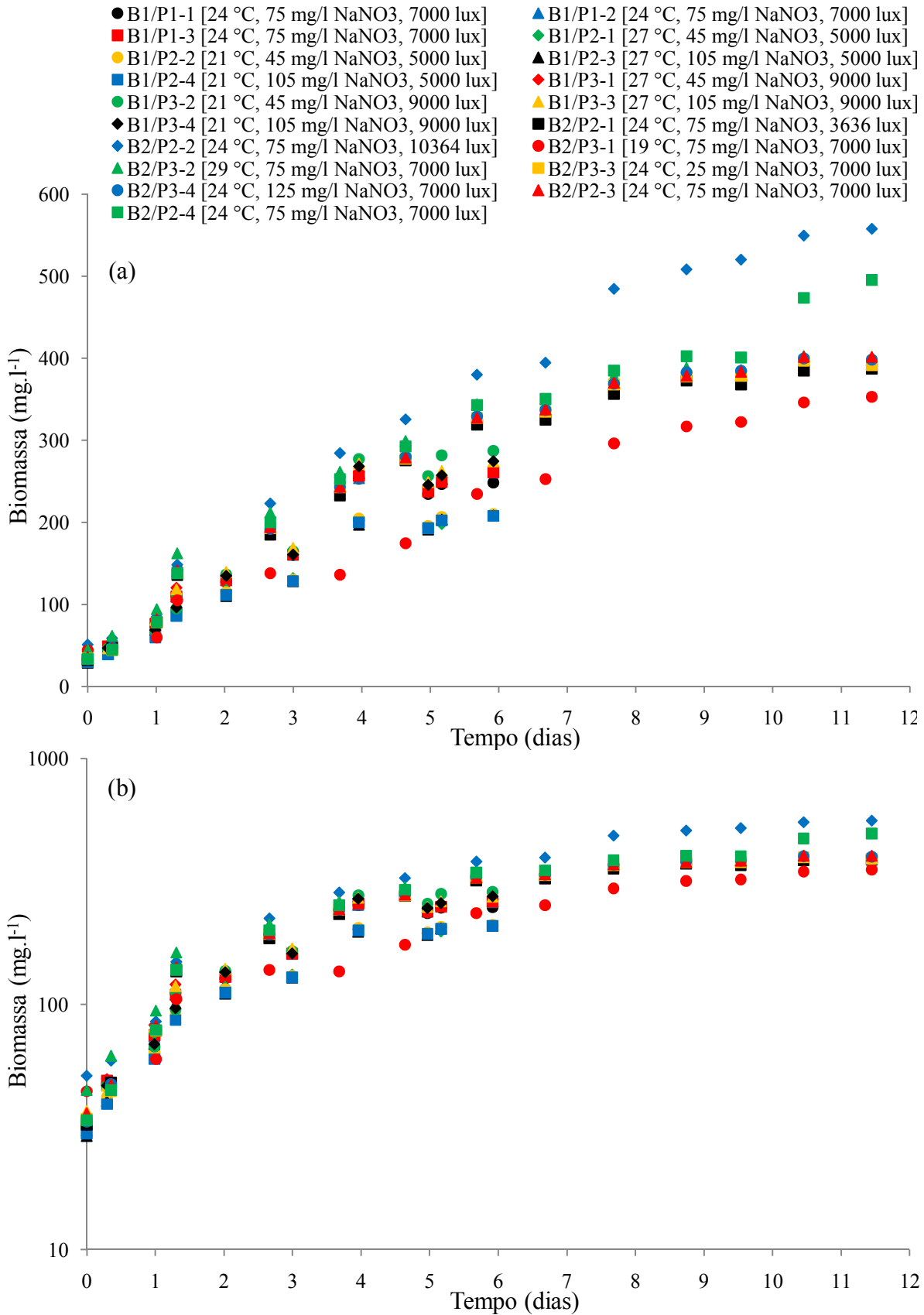


Figura B.8: Curvas de crescimento obtidas nos experimentos do Experimento 2A. (a) Valores de biomassa expressos em escala normal. (b) Valores de biomassa expressos em escala logarítmica.

Tabela B.5: Resultados obtidos nos experimentos do Experimento 2A.

Experimento	Máxima concentração de biomassa (mg.l ⁻¹)	Taxa instantânea de crescimento (d ⁻¹) – (período considerado) ¹	Teor de lipídios (método de Folch com ultrassom) (% em biomassa liofilizada)
B1/P2-2 [21 °C, 45 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 5000 lux]	229,4	0,5883 início ao 2° dia	22,51
B1/P2-1 [27 °C, 45 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 5000 lux]	228,5	0,5300 início ao 2° dia	22,05
B1/P2-4 [21 °C, 105 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 5000 lux]	208,3	0,6075 início ao 2° dia	25,19
B1/P2-3 [27 °C, 105 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 5000 lux]	227,6	0,5851 início ao 2° dia	24,63
B1/P3-2 [21 °C, 45 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 9000 lux]	332,7	0,6290 início ao 2° dia	33,88
B1/P3-1 [27 °C, 45 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 9000 lux]	303,9	0,5839 início ao 2° dia	31,79
B1/P3-4 [21 °C, 105 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 9000 lux]	320,1	0,6175 início ao 2° dia	35,67
B1/P3-3 [27 °C, 105 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 9000 lux]	310,2	0,6394 início ao 2° dia	28,51
B1/P1-1 [24 °C, 75 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 7000 lux]	277,2	0,5743 início ao 2° dia	26,86
B1/P1-2 [24 °C, 75 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 7000 lux]	288,5	0,5880 início ao 2° dia	32,81
B1/P1-3 [24 °C, 75 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 7000 lux]	303,9	0,5662 início ao 2° dia	22,95
B2/P3-1 [19 °C, 75 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 7000 lux]	553,1	0,4953 início ao 3° dia	30,00
B2/P3-2 [29 °C, 75 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 7000 lux]	510,2	0,5370 início ao 3° dia	28,78
B2/P3-3 [24 °C, 25 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 7000 lux]	522,1	0,6410 início ao 3° dia	24,50
B2/P3-4 [24 °C, 125 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 7000 lux]	622,8	0,6085 início ao 3° dia	21,64
B2/P2-1 [24 °C, 75 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 3636 lux]	480,9	0,5885 início ao 3° dia	29,83
B2/P2-2 [24 °C, 75 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 10364 lux]	611,8	0,5797 início ao 3° dia	33,35
B2/P2-3 [24 °C, 75 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 7000 lux]	553,2	0,6179 início ao 3° dia	24,97
B2/P2-4 [24 °C, 75 mg.l ⁻¹ NaNO ₃ , 7000 lux]	579,7	0,6527 início ao 3° dia	16,14

Os valores de máxima concentração de biomassa apresentados na Tabela B.5 estão baseados na absorbância final das culturas após a homogeneização das culturas em cada um

dos sistemas, o que explica as diferenças em relação aos valores observados nas curvas de crescimento, já que houve decantação e acúmulo de células nos fotobiorreatores. Este fato pode estar relacionado à presença tris-HCl no meio de cultivo, embora além da manutenção do pH, este tampão seja normalmente utilizado para prevenção ou redução de precipitação segundo HARRISON & BERGES (2005).

Outro fato relevante que deve ser mencionado e pode ter contribuído na precipitação de células foi que especificamente as soluções salinas preparadas para os experimentos aqui discutidos foram filtradas com filtros quantitativos comuns, e não com filtros de 0,7 μm como nos demais experimentos, sendo verificada uma turbidez visual superior nessas soluções utilizadas na preparação dos meios de cultivo. As Tabelas B.6 e B.7 trazem a análise estatística dos dados obtidos, realizada no software *Statistica 7.1 (StatSoft Incorporation)*.

Os valores de p calculado para a falta de ajuste dos dados de máxima concentração de biomassa foram maiores que 0,05 tanto para o modelo completo, quanto para o modelo reduzido, considerando apenas o efeito linear da variável intensidade luminosa, conforme a Tabela B.6 e B.7. Ainda, pelos valores de F calculados e F tabelados, ambos os modelos apresentariam significância. Porém, através das mesmas tabelas e do diagrama de Pareto apresentado na Figura B.9, se verifica que um grande efeito de bloco foi verificado, ocasionado provavelmente pela disparidade entre os tempos totais de cultivo em cada conjunto de experimentos. Ainda, pela Figura B.10, que apresenta os valores experimentais *versus* os valores calculados pelo modelo considerando apenas o efeito linear da intensidade luminosa, claramente é possível distinguir dois conjuntos de pontos, relativos à primeira e segunda batelada.

A interrupção dos cultivos foi promovida devido à verificação do início de fase de decaimento das curvas de crescimento, respectivamente 6 e 11 dias na primeira e na segunda batelada. A aclimação dos inóculos ao tampão por diferentes períodos (repicagens) provavelmente foi o fator que ocasionou essa disparidade, já que todas as demais condições de preparação do inóculo foram mantidas. Pela diferença entre os tempos de cultivo nos dois conjuntos de experimentos, não podem ser tomadas conclusões concretas a respeito dos experimentos aqui apresentados, embora a significância da variável intensidade luminosa

esteja dentro do esperado, pois sabe-se que esta variável apresenta grande influência no crescimento de microalgas (MASOJÍDEK, KOBLÍŽEK & TORZILLO, 2004).

Tabela B.6: Análise de variância da máxima concentração de biomassa do Experimento 2A.

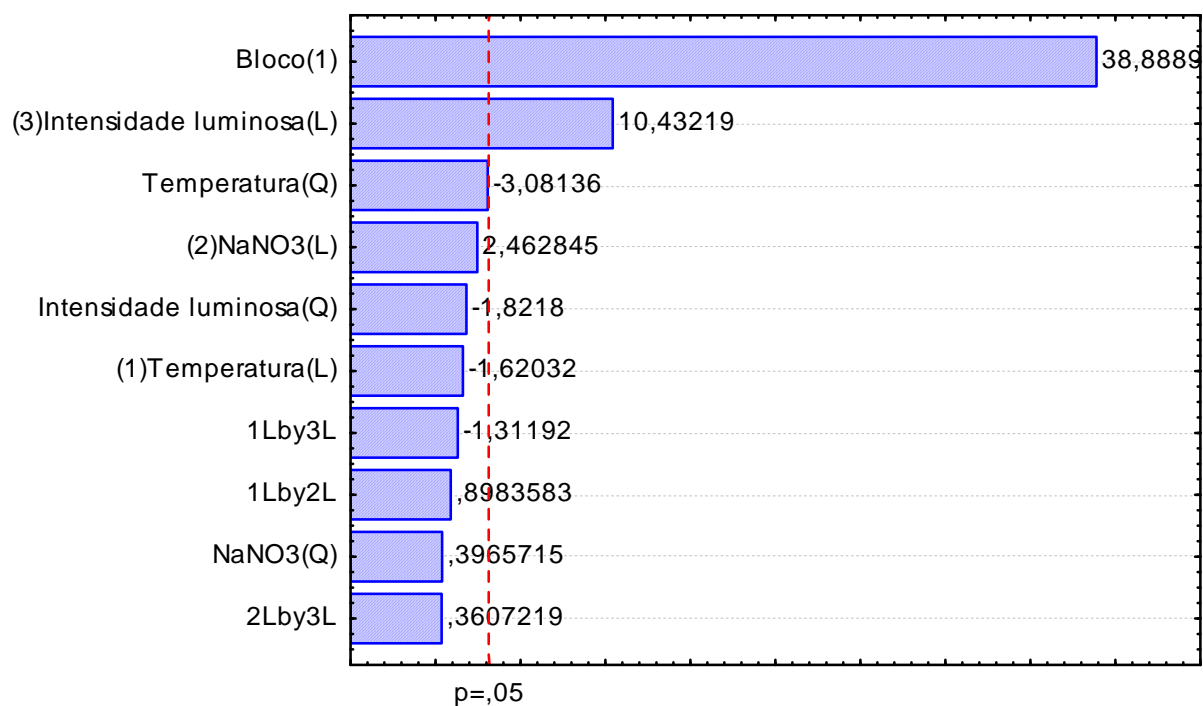
Fonte de variação ¹	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	F tabelado	p-valor
Modelo completo						
Blocos	358110,9	1	358110,9	1512,35	5,32	0,000037
T (L)	621,7	1	621,7	2,63	5,32	0,203606
T (Q)	2248,3	1	2248,3	9,50	5,32	0,054078
NaNO ₃ (L)	1436,3	1	1436,3	6,07	5,32	0,090638
NaNO ₃ (Q)	37,2	1	37,2	0,18	5,32	0,718209
I (L)	25770,1	1	25770,1	108,83	5,32	0,001880
I (Q)	785,9	1	785,9	3,32	5,32	0,166022
T x NaNO ₃	191,1	1	191,1	0,81	5,32	0,435200
T x I	407,6	1	407,6	1,72	5,32	0,280904
NaNO ₃ x I	30,8	1	30,8	0,13	5,32	0,742212
Falta de ajuste	4286,5	5	857,3	3,62	3,69	0,159314
Erro puro	710,4	3	236,8	0,28	4,07	
Total	396273,3	18				
Regressão	391276,5	10	39127,7	62,64	3,35	
Resíduos	4996,8	8	624,6	% variação explicada (R ²) = 98,74		
Modelo reduzido (somente termos significativos)						
Falta de ajuste	9929,6	13	763,8	3,23	2,39	0,182193
Erro puro	710,4	3	236,8	0,31	3,24	
Total	396273,3	18				
Regressão	385633,4	2	192816,7	289,95	3,63	
Resíduos	10640,0	16	665,0	% variação explicada (R ²) = 97,31		

¹ (L) = termo linear; (Q) = termo quadrático.

Tabela B.7: Coeficientes de regressão estimados para a máxima concentração de biomassa do Experimento 2A.

Fatores ¹	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	t(3)	p-valor	Limite confiança inferior (-95%)	Limite confiança superior (95%)
Média	428,4	6,8800	62,3	0,000009	406,5	450,2
Bloco (1)	139,1	3,5771	38,9	0,000037	127,7	150,5
T (L)	-6,8	4,1795	-1,6	0,203606	-20,1	6,5
T (Q)	-13,0	4,2232	-3,1	0,054078	-26,5	0,4
NaNO ₃ (L)	10,3	4,1795	2,5	0,090638	-3,0	23,6
NaNO ₃ (Q)	1,7	4,2232	0,4	0,718209	-11,8	15,1
I (L)	43,4	4,1638	10,4	0,001880	30,2	56,7
I (Q)	-7,6	4,1601	-1,8	0,166022	-20,8	5,7
T x NaNO ₃	4,9	5,4405	0,9	0,435200	-12,4	22,2
T x I	-7,1	5,4405	-1,3	0,280904	-24,4	10,2
NaNO ₃ x I	2,0	5,4405	0,4	0,742212	-15,4	19,3

¹ (L) = termo linear; (Q) = termo quadrático.

**Figura B.9:** Diagrama de Pareto para a máxima concentração de biomassa do Experimento 2A. (L) representa os termos lineares e (Q) representa os termos quadráticos.

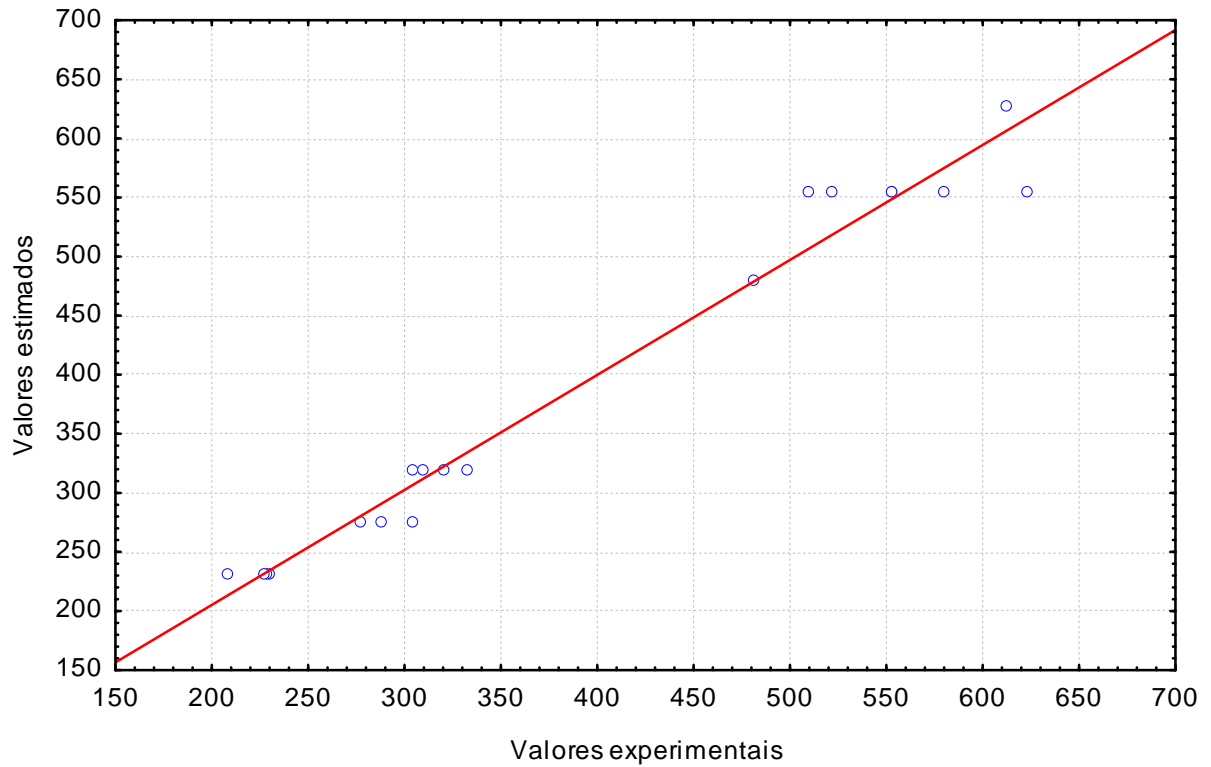


Figura B.10: Valores experimentais e valores experimentais para o modelo reduzido da máxima concentração de biomassa do Experimento 2A.

A mesma afirmação é válida para a análise de variância da taxa instantânea de crescimento e do teor de lipídios em biomassa seca, ou seja, em função da diferença entre os tempos de cultivo nos dois conjuntos de experimentos, não podem ser tomadas conclusões concretas a respeito deste experimento. Além disso, os valores de F calculado são menores que os respectivos valores de F tabelado em ambos os casos, de acordo com os cálculos apresentados nas Tabelas B.8 e B.9, indicando que os modelos não são significativos.

Tabela B.8: Análise de variância da taxa instantânea de crescimento do Experimento 2A.

Fonte de variação ¹	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	F tabelado	p-valor
Blocos	0,0000	1	0,0000	0,07	5,32	0,812833
T (L)	0,0001	1	0,0001	0,31	5,32	0,617224
T (Q)	0,0081	1	0,0081	28,78	5,32	0,012678
NaNO ₃ (L)	0,0003	1	0,0003	1,07	5,32	0,376445
NaNO ₃ (Q)	0,0027	1	0,0027	9,65	5,32	0,053023
I (L)	0,0015	1	0,0015	5,38	5,32	0,103214
I (Q)	0,0000	1	0,0000	0,00	5,32	0,939882
T x NaNO ₃	0,0013	1	0,0013	4,68	5,32	0,119192
T x I	0,0004	1	0,0004	1,46	5,32	0,313288
NaNO ₃ x I	0,0001	1	0,0001	0,41	5,32	0,569384
Falta de ajuste	0,0120	5	0,0024	8,46	3,69	0,054466
Erro puro	0,0008	3	0,0003	0,12	4,07	
Total	0,0290	18				
Regressão	0,0162	10	0,0016	1,01	3,35	
Resíduos	0,0128	8	0,0016	% variação explicada (R ²) = 55,87		

¹ (L) = termo linear; (Q) = termo quadrático.

Tabela B.9: Análise de variância do teor de lipídios do Experimento 2A.

Fonte de variação ¹	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	F tabelado	p-valor
Blocos	0,0013	1	0,0013	0,44	5,32	0,555989
T (L)	0,0011	1	0,0011	0,38	5,32	0,581484
T (Q)	0,0034	1	0,0034	1,16	5,32	0,360406
NaNO ₃ (L)	0,0000	1	0,0000	0,00	5,32	0,963338
NaNO ₃ (Q)	0,0006	1	0,0006	0,20	5,32	0,682430
I (L)	0,0125	1	0,0125	4,26	5,32	0,130930
I (Q)	0,0076	1	0,0076	2,59	5,32	0,206108
T x NaNO ₃	0,0003	1	0,0003	0,11	5,32	0,758355
T x I	0,0008	1	0,0008	0,29	5,32	0,628925
NaNO ₃ x I	0,0006	1	0,0006	0,19	5,32	0,689763
Falta de ajuste	0,0096	5	0,0019	0,65	3,69	0,686732
Erro puro	0,0088	3	0,0029	1,54	4,07	
Total	0,0469	18				
Regressão	0,0285	10	0,0028	1,24	3,35	
Resíduos	0,0184	8	0,0023	% variação explicada (R ²) = 60,77		

¹ (L) = termo linear; (Q) = termo quadrático.

B.3 Determinação do k_{La} do Fotobiorreator *Airlift* em Estudo

As Figuras B.11 a B.16 apresentam as regressões utilizadas no cálculo do k_{La} do fotobiorreator *airlift* de circulação interna em estudo, na temperatura de 19 °C e vazões de 500, 750 e 1000 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ de ar. Para a determinação do termo logarítmico da Equação 3.5 (Capítulo 3) foi utilizado o valor de C^* igual a 9,5 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de oxigênio dissolvido, pois este foi o valor máximo obtido na calibração do oxímetro utilizado na temperatura de 19° C.

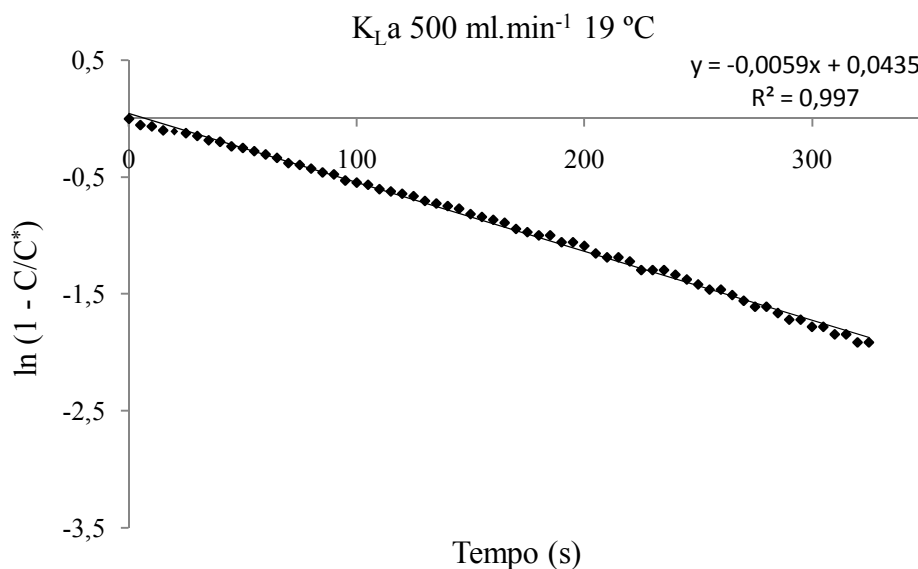


Figura B.11: Replicata 1 da determinação do k_{La} com vazão de ar de 500 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a 19° C.

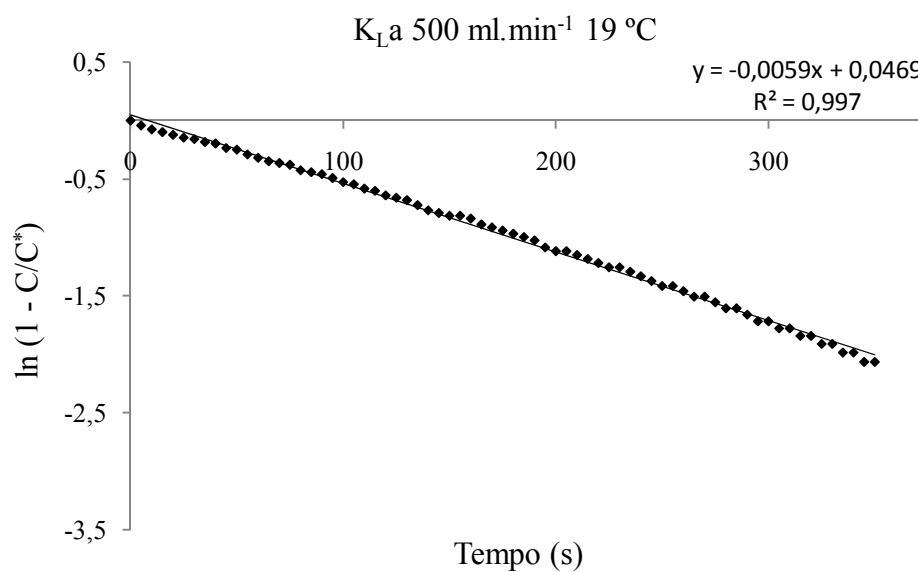


Figura B.12: Replicata 2 da determinação do k_{La} com vazão de ar de 500 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a 19° C.

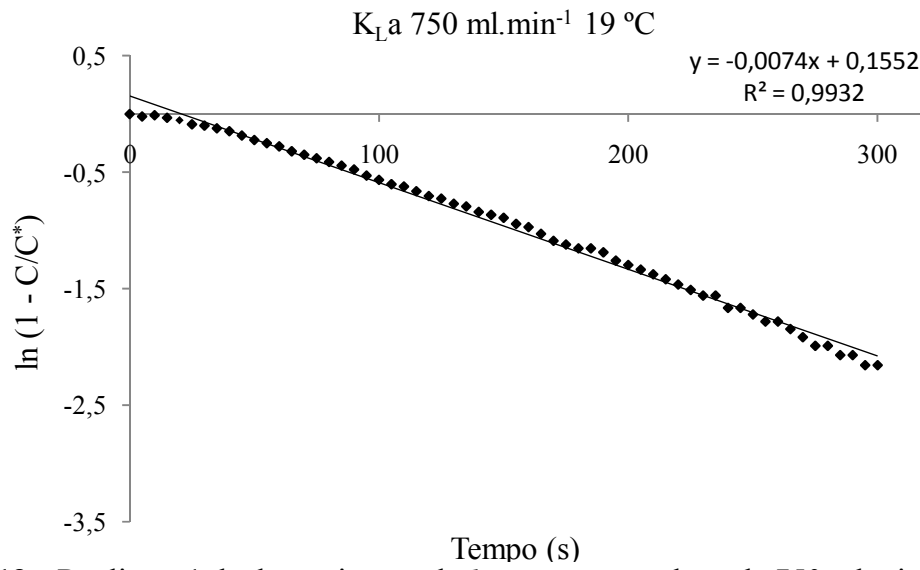


Figura B.13: Replicata 1 da determinação do k_{La} com vazão de ar de 750 ml.min⁻¹ a 19° C.

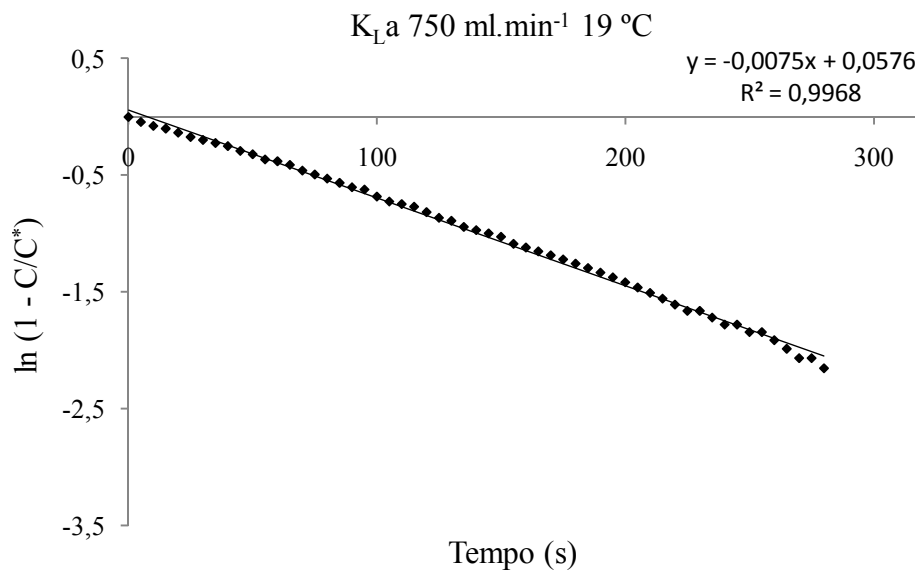


Figura B.14: Replicata 2 da determinação do k_{La} com vazão de ar de 750 ml.min⁻¹ a 19° C.

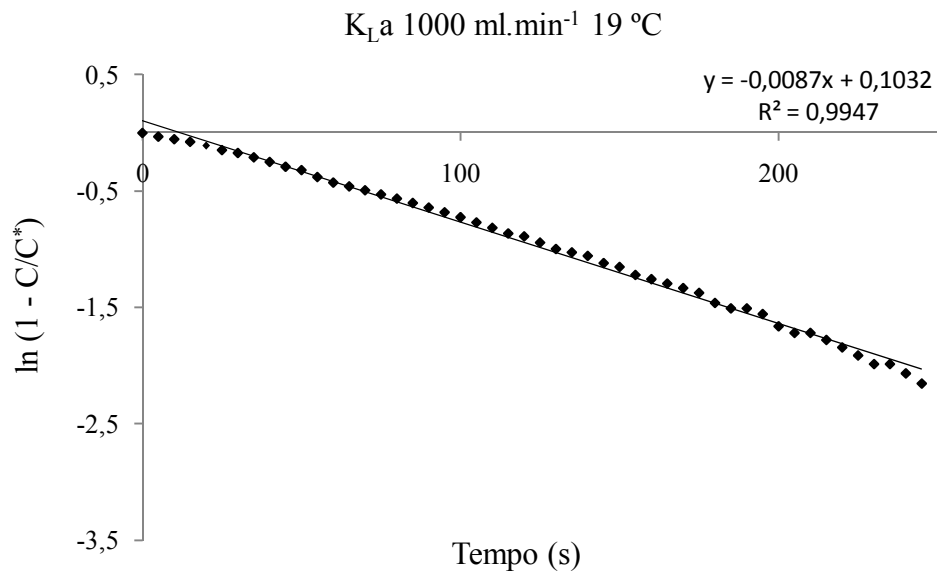


Figura B.15: Replicata 1 da determinação do $k_{L}a$ com vazão de ar de 1000 ml.min⁻¹ a 19° C.

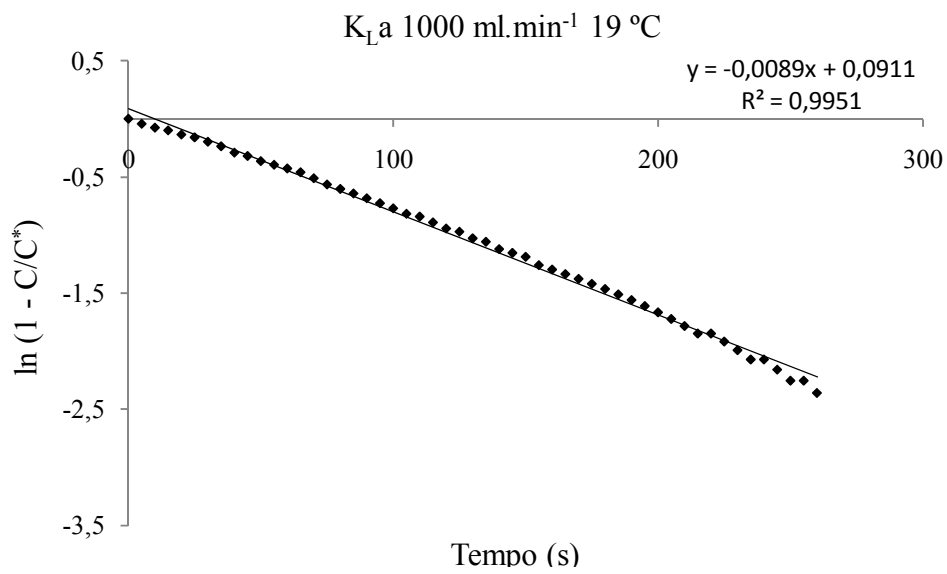


Figura B.16: Replicata 2 da determinação do $k_{L}a$ com vazão de ar de 1000 ml.min⁻¹ a 19° C.

