UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KELI CRISTIANE CORREIA MORAIS

ANÁLISE E DESENVOLVIMENTO DE AQUICULTURA DA MICROALGA *Phaeodactylum tricornutum* EM CRESCIMENTO AUTOTRÓFICO E MIXOTRÓFICO EM FOTOBIORREATOTES COMPACTOS

CURITIBA

2011

KELI CRISTIANE CORREIA MORAIS

ANÁLISE E DESENVOLVIMENTO DE AQUICULTURA DA MICROALGA *Phaeodactylum tricornutum* EM CRECIMENTO AUTOTRÓFICO E MIXOTRÓFICO EM FOTOBIORREATORES COMPACTOS.

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre. Área de concentração: Engenharia e Ciência dos Materiais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais - PIPE. Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. José Viriato Coelho Vargas
Co-orientador: Prof. Dr. David Alexander Mitchell
Co-orientador: Prof. Dr. André Bellin Mariano

Curitiba
2011

Morais, Keli Cristiane Correia

Análise e desenvolvimento de aquicultura da microalga *Phaeodactylum tricornutum* em crescimento autotrófico e mixotrófico em fotobiorreatores compactos / Keli Cristiane Correia Morais – Curitiba, 2012.

97 f. il., tabs.

Orientador: Prof. Dr. José Viriato Coelho Vargas

Co-orientadores: Prof. Dr. David Alexander Mitchell; Prof. Dr. André Bellin Mariano.

Dissertação (Mestrado) – Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais - PIPE. Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Inclui Bibliografia

1. Microalga. 2. Biodiesel. 3. Glicerina. I. Vargas, José Viriato Coelho. II. Mitchell, David Alexander. III. Mariano, André Bellin. IV. Universidade Federal do Paraná.

CDD 589.45

UFPR

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais- PIPE
Setor de Tecnologia

RELATÓRIO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos dezesseis dias do mês de agosto de 2011, no Salão Nobre - no Centro Politécnico - UFPR, foi instalada pelo Prof. Dr. Dante Homero Mosca Jr., coordenador do PIPE – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, a Banca Examinadora para a ducentésima sexta defesa de dissertação de mestrado na área de concentração: Engenharia e Ciência dos Materiais. Estiveram presentes no ato, além do coordenador do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes. A Banca Examinadora, atendendo a determinação do colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências dos Materiais, foi constituída pelos professores doutores: José Viriato Coelho Vargas, (UFPR), Maria José J. Ponte (UFPR), Luiz Alberto Oliveira Rocha (UFRGS). Às 14:00 horas, a banca iniciou os trabalhos, convidando o candidato **KELI CRISTIANE CORREIA MORAIS** a fazer a apresentação da dissertação de mestrado intitulada **"ANÁLISE E DESENVOLVIMENTO DE AQUICULTURA DA MICROALGA PHAEODACTYLUM TRICORNOTUM EM CRESCIMENTO AUTOTRÓFICO E MIXOTRÓFICO EM FOTOBIOREATORES".** Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de argüição pelos membros participantes. Tendo em vista a dissertação e a argüição, a banca decidiu pela APROVAÇÃO do candidato, (de acordo com a determinação dos artigos 68 e 69 da resolução 65/09 de 09.11.2009).

Curitiba, 16 de agosto de 2011.

Prof.Dr. José Viriato Coelho Vargas
Orientador

Prof. Dr. Maria José J. Ponte
Examinador

Prof. Dr. Luiz Alberto Oliveira Rocha
Examinador

DEDICATÓRIA

A meu marido Roberto Mendes, exemplo de força e dedicação, às minhas irmãs Karina e Keythi e aos meus pais Francisco e Lázara que tanto se dedicaram a mim.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por me dar forças e persistência nessa caminhada, mostrando-me por meio de obstáculos que apesar de difíceis são possíveis de serem superados.

Aos meus guerreiros pais Francisco S. Morais e Lázara C. C. Morais que tanto se esforçaram para garantir minha formação, apoiaram-me em minhas decisões, e sempre estiveram atentos a todas às minhas preocupações, agradeço inclusive ao apoio financeiro. Às minhas queridas irmãs que sempre se mostraram interessadas e atenciosas em meu trabalho e aos meus avós Jõao, Aldevino e Jacinta, por suas preces e imenso carinho.

À meu querido Roberto Mendes, que sempre ouviu minhas lamúrias e me apoiou durante todas as etapas deste trabalho, através de suas palavras de carinho me incentivou para que eu pudesse enfrentar as batalhas me tornando mais forte.

Ao Prof. PhD. José Viriato Coelho Vargas, que por meio do NPDEAS proporcionou que eu pudesse fazer parte de uma grande equipe. Agradeço pela orientação, apoio, incentivos e confiança fornecidos durante a elaboração deste trabalho.

Ao Prof. PhD. David Alexander Mitchell que me ajudou a enxergar nos pequenos detalhes grandes resultados e disponibilizou seu tempo em discussões para enriquecer este trabalho.

Ao Prof. Dr. André Bellin Mariano pela co-orientação, desde o planejamento deste trabalho, por suas sugestões enriquecedoras, pela amizade e companheirismos durante os eventos.

Agradeço à equipe do Gia (Grupo Integrado de Pesquisa em Aquicultura e Meio Ambiente), pela estrutura e apoio fundamental para a realização dos experimentos em especial ao Alexandre Guilherme Becker e estagiários: Ricardo, Gabriel, Pedro e Aline pelo auxílio nos experimentos.

À Diniara Soares e Daiane Penteado que pacientemente me ensinaram as metodologias durante à execução de seus trabalhos, bem como sugestões que puderam enriquecer meu trabalho.

Ao admirável Wellington Balmant por sua facilidade de interpretação e capacidade em lidar com resolução de problemas.

Ao Robert Luis Lara Ribeiro que por meio de seu belo trabalho com simulações numéricas aliadas aos meus dados experimentais, pudemos escrever diversos artigos para congressos.

Aos colegas de sala e disciplinas: Diogo, Camila, Jaqueline, Emerson, Luciana, Elise, Júlio, Hélio, Rui que juntos proporcionaram momentos de descontração e momentos sérios com valiosas trocas de informações.

À aluna Kassiana Ribeiro que me ajudou muito na execução dos experimentos, dando-me apoio inclusive aos finais de semana.

Aos professores Ricardo H. M. Godoi, Maria José J. Ponte, Luiz Alberto O. Rocha e José V. C. Vargas integrantes da banca de qualificação e de defesa. Todos contribuíram valiosamente para a melhoria deste trabalho, muito obrigada.

À UFPR e ao departamento de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais pela oportunidade de realização deste mestrado. Aos funcionários do PIPE que sempre se mostraram prestativos em minhas dúvidas e solicitações.

À Coleção de Microalgas Elizabeth Adair da Universidade Federal Fluminense pela cepa da microalga marinha *Phaeodactylum tricornutum* que foi utilizada neste trabalho.

À CAPES, CNPq e Nilko pelo apoio financeiro.

Agradeço a todos os meus amigos e familiares que mesmo indiretamente proporcionaram através de sua existência que mais uma etapa de minha vida acadêmica fosse completada.

Por fim, peço desculpas pela minha ausência a tantos amigos e familiares, pessoas que amo tanto, e que sem as quais tornariam meus momentos mais difíceis.

Muito obrigada!

Sumário

LISTA DE FIGURAS 8
LISTA DE TABELAS 10
LISTA DE SIGLAS 11
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS 12
RESUMO 13
ABSTRACT 14
1 INTRODUÇÃO 16
1.1 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO 19
2 REVISÃO DE LITERATURA 20
2.1 DEFINIÇÃO DE BIODIESEL 22
2.1.1 Matérias-primas e processo para produção de biodiesel 26
2.2 MICROALGAS COMO FOCO DE ESTUDO PARA BIODIESEL 27
2.2.1 Cultivos de microalgas 29
2.3 FATORES QUE INFLUENCIAM NO CULTIVO DE MICROALGAS 35
2.3.1 Temperatura 36
2.3.2 Intensidade Luminosa 37
2.3.2.1 Fotoinibição 40
2.3.2.2 Fotoperíodo 41
2.3.3 Fonte orgânica de carbono 41
2.3.4 Aeração 42
2.3.5 Concentração de nutrientes e salinidade 43
2.4 MORFOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO DA MICROALGA *P. TRICORNUTUM* 44
2.5 METABOLISMOS HETEROTRÓFICOS, AUTOTRÓFICOS E MIXOTRÓFICOS 45
2.5.1 O uso do glicerol em cultivos mixotróficos 47
2.6 SIMULAÇÃO NUMÉRICA PARA ESTUDO DAS VARIÁVEIS DE RESPOSTA 48
3 DESAFIOS E OBJETIVOS 50
3.1 OBJETIVO GERAL 51
3.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 52
4. MATERIAIS E MÉTODOS 53
4.1 MICROALGAS 53
4.2 MEIO DE CULTIVO 53

4.2.1 Preparação do inóculo 53
4.2.1 Preparação do meio de cultura 54
4.3 CARACTERIZAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO 55
4.3.1 Equação logística 56
4.9 RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA 57
4.9.1 Floculação 57
4.9.2 Centrifugação e Liofilização 58
4.10 DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA SECA 58
4.11 DETERMINAÇÃO DE LIPÍDEOS TOTAIS 60
4.12 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DAS AMOSTRA 62
5 Resultados e Discussão 63
5.1 VERIFICAÇÃO DA MELHOR MANEIRA DE ADIÇÃO DE FONTE DE CARBONO 63
5.2 CULTIVOS EM DIFERENTES SALINIDADES E COM FONTES DE CARBONO DIVERSIFICADAS 65
5.2.2 Recuperação de biomassa e extração de lipídeos totais. 69
5.2.2.1 Determinação de biomassa seca 69
5.2.2.2 Teor lipídico 70
5.3 CULTIVOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLICEROL COM FOTOPERÍODO 73
5.3.1 Caracterização da cinética de crescimento 74
5.3.2. Determinação de biomassa seca 75
5.3.2.Teor lipídico 78
5.4 VIABILIDADE DA MODELAGEM COMPUTACIONAL APLICADA AOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS 80
5.4.1. MODELAGEM MATEMÁTICA DA VELOCIDADE DE CRESCIMENTO CELULAR COM ADIÇÃO DE GLICEROL 80
6 Conclusões 88
7 Trabalhos Futuros 90
8 Referências 91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Matérias primas utilizadas no Brasil para produção de biodiesel. Fonte: Adaptado de ANP. 16

Figura 2– Reação de transesterificação. A- reação geral; B-reações intermediárias. FONTE: Soares (2010). 24

Figura 3 - (A) e (B) Produção de *Spirulina sp* e *Haematococcus pluvials* no Hawai (EUA) (C) Produção de *Spirulina sp* na Califórnia (EUA). FONTE: (A) e (B) CYANOTECH, 2011; (C) EARTHRISE, 2011. 30

Figura 4 – Sistema de cultivo de microalgas. (A) tanque de volume 10.000L; (B) Erlenmeyer e pista de corrida, volume de 2L; (C) Fotobiorreator construído no NPDEAS. FONTE: (A) e (B) FURG, 2010; (C) O AUTOR (2010). 32

Figura 5 – Disposição dos meios de cultura com a microalga para preparo do inóculo nos fotobiorreatores. FONTE: MARIANO *et al.*, 2010. 33

Figura 6 – Processo de fixação de CO_2 a partir de moléculas de ATP e NADPH ocorrendo no interior do cloroplasto. Fonte: http://www.passeiweb.com/ na_ponta_lingua/sala_de_aula/biologia/biologia_vegetal/sintese_de_nutrientes/fotossintese. 39

Figura 7 – Micrografia eletrônica da microalga *Phaeodactylum tricornutum.* FONTE: Disponível em: http://www.antarctica.gov.au/science/southern-ocean-ecosystems-environmental-change-and-conservation/southern-ocean-fisheries/krill/antarctic-marine-research-aquarium. 45

Figura 8 - Diferenças entre os metabolismos autotróficos, heterotróficos e mixotróficos. FONTE: Adaptado de MARIANO *et al.,* 2010. 46

Figura 9 – Fluxograma geral das estratégias de trabalho 51

Figura 10 - Repicagem das cepas dos tubos de ensaio até Erlenmeyer de 2 litros de volume. A – Cepas em tubos de 40 ml; B – Microalgas em Erlenmeyer de 250 ml (sem aeração); C – Microalgas em Erlenmeyer de 2 L (com aeração). 53

Figura 11 – Floculação com adição de diferentes quantidades de hidróxido de sódio. 58

Figura 12 – Determinação da biomassa seca de microalgas: (a) aparato experimental; (b) aspecto das amostras. 60

Figura 13 – Representação da forma estrutural das fontes de carbono usadas. (A): glicerol (3 moléculas carbonos na cadeia principal) ; (B): glicose (6 moléculas de carbono na cadeia principal). 66

Figura 14 – Curva de crescimento dos experimentos 1 ao 6, (♦) dados experimentais e (—) ajuste pela equação logística. a) Experimento 1: Cultivo

autotrófico – sal. 15 ‰; b) Experimento 2: Cultivo mixotrófico – sal. 15 ‰ e glicerol; c) Experimento 3: Cultivo mixotrófico - sal. 15 ‰ e glicose; d) Experimento 4:Cultivo autotrófico – sal. 30 ‰; e) Experimento 5: Cultivo mixotrófico - sal. 30 ‰ e glicerol; f) Experimento 6: Cultivo mixotrófico - sal. 30 ‰ e glicose..... 68

Figura 15 – Aumento percentual lipídico por grama de biomassa seca entre 10º e 18º dias. 71

Figura 16 – Aumento do teor lipídico em miligramas por litro de meio de cultura cultivado entre 10º e 18º dias de cultivo. 71

Figura 17 - Curva de crescimento para o tratamento 1 ao 4. (♦) dados experimentais e (—) ajuste pela equação logística. a) Experimento 1: Cultivo autotrófico – 0,0M de glicerol; b) Experimento 2: Cultivo mixotrófico – 0,05M de glicerol; c) Experimento 3: Cultivo mixotrófico – 0,1M de glicerol; d) Experimento 4 – Cultivo mixotrófico – 0,15M de glicerol. 74

Figura 18 – Aumento de biomassa seca em gramas por litro de meio de cultivo entre 12º e 20º dias em diferentes concentrações de glicerol. 76

Figura 19– Comparação de biomassa seca obtida por Camacho *et al.*, (2005) e valores encontrados neste trabalho. 77

Figura 20 – Aumento da quantidade de lipídeos em gramas por litro de meio de cultura entre 12º e 20º dia. 79

Figura 21 – Comparação dos experimentos realizados por meio da modelagem (cilindro) e experimentalmente (Erlenmeyer) 83

Figura 22 – Diferença de concentração no último dia de cultivo: 21A: maior concentração de microalgas com glicerol; 21B: menor concentração de microalgas sem glicerol. 84

Figura 23 – Concentração de biomassa em relação ao tempo para simulação de 24 horas de luz. 85

Figura 24 – Concentração de biomassa em relação ao tempo para simulação de 12 horas de luz. 87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do meio Guillard F/2 modificado. 55

Tabela 2 – Biomassa seca em gramas por litro em experimentos autotróficos e mixotróficos com diferentes maneiras de adição de glicerol..... 64

Tabela 3 – Planejamento Experimental das variáveis salinidade e fonte de carbono..... 66

Tabela 4 – Análise cinética da curva de crescimento da microalga *P. tricornutum* em cultivos com diferentes fontes de carbono de acordo com a equação logística..... 67

Tabela 5 – Biomassa Seca entre o 10º e 18º dia em gramas por litro de meio de cultivo. 69

Tabela 6 – Produção de lipídeos da microalga *Phaeodactylum tricornutum* 73

Tabela 7 – Planejamento experimental dos tratamentos realizados em várias concentrações de glicerol 73

Tabela 8 – Análise cinética da curva de crescimento da microalga *P. tricornutum* em cultivos com diferentes concentrações de glicerol 75

Tabela 9 – Resultados Biomassa Seca (g/L) 78

Tabela 10 – Constantes usadas na simulação numérica 83

LISTA DE SIGLAS

AGL – Ácidos graxos livres

ANP – Agência Nacional do Petróleo

ARA – Ácido araquidônico

ATP – Adenosina tri fosfato

BHT – butil-hidroxitolueno

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CMEA – Coleção de Microalgas Elisabeth Adair

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DHA – Ácido decosahexanóico

EPA – Ácido eicosapentanóico

FURG – Fundação Universidade Federal do Rio Grande

GIA – Grupo Integardo de Aquicultura

LEB – Laboratório de Engenharia Bioquímica

NADPH – Nicotinamida adenosina difosfato reduzida

NPDEAS – Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento em Energia Auto Sustentável

PNPB – Programa Nacional de Produção de Biodiesel

PS – Fotossistema

UFF – Universidade Federal Fluminense

UFPR – Universidade Federal do Paraná

USP – Universidade de São Paulo

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - por cento

‰ – partes por mil

μm – micrometros

[C] – concentração

Trat. - Tratamentos

^{0}C – graus Celsius

AGL – Ácidos Graxos Livres

B – biomassa seca pesada em gramas

B100 – Biodiesel puro

C – biomassa seca em gramas por litro

CO_2 – Dióxido de Carbono

d – dia

exp - exponencial

kgf - quilograma força

M – concentração molar

min – minuto

N – densidade celular (células/mL)

N – Nitrogênio

N_0 – densidade celular inicial (células/mL)

NaOH – hidróxido de sódio

rpm – rotação por minuto

SO_2 – Dióxido de Enxofre

T – temperatura

t – tempo

RESUMO

As condições para o cultivo de microalgas *Phaeodactylum tricornutum* foram estudadas com o objetivo de aumentar o conteúdo de lipídios das algas para a produção de biodiesel. As variáveis investigadas nos experimentos foram: salinidade, fonte de carbono (glicerol e glicose) e fotoperíodo. A partir da cinética de crescimento, análise de biomassa e produção de lípidos, foi possível determinar a produtividade da espécie de microalga estudada. A produção de lípidos aumentou devido à adição de uma fonte de carbono para o meio de cultura. Além disso, a adição de fonte de carbono no início do cultivo apresentou o melhor resultado. Entre os valores de salinidade testados nos experimentos, o que resultou no maior crescimento de microalgas foi de 15 ‰. A melhor fonte de carbono assimilável pelas microalgas foi glicerol a uma concentração de 0,1 M, proporcionando culturas com até 1,3 g / L de biomassa. Cultivos mixotróficos com um fotoperíodo de 24 h de luz, na presença de glicerol resultou em 338,97 mg / L de lípidos, sendo 80% mais elevada do que o cultivo autotrófico. Resultados de biomassa seca (g / L) foram comparados com os resultados de simulação obtidos com um modelo matemático publicado anteriormente por um período de 450 h. O modelo foi capaz de estimar uma concentração final de biomassa seca em boa concordância com os dados experimentais.

Palavras-chave: microalga, glicerol, lipídeos, biomassa seca e mixotrófico.

ABSTRACT

The conditions for cultivation of microalgae *Phaeodactylum tricornutum* were studied with the objective of increasing algae lipid content for the production of biodiesel. The variables investigated in the experiments were: salinity, carbon source (glycerol and glucose) and photoperiod. From the growth kinetics, and the analysis of biomass and lipid production, it was possible to determine the productivity of the studied microalgae species. The lipids production increased due to the addition of a carbon source to the culture medium. Furthermore, the carbon source addition in the beginning of the cultivation provided the best result. Among the tested salinity values in the experiments, the one that resulted in the highest microalgae growth was 15 ‰. The best assimilated carbon source by the microalgae was glycerol at a concentration of 0.1 M, providing cultures with up to 1.3 g / L of biomass. Mixotrophic cultivation with a photoperiod of 24 h of light in the presence of glycerol resulted in 338.97 mg / L of lipids, which was 80% higher than the autotrophic one. Dry biomass (g / L) results were compared to simulation results obtained with a previously published mathematical model for a period of 450 h. The model was capable of estimating a final concentration of dry biomass in good agreement with the experimental data.

Keywords: microalgae, glycerol, lipids, dry biomass e mixotrophic.

1 INTRODUÇÃO

Devido ao crescente consumo de combustíveis fósseis e aos gases gerados pela sua emissão, se faz necessário a busca por fontes alternativas e renováveis para a substituição dos combustíveis fósseis usados principalmente no transporte, os biocombustíveis apresentam-se como fonte de energia alternativa. Desde janeiro de 2010 a legislação brasileira determina a adição de 5% de biodiesel (B5) ao diesel comercializado nos postos do país. O boletim mensal de biodiesel emitido em fevereiro de 2011 pela ANP afirma que a produção de biodiesel de janeiro a dezembro de 2010 teve a seguinte distribuição da utilização de matérias primas: óleo de soja 82,93%, gordura bovina 13,60%, óleo de algodão 2,02% e outros materiais graxos 1,43% evidenciando a baixa diversidade e alta dependência da soja como pode ser observado na Figura 1(ANP, 2011).

Figura 1 – Matérias primas utilizadas no Brasil para produção de biodiesel. Fonte: Adaptado de ANP.

O Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento em Energia Auto Sustentável (NPDEAS) é um grupo que se formou a partir de um projeto aprovado pelo CNPq em 2007. Este projeto propôs a construção de um prédio auto sustentável em

energia elétrica a partir de biodiesel produzido do óleo extraído de microalgas cultivada em fotobiorreatores tubulares horizontais construídos de forma modular e compacta (SATYANARAYANA *et al.*, 2010). Posteriormente em 2008, foi aprovado outro projeto do CNPq e o NPDEAS pode complementar o projeto anterior aprimorando a produção de biodiesel a partir de microalgas. Com o objetivo de colaborar com pluralização das matérias prima para a produção de biodiesel NPDEAS localizado na UFPR vem trabalhando com a produção de biodiesel a partir de óleo extraído de microalgas cultivadas em fotobiorreatores compactos.

As microalgas apresentaram potencialidades no processo de obtenção de biocombustíveis. Em relação às oleaginosas apresentam custo relativamente baixo para transporte e colheita, possui maior eficiência fotossintética, são eficientes fixadoras de CO_2 e ainda, algumas espécies, podem ser cultivadas em meio salino. Sua característica unicelular assegura uma biomassa homogênea diminuindo assim a obtenção de resíduos e ainda elevada produção de lipídeos de acordo com a espécie.

Com a criação do NPDEAS, surgiu a possibilidade e necessidade de investigar as condições de crescimento de microalgas para que pudesse ser maximizada a produtividade de biocombustíveis. Um dos grandes problemas hoje enfrentados pelo homem é a correta disposição de resíduos proveniente da atividade humana, por isso tendo em vista que o NPDEAS tem esta preocupação com o meio ambiente, sendo um empreendimento sustentável busca-se estratégias para diminuição total de resíduos gerados.

O cultivo mixotrófico propicia maior rendimento de biomassa consequentemente apresenta maiores custos no investimento de variadas fontes orgânicas, por isso, o presente trabalho apresenta uma maneira eficaz e produtiva de reaproveitamento de resíduos gerados a partir do processo de transesterificação para a produção de biodiesel.

Em cultivos de microalgas, a fonte de nutrientes consiste num componente que eleva os custos de produção, porém para elevar a produção tem-se utilizado fontes orgânicas de carbono já que muitas microalgas são capazes de assimila-lo.

Microalgas podem ser cultivadas em regime autotrófico, heterotrófico e mixotrófico. No regime autotrófico as células realizam seus processos vitais a partir da fonte de nutrientes disponíveis no meio de cultivo e da luz que desencadeia o processo fotossintético, no regime heterotrófico são disponibilizados às células todos os nutrientes necessários para que desempenhem seus processos metabólicos sem a presença de luz e no regime mixotrófico, atuam o metabolismo heterotrófico e autotrófico simultaneamente, além da fonte de nutrientes utiliza-se o carbono orgânico os quais podem ser: melaço, acetato, glucose ou glicerol.

Uma tonelada de biodiesel produz cerca de 110 kg de glicerol bruto ou cerca de 100 kg de glicerina pura (BERH, 2008), no entanto, deve ser encontrado um destino adequado para esta produção a fim de evitar o acúmulo deste material, por isso neste trabalho sugere-se a devolução deste para o meio de cultivo como alternativa de reaproveitamento de resíduos. Esta devolução ao meio requer uma análise cuidadosa para que possa realmente aumentar a produtividade. Por isso devem ser conhecidas quais as taxas de concentrações e hora do dia em que se deve devolver o glicerol para o meio de cultivo.

Esta dissertação de mestrado tem o propósito de identificar variáveis de modo que seja otimizado um meio de cultura para a microalga *Phaeodactylum tricornutum* para que se obtenha a máxima produção de lipídeos. Ao investigar variáveis como salinidade, fonte de carbono e fotoperíodo, pretende-se contribuir na identificação de problemas que possam surgir durante o cultivo em grande escala em fotobiorreatores compactos do NPDEAS. A maximização na produção de lipídeos através da inserção de fonte de carbono ao meio de cultura é investigada por diversos autores (Tsuzuki *et al.*, 1990; Fábregas *et al.*,1996; Feng Chen e Wen, 2003; Camacho *et al.*, 2005; Costa e Radmann, 2008; Soares, 2009; Penteado, 2009). O glicerol é uma destas fontes de carbono e é estudado neste trabalho. O glicerol foi escolhido como fonte de carbono já que o foco deste trabalho é o reaproveitamento de resíduos produzidos durante a produção de biodiesel durante o processo de transesterificação. A devolução deste composto ao meio de cultura foi investigada tendo em vista que o NPDEAS tem como maior

objetivo a sustentabilidade, por isso é necessário que se pense no que fazer com a produção de resíduos gerados durante todo o processo.

1.1 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

No capítulo 2 deste trabalho é apresentada uma revisão bibliográfica sobre os temas relacionados a esta pesquisa como: estudo das microalgas, fatores que influenciam nos cultivos, tipos de cultivos e ainda como a simulação numérica pode contribuir para estas pesquisas. Já no capítulo 3 estão listados alguns desafios e objetivos que se pretende com este trabalho. As metodologias realizadas para determinação de valores quantitativos e qualitativos são descritas no capítulo 4. No capítulo 5 há uma discussão dos resultados obtidos. Finalmente nos capítulos 6, 7 e 8 são apresentadas as conclusões, sugestões para trabalhos futuros e as referências utilizadas no trabalho, respectivamente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A diversificação da matéria prima para a produção de biodiesel vem sendo incentivada pelo Programa Nacional de Produção de Biodiesel (PNPB), que é um programa do Governo Federal objetiva a implementação de forma sustentável, a produção e uso do biodiesel, com enfoque na inclusão social e no desenvolvimento regional, via geração de emprego e renda. A biomassa de microalgas é uma destas matérias-primas, que apresenta possibilidade de produção de biodiesel e permite a substituição de atuais fontes de modo ambientalmente sustentável (TEIXEIRA e MORALES, 2006).

No ambiente natural, assim como nos cultivos, o crescimento de uma população microalgal é resultado da interação entre fatores biológicos, físicos e químicos (RAVEN, 1988). É necessária uma boa caracterização da tolerância a variações ambientais como temperatura e salinidade que ocorrem em meios de cultivo com a microalga *Phaeodactylum tricornutum* apesar de ter sido apontada por Chisti (2007), apropriada para a produção de biodiesel. Portanto é necessário conhecer as condições em que o meio é otimizado, para que a produção atinja o máximo potencial no menor tempo possível especialmente no que se refere aos principais fatores que controlam o crescimento das microalgas e sua composição bioquímica.

As microalgas além de utilizar a fotossíntese como metabolismo principal para obtenção de carbono em cultivos autotróficos pode ser cultivadas consumindo fontes orgânicas de carbono nos cultivos mixotróficos, estimulando assim o seu crescimento (ANDRADE e COSTA, 2007).

O carbono é um dos compostos mais importantes de todas as substâncias orgânicas sintetizadas pelas células, sendo ideal em altas concentrações no cultivo. No meio natural ele não é um fator limitante, no entanto torna-se limitante em culturas densas, como no caso de fotobiorreatores compactos. A condição de luz a qual deve ser considerada em termos de fotoperíodo, intensidade e qualidade (comprimento de onda) é de fundamental importância para as microalgas, sendo um fator de condição para o seu crescimento. A quantidade de

intensidade luminosa recebida irá repercutir na quantidade de carbono a ser fixado determinando consequentemente na produção de biomassa (LOURENÇO, 2006).

A modelagem matemática aliada aos dados experimentais tem contribuído para estimar a velocidade de crescimento celular, a partir de parâmetros que podem influenciar na produtividade, tais como: temperatura, intensidade luminosa e concentração de nutrientes. A modelagem relaciona a variável de resposta às variáveis explanatórias e ainda o quanto a resposta esperada se desvia da resposta observada (LACERDA, 2009). Molina *et al.* (2005), analisou por meio da modelagem matemática o comportamento de culturas de *Haematococcus pluvialis* sob influência da intensidade luminosa e da concentração de nutrientes sobre a taxa de crescimento e acúmulo de carotenoides. A modelagem matemática foi proposta a partir do comportamento observado da cultura de microalgas e os valores determinados para os parâmetros foram de acordo com aqueles encontrados por outros autores. O modelo proposto foi uma ferramenta útil para o concepção e gestão de culturas de *Haematococcus*, e pode permitir a melhoria do rendimento do processo de produção. Ribeiro *et al.* (2009) verificou com o uso da modelagem, as variáveis temperatura e intensidade luminosa identificando o fenômeno de fotoinibição, que ocasiona o decréscimo ou mesmo morte celular, dentro de tubos de fotobiorreatores. Morais *et al.* (2009) verificou o crescimento da microalga *Phaeodactylum tricornutum* com adição de fonte de carbono orgânico ao meio de cultura e comparou com a modelagem computacional a partir de uma equação proposta por García-Malea (2005) e obteve valores de concentração de biomassa muito semelhantes atingindo aproximadamente 1,3 g/L em ambos os experimentos.

Atualmente os elevados custos de produção no cultivo de microalgas em fotobiorreatores, tem sido uma barreira, pois, para manter um cultivo de microalgas economicamente viável para produção de biocombustíveis, é fundamental a redução dos custos de produção. Além da água, os substratos adicionados são fundamentais para o crescimento das microalgas. Para o preparo de 1000 mL de meio de cultivo Guillard F/2 são gastos em torno de R$ 3,95. O componente mais abundante neste meio de cultivo é o nitrato de sódio que devido

à quantidade adicionada torna o meio de cultivo mais caro (MELLO, 2010). Para que os cultivos autotróficos e mixotróficos melhorem as produtividades e diminuam os custos, deve-se utilizar matérias primas de baixo valor agregado como rejeitos agrícolas, urbanos ou industriais, em substituição aos nutrientes empregados (MARIANO, 2010).

Com base nos dados de Mello (2010) para preparar 1000 mL do meio Guillard há um custo de R$3,95. A partir deste dado foi possível calcular o custo de produzir 1 kg de óleo de microalga *Phaeodactylum tricornutum* de acordo com os maiores valores de biomassa e produção de óleo obtidos neste trabalho. Levando em consideração apenas o valor do meio de cultivo são gastos em torno de R$18.458,00 para produzir um quilograma de óleo desta microalga num cultivo em batelada.

Contudo, a modelagem ao predizer condições ótimas para o cultivo consegue promover um aumento de produtividade dos cultivos e consequentemente diminuir o custo de produção de biomassa.

Para realizar cultivos massivos de microalgas, em escala industrial e comercial são empregados sistemas que contribuam para que o cultivo não seja caro, tenha qualidade, seja facilmente controlado e ainda que proporcione grande produção em qualquer época do ano. O sistema mais comumente usado em diversas regiões do mundo é o sistema de tanques, lagoas ou pista de corrida onde a cultura é agitada por meio de pás giratórias que mantém o cultivo num fluxo contínuo para que as células fiquem expostas a luz solar para que se processe a fotossíntese. Outro sistema empregado é o cultivo em fotobiorreatores, neste tipo de cultivo as células percorrem por tubos transparentes o qual permitem a passagem de luz para que as células realizem a fotossíntese. É um sistema mais eficiente do que cultivos em tanques em relação aos riscos de contaminação já que trata-se de um sistema fechado.

2.1 DEFINIÇÃO DE BIODIESEL

De acordo com a Lei nº 11.097 de 13 de janeiro de 2005, o biodiesel é um “biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a

combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil" (BRASIL, 2008). Posteriormente a Resolução nº7, de 19 de março de 2008 a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) complementa que o B100 (refere-se à mistura biodiesel/diesel, apresentando 100% de biodiesel), é um “combustível composto de aquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais”. Esta lei determina ainda que o biodiesel deva ser introduzido na matriz energética brasileira, sendo fixados 5% em volume, o percentual mínimo obrigatório ao óleo diesel comercializado ao consumidor final após oito anos da publicação da referida lei. Ao contar três anos após a publicação da mesma, um percentual intermediário de 2% deveria ser utilizado (BRASIL, 2005). A partir da Resolução nº 6 de 16 de setembro de 2009, a mistura de 5% foi antecipada e o B5 (contendo 5% de biodiesel à mistura biodiesel/diesel) entrou em vigor em janeiro de 2010.

Para que o biodiesel seja produzido, os triacilgliceróis (maiores componentes dos óleos vegetais e gordura animal) são submetidos a uma reação química denominada transesterificação. Nesta reação os triacilgliceróis provenientes dos óleos vegetais ou gorduras animais na presença de um álcool como o metanol e o etanol que são os mais empregados e um catalizador reagem para produzir como produto principal os alquil ésteres que possuem propriedades similares às do diesel do petróleo e o glicerol como subproduto. O catalisador pode ser uma base, como por exemplo, o hidróxido de sódio (NaOH), um ácido ou uma enzima (KNOTHE *et al.*, 2006). A Figura 2 exemplifica de maneira detalhada a reação de transesterificação de triglicerídeos, o processo mais utilizado atualmente para a produção de biodiesel. Na Figura 2a é apresentada a reação global onde o triglicerídeo e o álcool na presença de um catalisador forma o glicerol e os ésteres, enquanto na Figura 2b é possível verificar as etapas intermediárias da reação. O processo acontece em uma sequencia de três etapas, sendo cada uma das etapas reversíveis, em que diacilglicerídeos e monoacilglicerídeos são formados como intermediários. O processo inicia-se ao

misturar o óleo proveniente da microalga com um álcool e catalisadores que podem ser ácidos, básicos ou enzimáticos. Devido ao caráter reversível da reação de transesterificação o agente transesterificante (álcool), geralmente é adicionado em excesso, contribuindo, assim, para aumentar o rendimento do éster, bem como permitir a sua separação do glicerol formado. Além do tipo de catalisador parâmetros como a razão molar entre o álcool e o óleo vegetal, a temperatura, o tempo de reação, o grau de refino do óleo empregado e o efeito da presença de umidade e ácidos graxos livres tem sido investigados (KNOTHE *et al*., 2006).

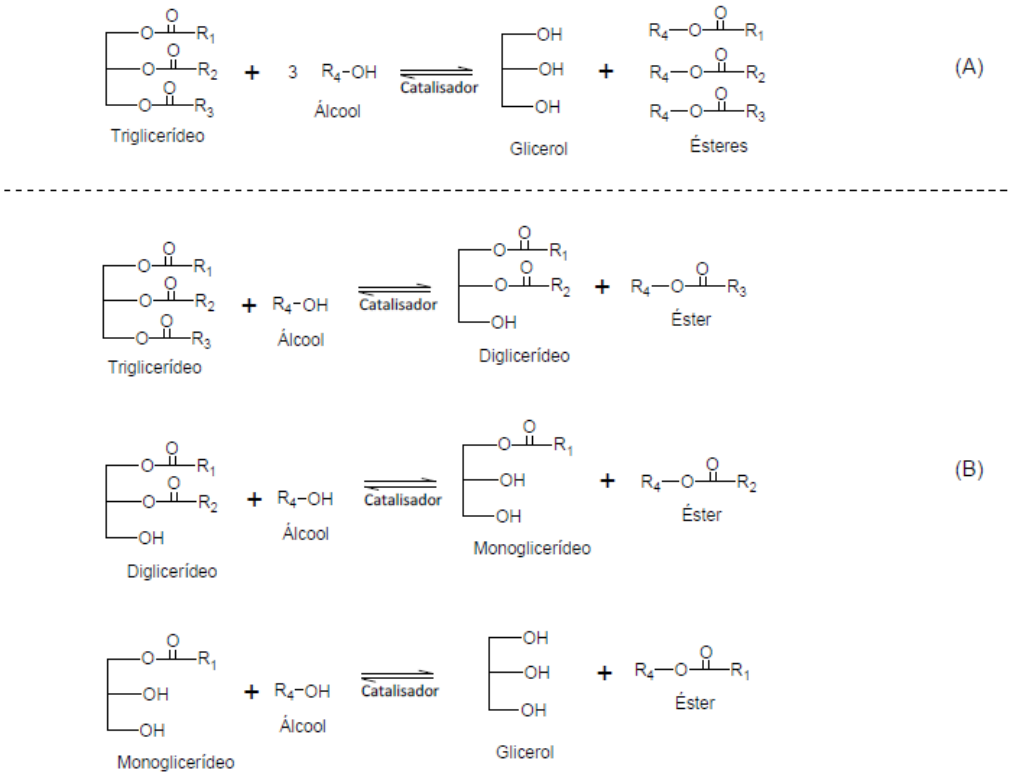

Figura 2– Reação de transesterificação. A- reação geral; B-reações intermediárias. FONTE: Soares (2010).

A transesterificação é o método mais comum e o único que leva a produtos comumente denominados biodiesel, isto é, ésteres alquílicos de óleos e gorduras. Os ésteres mais comumente empregados são os ésteres metílicos, principalmente porque o metanol é geralmente o álcool mais barato, embora existam exceções

em alguns países. No Brasil, por exemplo, onde o etanol é mais barato, ésteres etílicos são utilizados como combustível (ARAÚJO e SANTOS, 2008).

A glicerina proveniente desta reação é uma substância de valor agregado a qual é muito empregada na indústria farmacêutica e cosmética sendo utilizada na composição de cápsulas, supositórios, anestésicos, xaropes e emolientes para cremes e pomadas. Por ser não tóxico, não irritante, sem cheiro e sabor, o glicerol tem sido aplicado como emoliente e umectante em pastas de dente, cremes de pele, loções pós-barba, desodorantes, batons e maquiagens. Pode ainda ser usado como umectante e para conservar bebidas e alimentos tais como refrigerantes, balas, bolos, pastas de queijo e carne, ração animal seca BIODIESELBR, 2008).

Após a reação de transesterificação é possível que resquícios de glicerol fiquem retidos no biodiesel. Em grande quantidade de biodiesel o glicerol é essencialmente insolúvel, porém em pequenas quantidades o glicerol é capaz de dissolver-se. A maior parte do glicerol deve ser removida do produto durante as etapas de lavagens aquosas. Combustíveis com teores excessivos de glicerol livre geralmente apresentarão problemas com a deposição de glicerol em tanques de armazenamento, criando uma mistura viscosa que pode entupir filtros de combustível e causar problemas no processo de combustão do motor. O glicerol quando presente no biodiesel, afeta a sua qualidade aumentando sua viscosidade, consequentemente aumenta problemas relacionados à atomização do combustível no momento de sua injeção na câmara de combustão e a formação de depósitos no motor (KNOTHE *et al.*, 2006). O óleo vegetal bruto não pode ser diretamente colocado no tanque dos veículos diesel. Este procedimento leva à formação de depósitos nos cilindros do motor, à contaminação do lubrificante, a emissão de substâncias nocivas à saúde com a acroleína (substância cancerígena), além de emitir um odor extremamente desagradável dos escapamentos. Para evitar esses inconvenientes deve-se adaptar o motor ao combustível e adequar o combustível ao motor, realizando um tratamento químico chamado de craqueamento, esterificação ou transesterificação, a fim de eliminar a glicerina contida no óleo, principal responsável pela inadequação do uso da gordura bruta.

Atualmente há inúmeros usos para o glicerol com alto teor de pureza (>95%), mas o glicerol que provém diretamente do processo de transesterificação é bruto com resíduos de sal e minerais, substâncias orgânicas, incluindo ácidos graxos e ésteres; água e açúcares. O éster bruto é normalmente de alta qualidade quando são usados óleos refinados de boa qualidade como matérias primas, no entanto o emprego de óleos de baixa qualidade para a produção de biodiesel tais como óleos de frituras reciclados, resultam num glicerol bruto de qualidade inferior que contém várias impurezas, que dificultam o seu refino (APPLEBY *et al.*, 2006).

2.1.1 Matérias-primas e processo para produção de biodiesel

As matérias primas para a produção de biodiesel podem originar-se a partir de óleos vegetais, gorduras animais e ainda de óleos e gorduras residuais, no entanto, mudanças no procedimento de reação são frequentemente necessárias devido a presença de ácidos graxos livres (AGL) (KNOTHE *et al.*, 2006). Todo óleo, desde que enquadrado na categoria de óleos fixos ou triglicerídicos, poderão ser transformados em biodiesel. Destacam-se como matérias primas para a produção de biodiesel, os óleos das seguintes espécies vegetais: soja, grão de amendoim, polpa do dendê, amêndoa do coco de dendê, amêndoa do coco da praia, caroço de algodão, amêndoa do coco de babaçu, semente de girassol, baga de mamona, semente de colza, semente de maracujá polpa de abacate, caroço de oiticica, semente de linhaça, semente de tomate, entre muitos outros vegetais em forma de sementes, amêndoas ou polpas. Já as gorduras animais possuem estruturas químicas semelhantes as dos óleos vegetais, sendo moléculas triglicerídicas de ácidos graxos. As diferenças estão nos tipos e distribuições dos ácidos graxos combinados com o glicerol, podendo ser da mesma forma, transformadas em biodiesel. O sebo bovino, os óleos de peixes, o óleo de mocotó, a banha de porco, entre outras matérias graxas de origem animal são matérias primas possíveis de serem utilizadas para produção de biodiesel. Além dos óleos e gorduras provenientes diretamente dos vegetais e animais, são usados para produção de biodiesel, óleos e gorduras residuais, resultantes de processamentos

domésticos, comerciais e industriais. Os óleos provenientes de frituras representam um importante papel na produção de biodiesel (COLLARES, 2009).

2.2 MICROALGAS COMO FOCO DE ESTUDO PARA BIODIESEL

A vantagem mais atraente para a produção de biodiesel a partir de microalgas ao invés do uso de tradicionais oleaginosas como soja, por exemplo, refere-se à área territorial utilizada para tal cultivo. De acordo com Chisti (2007), ao produzir biodiesel com óleo de palma, seria necessário quase um quarto da área agriculturável disponível nos Estados Unidos da América (EUA), em contrapartida, ao utilizar óleo proveniente de microalgas cultivadas em fotobiorreatores, bastaria 1 a 3% desta área.

O Brasil é o segundo maior produtor e processador mundial de soja em grão. Atualmente 59% da produção de biodiesel mundial utiliza a soja como matéria-prima predominante, porém as microalgas tem se destacado como fonte de matéria-prima de alto valor por apresentarem destaque como fonte de matéria prima de alto valor devido as grandes vantagens em relação à soja e outras oleaginosas (ABIOVE, 2009). As microalgas apresentam clorofila e outros pigmentos fotossintéticos, os quais são capazes de realizar fotossíntese. Sua sistemática implica na consideração de diversos critérios a qual estão relacionadas. São principalmente encontradas no meio marinho, em água doce e no solo e são responsáveis por pelo menos 60% da produção primária de oxigênio na Terra (CHISTI, 2007). Pertencem a um grupo de organismos muito diversos e importantes, podendo ser cultivadas em laboratório de acordo com a especificidade de cada espécie de microalga. Os primeiros estudos sobre o cultivo de microalgas no Brasil foram realizados no início da década de 1970 por Clóvis Teixeira e Armando A. H. Vieira sobre o cultivo da diatomácea *Phaeodactylum tricornutum* na Universidade de São Paulo (USP) (LOURENÇO, 2006). Devido a uma vasta gama de atividades é conhecida à importância do cultivo das microalgas, sendo assim de acordo com a necessidade de biomassa é necessário coletar os organismos da natureza e “domesticá-los” para torná-los utilizáveis. As aplicações do uso das microalgas são as mais variáveis, das mais simples às mais

complexas. Seu uso pode ser empregado para alimentação de animais e do próprio homem, ou mesmo para a extração de lipídeos para a produção do biocombustível (LOURENÇO, 2006).

As microalgas são organismos geralmente microscópicos, unicelulares, que podem formar colônias, com pouca ou nenhuma diferenciação celular. Caracterizam-se pela presença de pigmentos, responsáveis pela coloração variada e por mecanismo fotoautotrófico (RAVEN *et al.,* 2001).

Devido à identificação de diversas substâncias sintetizadas pelas microalgas, têm aumentado o interesse no seu potencial biotecnológico. Por isso, cultivos de microalgas têm sido realizados visando à produção de biomassa para uso na alimentação bem como para obtenção de compostos naturais com alto valor no mercado mundial (DENER, 2006). Para aumentar o rendimento e reduzir os custos são necessárias pesquisas que resultem na utilização da espécie mais produtiva já que em geral a produção de microalgas é dispendiosa, pois requer trabalho intensivo, assepsia e disponibilidade de espaço (BOROWITZKA, 1997).

Diversos estudos apontam numerosas vantagens ao utilizar as microalgas, desde a escolha da cepa de acordo com a região e sistema de cultivos até os produtos finais, que além do biodiesel pode ser obtidos simultaneamente diversos produtos de elevado valor agregado. Podem ser extraídos da biomassa microalgal pigmentos como carotenóides, astaxantina, ficobilina e polímeros como polissacarídeos, os quais podem ser utilizados na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica. Há ainda os ácidos graxos poliinsaturados que são utilizados como suplemento alimentar, dentre os quais se destacam o ARA (ácido araquidônico), o EPA (ácido eicosapentanóico) e o DHA (ácido docosahexanóico) (DERNER *et al*., 2006; SPOLAORE *et al*., 2006).

As microalgas apresentam inúmeras vantagens em relação à outras matérias primas que não microalgas para serem cultivadas, tais como:

- sistema de cultivo pode ser construído em solos inférteis, o que não compete com o solo destinado para a agricultura;
- ciclo de vida processa-se de maneira relativamente rápida já que algumas microalgas reproduzem-se facilmente por divisão binária, outras

apresentam alternância de gerações apresentando maneiras diferentes de reprodução durante seu ciclo reprodutivo;

- a produção de biomassa pode se dar paralelamente a fixação de dióxido de carbono (CO_2) proveniente de gases de exaustão de indústrias, contribuindo assim, para que estes gases não sejam lançados na atmosfera e ainda para o aumento da produtividade de biomassa;
- unicelularidade da cultura de microalgas que garantem uma biomassa homogênea e uniforme, sendo possível a utilização de toda a célula, já nas oleaginosas partes das plantas não são aproveitadas, sendo necessário selecionar a parte de interesse da planta como partes do fruto por exemplo.

2.2.1 Cultivos de microalgas

Para cultivos em escala industrial tais como cultivo em tanques ou fotobiorreatores é necessário manutenção de cepas em ambiente com condições controladas (LOURENÇO, 2006). O cepário é um ambiente onde de acordo com a espécie, a temperatura e luminosidade é fornecida de modo a garantir a viabilidade da cepa. Com isso é possível repicá-la em recipientes de maior volume de meio de cultura a fim de aumentar o número de células para que seja inoculado em grandes volumes de meio de cultura.

Diversos meios de produção podem ser empregados no cultivo de microalgas, variando o seu volume de poucos litros até bilhões de litros. Desde sistemas pouco sofisticados, como no caso de cultivo em tanques abertos sob condições naturais de iluminação e temperatura, e com baixo ou nenhum controle de parâmetros, até os mais sofisticados, como é o caso de fotobiorreatores (BOROWITZKA, 1999).

Os cultivos em tanques podem ser realizados em diferentes formas: circular, retangular ou cilíndrica de tal modo que a configuração assegure movimentação conveniente ao cultivo, melhor aproveitamento de espaço e ainda melhor aproveitamento da radiação luminosa (LOURENÇO, 2006). A superfície interna dos tanques deve ser lisa para evitar danos em decorrência do atrito das

células às paredes e ainda para permitir maior reflexão da luz (LOURENÇO, 2006; BOROWITZKA, 1999; COUTTEAU, 1996).

As Figura 4A e 3B apresentam as lagoas da empresa Cyanotech localizada no Hawai responsável pela produção de biomassa de *Spirulina sp* e *Haematococcus pluvialis.* Em detalhes na Figura 3B é mostrado o sistema de pás giratórias que permitem a agitação da água e consequente homogeinização da biomassa microalgal. A Earthrise Nutritionals localizada na Califórnia é a maior produtora de *Spirulina sp* do mundo e possui 30 tanques abertos de 5.000m^2 como pode ser visto na Figura 3C. A biomassa produzida por ambas empresas é comercializada como suplemento alimentar (CYANOTECH, 2011; EARTHRISE, 2011).

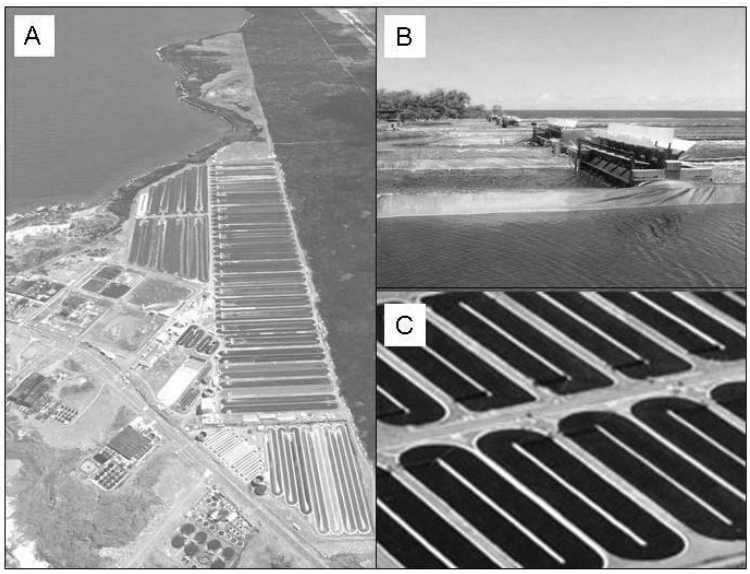

Figura 3 - (A) e (B) Produção de *Spirulina sp* e *Haematococcus pluvials* no Hawai (EUA) (C) Produção de *Spirulina sp* na Califórnia (EUA). FONTE: (A) e (B) CYANOTECH, 2011; (C) EARTHRISE, 2011.

Devido a limitações e algumas desvantagens proporcionadas por sistemas de cultivo abertos, cultivos têm sido desenvolvidos em fotobiorreatores. O fotobiorreator é um equipamento específico utilizado para o cultivo de microalgas em sistema fechado, construído com tubos transparentes no qual o cultivo pode ser controlado com maior eficiência do que em cultivos em tanques abertos. A quantidade de nutrientes, temperatura, iluminação, pH, são parâmetros

influenciam muito no cultivo e que podem ser controlados, visando uma elevada produtividade. Os cultivos realizados em tanques abertos proporcionam custo relativamente baixo em relação à fotobiorreatores, porém desvantagens como riscos de contaminação, grande área para realização de cultivo, suscetibilidade à variações de temperatura, iluminação e evaporação tornam os cultivos em fotobiorreatores compactos mais interessantes.

A Figura 4 mostra diferentes sistemas de cultivo em escala laboratorial e industrial. Nas Figura 4A e 4B são apresentados cultivos com a microalga *Spirulina sp* realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) na Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Na Figura 4A é mostrado um tanque com volume de 10.000L em sistema de “pista de corrida” que é composto por um circuito fechado com circulação e mistura da microalga. Na Figura 4B é apresentado cultivos abertos e fechados em pequeno volume. A Figura 4C mostra o cultivo da microalga *Scenedesmus sp* realizado em fotobiorreator compacto no NPDEAS, localizado na UFPR.

Para inoculação de microalgas nos fotobiorreatores do NPDEAS foi necessário desenvolver uma sala para manutenção de cepas e propagação do inóculo. Esta sala possui sistema de aeração efetuada através de um equipamento de ar comprimido que apresenta na linha pressão de fluido entre 6 e 7 bar. Um regulador de pressão é utilizado para reduzi-la para 1,5 bar. Após passar pelo regulador de pressão a tubulação é dividida em duas, visando abastecer três prateleiras que comportam Erlenmeyers de 2l até galões de 20l. Sistema de iluminação fornecidas por lâmpadas fluorescente de mesma potência e ar condicionado para o sistema de refrigeração que mantém a temperatura do ambiente constante também foram instalados.

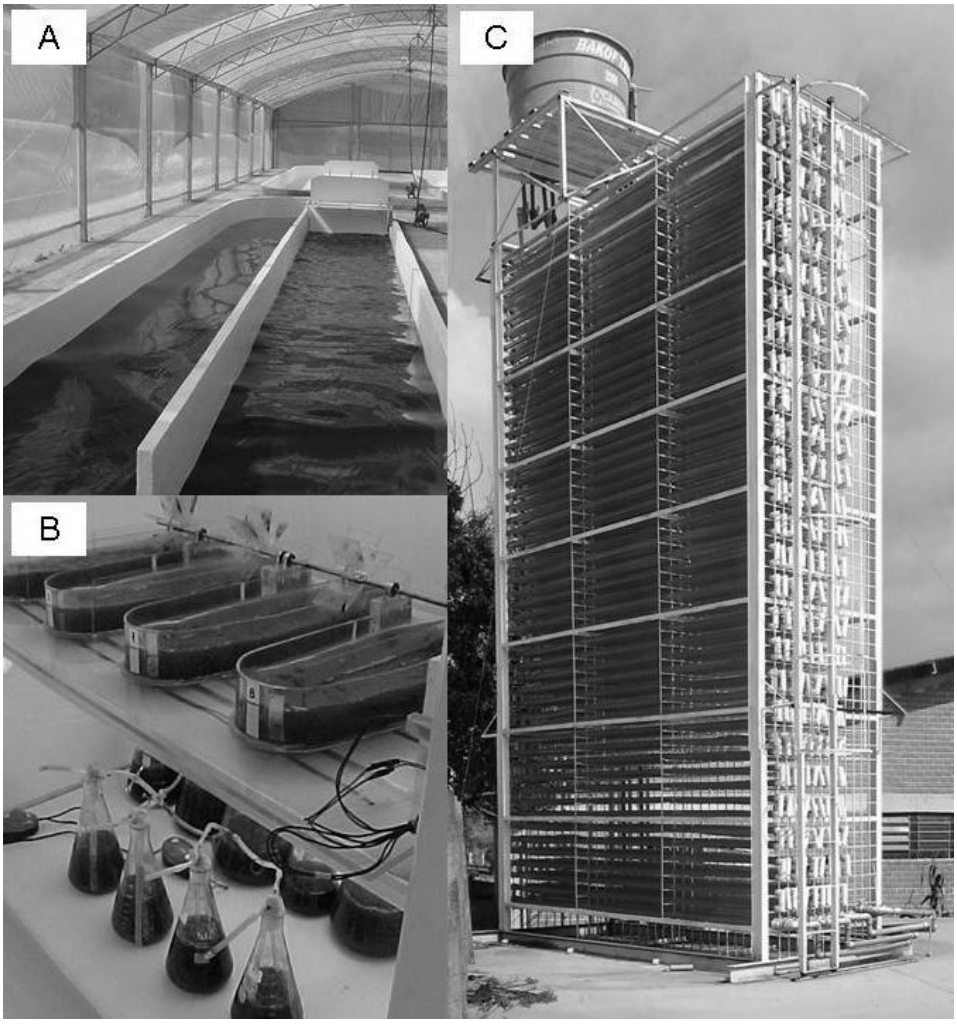

Figura 4 – Sistema de cultivo de microalgas. (A) tanque de volume 10.000L; (B) Erlenmeyer e pista de corrida, volume de 2L; (C) Fotobiorreator construído no NPDEAS. FONTE: (A) e (B) FURG, 2010; (C) O AUTOR (2010).

A Figura 5 apresenta a configuração dos Erlenmeyers e galões nos quais os meios de cultivos são propagados até a inoculação no fotobiorreator. Nos Erlenmeyers de 250 ml a cultura não recebe aeração devido a pequena quantidade de células e a partir dos Erlenmeyers de 2l de volume os mesmos passam a receber aeração por meio de uma pipeta que realiza o borbulhamento até o fundo do frasco a fim de evitar sedimentação.

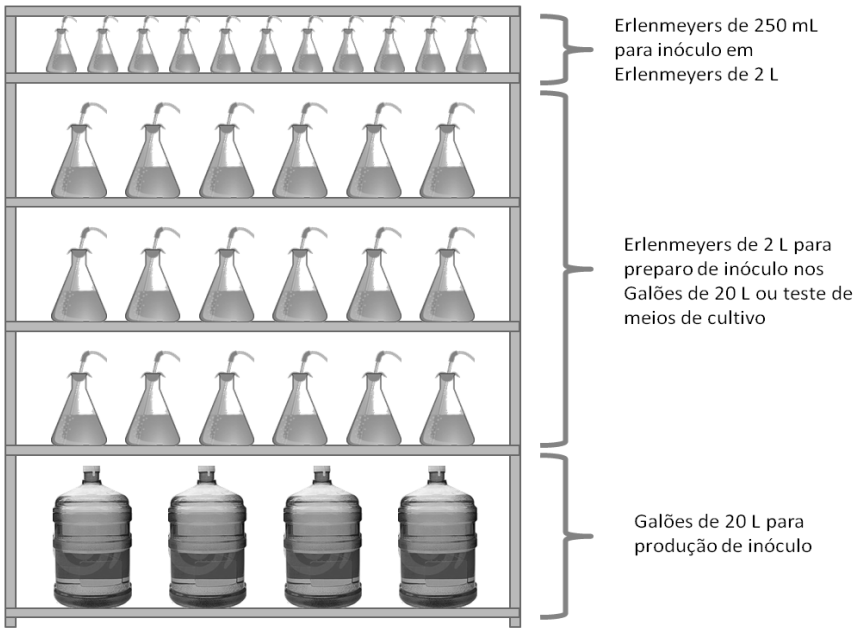

Figura 5 – Disposição dos meios de cultura com a microalga para preparo do inóculo nos fotobiorreatores. FONTE: MARIANO *et al.*, 2010.

2.2.2 Produção de lipídeos a partir de microalgas

De acordo com a espécie a quantidade de lipídeos de uma célula microalgal pode variar entre 15 a 69% da biomassa seca. Esta discrepância entre valores de lipídeos se dá pela variedade de espécies existentes bem como as variáveis as quais estão submetidas que podem limitar ou favorecer no armazenamento de lipídeos. Os lipídeos são elementos estruturais da membrana celular e de várias organelas que controlam o movimento de substâncias para o interior das células. A variação de lipídeos também está associada à disponibilidade de nitrogênio, pois ele contribui para a formação de proteínas. A redução na quantidade de nitrogênio no meio de cultura possibilita que lipídeos e carboidratos sejam preferencialmente sintetizados (RIGANO, 1998; VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004; SATYANARAYANA, 2010). A microalga *Phaeodactylum tricornutum* pode apresentar segundo Chisti (2007) de 20 a 30% de óleo em relação ao seu peso seco. Fatores físicos, químicos ou biológicos podem influenciar na quantidade de

lipídeos armazenados na célula, por isso esses fatores são frequentemente utilizados para aumentar a quantidade de lipídeos na célula.

Alguns nutrientes podem influenciar na produção de lipídeos e ácidos graxos, tais como nitrogênio e enxofre, por serem utilizados pelas microalgas para síntese de aminoácidos e ácidos graxos (COSTA e RADMANN, 2008). Para Tsuzuki *et al.*1990, a adição de CO_2 aos cultivos influencia no conteúdo lipídico e no grau de insaturação dos ácidos graxos, sendo este, portanto, um nutriente essencial no cultivo de microalgas. Costa e Radmann (2008) investigaram o cultivo de diversas espécies de microalgas com adição de CO_2, SO_2, e NO e todas as espécies estudadas apresentaram biomassa rica em ácidos graxos, permitindo o seu uso na produção de biocombustíveis. Alonso *et al.* (1994) estudaram a influência de diferentes concentrações de nitratos, citrato férrico, fosfatos, magnésio e % de CO_2 complementando a aeração no cultivo da microalga marina *Isochrysis galbana* para produção de ácidos graxos poliinsaturados e identificou através da metodologia de otimização por superfície de resposta a limitação do crescimento microalgal devido as diferentes concentrações dos nutrientes. Através de metodologia de resposta percebeu-se que o aumento de concentração de fosfatos no meio de cultivo inibe a formação de EPA (Ácido Eicosapentanóico) e DHA (Ácido docosa-hexanóico), porém quando simultaneamente há elevação da concentração de ferro há um aumento de resposta para ambos os ácidos graxos.

Camacho e*t al.,* (2005) realizou experimentos com a microalga *Phaeodactylum tricornutum* adicionando glicerol nas seguintes concentrações: 0M, 0,005M, 0,01M, 0,05M e 0,1M e obteve a maior valor de biomassa em cultivos com concentração de 0,1M de glicerol. Camacho *et al.* (2005) atingiu uma biomassa de 2,99 g/L, porém injetou CO_2 em seus experimentos. De acordo com Ishida *et al.* (2000) a produtividade pode aumentar até sete vezes com a adição de CO_2 aos cultivos. O CO_2 é a fonte de carbono preferida pelas microalgas, porque se difunde passivamente do meio de cultura ao meio intracelular, sendo utilizado diretamente nos processos de fixação de carbono (DERNER, 2006).

A privação de nutrientes para microalgas tem sido estudado por diversos autores para se averiguar a real necessidade de determinados nutrientes. A adição de determinados nutrientes pode influenciar na sintetização de compostos de interesse. Além disso, é importante a diminuição de nutrientes com a finalidade de diminuir custos na produção comercial (ALONSO *et al.*, 1994; CERÓN GARCÍA *et al.*, 2000; MENG *et al.*, 2009; PENTEADO, 2010). Recentemente Penteado (2010) estudou a influência do nitrogênio, ferro, silício, fósforo e glicerol para o crescimento da microalga *Phaeodactylum tricornutum* e verificou que a manipulação do meio de cultura é uma estratégia muito eficiente para aumentar a quantidade de lipídeos produzidos pela microalga.

A curva de crescimento de uma espécie de microalga é compreendida pelas fases *lag*, onde não há crescimento, mas uma adaptação da microalga ao meio de cultura, fase *log* ou *exponencial*, onde ocorre a maior taxa de crescimento, fase *estacionária*, na qual a taxa de crescimento é igual à taxa de mortalidade e a fase de *declínio*, devido a falta de nutrientes não há mais crescimento.

Os efeitos da variação de concentração de CO_2 nos cultivos da microalga *Nannochloropsis oculata* a fim de produzir lipídeos que podem ser transformados em biodiesel foi investigado por Lin *et al.* (2009). Os estudos mostraram que o acúmulo de lipídeos em determinada fase de crescimento (log) para outra fase (estacionária) foi significativamente aumentado de 30% para 50% e concentração de 2% de CO_2 apresentou resultados significativos tanto para biomassa quanto para produção de lipídeos.

2.3 FATORES QUE INFLUENCIAM NO CULTIVO DE MICROALGAS

A interação de fatores químicos, físicos e biológicos influencia no cultivo de microalgas, podendo ser favoráveis ou desfavoráveis ao crescimento da microalga. Os fatores biológicos estão associados à taxa metabólica celular enquanto os fatores físicos e químicos, relacionam-se a efeitos provocados pela luz, temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes (RICHMOND, 2004; TAIZ & ZEIGER, 2006; DERNER, 2006; RAVEN, 1996).

Assim como todos os organismos vivos, as microalgas podem prosperar em uma estreita gama de temperaturas. O crescimento é inibido, ou mesmo interrompido fora deste intervalo, e, em alguns casos, as microalgas podem morrer. Por isso meios artificiais para manter o crescimento ótimo podem ser utilizados, mas em alguns casos como em escala industrial, o custo pode ser elevado.

Os cultivos de microalgas exigem nitrogênio, fósforo, enxofre e outros nutrientes para crescer, além disso, diatomáceas como a microalga *Phaeodactylum tricornutum* também exigem sílica para a construção da parede celular, portanto a baixa taxa de um nutriente vai reduzir a taxa de crescimento. Sendo assim, as exigências nutricionais e temperatura devem ser mantidas dentro de um intervalo ótimo para promover o máximo crescimento.

Uma grande questão no cultivo em fotobiorreatores compactos é o auto sombreamento, em alta densidade celular de culturas, as células mais perto da fonte luminosa absorvem a luz impedindo-a de alcançar as células mais distais. Esta limitação é um pouco reduzida, ao proporcionar boa mistura de células por meio de agitação para evitar gastar muito tempo na sombra dentro de fotobiorreatores fechados.

São conhecidas muitas variáveis de influência para a realização dos experimentos tais como, temperatura, pH, salinidade, luminosidade, auto sombreamento, limitação a certos nutrientes como fósforo, ferro e vitaminas, porém neste trabalho serão consideradas algumas destas variáveis, tais como concentração de carbono, salinidade e fotoperíodo mantendo a temperatura e intensidade luminosa constante com o intuito de encontrar o ponto ótimo de acordo com as variáveis de resposta.

2.3.1 Temperatura

A temperatura é um dos fatores que mais afetam a taxa metabólica dos organismos, por isso a temperatura do ambiente deve ser escolhida em função das necessidades das espécies presentes e da finalidade dos cultivos. (LOURENÇO, 2006). Efeitos da temperatura podem ser minimizados com aeração

em meio ao cultivo, aumentando assim a taxa de crescimento da microalga (PÉREZ *et al.*, 2008).

A temperatura ideal para as culturas de fitoplâncton é geralmente entre 20 e 24 °C, embora possa variar de acordo com a composição do meio de cultura, a espécie e a cepa cultivadas. É mais comumente cultivar espécies de microalgas que toleram temperaturas entre os 16 e 27 °C. Temperaturas abaixo de 16°C desaceleram o crescimento, enquanto os superiores a 35°C são letais para algumas espécies. Para controle de temperaturas as microalgas podem ser resfriadas por um fluxo de agua fria sobre o meio em que estão sendo cultivadas ou com unidades de refrigeração de ar condicionado (COUTTEAU, 1996).

Para algumas espécies de microalgas a elevação de temperatura pode diminuir a quantidade de ácidos graxos insaturados e aumentar o percentual de ácidos graxos saturados (RENAUD *et al*., 2004; THOMPSON *et al.,*1992), isto contribui para produção de biodiesel de melhor qualidade com maior número de cetano e maior estabilidade oxidativa.

É interessante que a temperatura seja constante nos cultivos de microalgas, para que proporcione melhor estabilidade, reprodutibilidade e previsibilidade nos experimentos. As salas climatizadas proporcionam o controle de temperatura com maior facilidade, porém para cultivos em escala comercial é mais difícil manter a temperatura constante (LOURENÇO, 2006).

Para cultivo de microalgas em alguns tipos de fotobiorreatores é interesssante o uso de trocadores de calor interno para controlar a temperatura da cultura (SIERRA, 2008).

2.3.2 Intensidade Luminosa

A intensidade luminosa está diretamente associada à fotossíntese. Na natureza a fotossíntese é composta por duas etapas denominadas reação de claro ou etapa fotoquímica e reações de escuro. A etapa fotoquímica caracteriza-se pela absorção da luz através da clorofila, síntese de adenosina tri-fosfato (ATP) e fotólise da água, enquanto que na etapa escura, não há necessidade direta de luz,

mas é necessário o que foi produzido na etapa fotoquímica, para que ocorra pela absorção de CO_2, a redução do dióxido de carbono e a síntese da glicose.

A fotossíntese pode ser definida como o processo pelo qual a energia luminosa possibilita a síntese de carboidratos a partir de CO_2 e H_2O, por meio da redução do dióxido, que utiliza a energia fornecida pelo ATP(adenosina tri-fosfato) e pelo NADPH (nicotinamida adenosina difosfato reduzida) que são gerados na transferência fotossintética de elétrons. Gás carbônico e água, ao receberem energia luminosa combinam-se para formar carboidratos e gerar oxigênio como subproduto. A fixação do carbono depende indiretamente da luz pois se houver NADPH e ATP a célula é capaz de sintetizar o açúcar. Esta reação é a base para o desenvolvimento autotrófico de organismos.

Presente nos organismos fotossintetizantes há uma organela conhecida como cloroplasto que possui o pigmento clorofila, responsável pela sua cor verde. É no cloroplasto que ocorre a fotossíntese, pois ele possui RNA, DNA e ribossomos, podendo assim sintetizar proteínas. Dentro dos cloroplastos há um sistema de membranas denominado tilacóides onde ocorrem as reações de luz da fotossíntese. A figura 6 mostra a organização dentro dos tilacóides dentro do cloroplasto bem como as reações de transdução de energia e as reações de fixação de carbono na presença de ATP e NADPH. Nos tilacóides há uma proteína responsável pela iniciação do processo de fotorecepção no tilacóide e é chamada de fotossistema II (PS II), que é uma proteína estruturalmente complexa, composta por diferentes subunidades protéicas, pigmentos e co-fatores de oxi-redução. O fóton, após se difundir até o tilacóide, é recebido na membrana tilacóide pelo fotossistema II e é transportado através de moléculas de clorofila, que funcionam como antenas de transmissão. Essa transmissão se dá sob a forma de energia de ressonância que se propaga pelas dezenas ou centenas de moléculas de clorofila presentes no tilacóide e se encerra quando a energia do fóton atinge um centro de reação de um fotossistema (PS II ou PS I) ou é refletida sob a forma de fluorescência, de volta ao ambiente externo à célula. Caso o fóton atinja o centro de reação do PS II, haverá a transformação da energia luminosa em energia química. Na verdade, a energia propagada sob a forma de

ressonância através das moléculas de clorofila, ao atingir o centro de reação do PSII, inicia a etapa das reações de luz da fotossíntese (MOTTA, 2005).

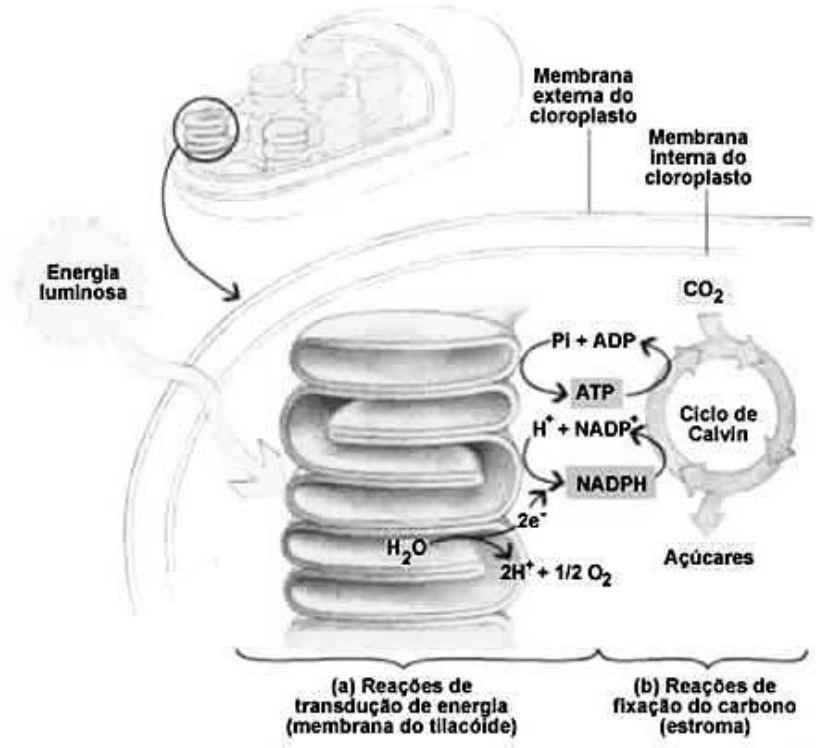

Figura 6 – Processo de fixação de CO_2 a partir de moléculas de ATP e NADPH ocorrendo no interior do cloroplasto. Fonte: http://www.passeiweb.com/na_ponta_lingua/sala_de_aula/biologia/biologia_vegetal/sintese_de_nutrientes/fotossintese.

A iluminação segundo Lourenço (2006), é um dos pilares do cultivo de microalgas que requerem especial atenção. Os melhores resultados com cultivos de microalgas são alcançados com iluminação artificial fluorescente. A lâmpada deve ser instalada na prateleira onde o está o frasco com a cultura a fim de fornecer mais energia do que apenas a luz difusa do ambiente. É a intensidade luminosa que irá desencadear os processos para que o processo da fotossíntese se complete.

A quantidade de luz recebida pelas células está relacionada ao carbono que será fixado pela microalga e influirá na taxa de crescimento das culturas de microalgas (DERNER *et al.*, 2006).

2.3.2.1 Fotoinibição

A fotoinibição é um fenômeno importante que afeta a estabilidade do aparelho fotossintético quando o excesso de excitação que chega ao centro de reação do PSII leva à sua inativação e ao seu dano, em decorrência da intensidade luminosa fora da faixa tolerável pela microalga (TAIZ e ZEIGER, 2006; BAKER e BOWYER, 1994). Se a intensidade de luz recebida é intensa o transporte de elétrons no fotossistema II (complexo responsável pela conversão de energia luminosa em química) é afetado. Nos mecanismos de fotoinibição a proteína D1 do centro de reação do fotossistema II (P680) sofre fotodano, onde a fotoinibição é uma consequência da limitação do transporte de elétrons no lado doador do PSII ou é devida a uma limitação no lado aceptor do PSII.

A fotoinibição é um conjunto complexo de processos moleculares, definidos como a inibição da fotossíntese por luz em excesso, esse excesso pode ser moderado ou intenso classificando a fotoinibição em dinâmica ou crônica, respectivamente. A fotoinibição dinâmica é causada pelo decréscimo da energia quântica, mas a taxa fotossintética máxima permanece inalterada, este decréscimo é frequentemente temporário e a eficiência quântica pode retornar ao seu valor inicial mais alto, quando o fluxo fotônico decresce abaixo dos níveis de saturação. A fotoinibição crônica resulta no dano do aparato fotossintético diminuindo a eficiência quântica e a taxa fotossintética máxima, está associada ao dano e a substituição da proteína D1 do centro de reação do PSII sendo necessária a sua remoção e substituição por uma molécula recém-sintetizada (TAIZ e ZEIGER, 2006).

Araújo e Deminicis (2009) ressaltam a importância da fotoinibição nos processos fotossintéticos, bem como os fatores climáticos que se envolvem neste processo. A fotoproteção da fotossíntese é um mecanismo eficiente de dissipação térmica e uma alternativa para a cadeia de transporte de elétrons, que em conjunto com alterações no complexo antena, ajudam a equilibrar a absorção da luz e sua utilização em ambientes naturais.

2.3.2.2 Fotoperíodo

Para que os cultivos realizados em escala laboratorial, tornem-se mais próximos das condições reais, é importante que a cultura seja mantida em fotoperíodo, fornecendo assim, luz e escuro no decorrer de um dia.

O fotoperíodo é uma variável que deve ser levada em conta nos experimentos com as microalgas a fim de reproduzir as condições a qual o fotobiorreator esta sujeito. No período de luz, que depende da altitude e das estações do ano, a intensidade luminosa é maior que o limiar de compensação fotossintética. Em cultivos realizados com fotoperíodo de 12 horas de luz para diversas espécies de microalgas houve menor crescimento do que em cultivos realizados em regime integral de luz (SOARES, 2010 e SANTOS, 2009), isto demonstra a forte influência dos fotoperíodos nos cultivos e aproxima os resultados à realidade.

Produção em fotobiorreatores (em escala comercial) é realizada em ambientes expostos a variações climáticas como temperatura, luz e fotoperíodo, por isso, sugere-se que a microalga seja testada no laboratório em diferentes condições climáticas, como o fotoperíodo, antes que seja inoculado no fotobiorreator.

2.3.3 Fonte orgânica de carbono

O cultivo com adição de fonte orgânica de carbono é conhecido como cultivo mixotrófico. Melaço, glicose, glicerol e uréia são fontes de carbono usadas nos cultivos de microalgas. O regime mixotrófico é amplamente definido como um regime de crescimento em que o carbono orgânico e CO_2, simultaneamente, são assimilados pelo metabolismo respiratório e fotossintético. A taxa específica de crescimento da cultura mixotróficas é, portanto, aproximadamente a soma da taxa de crescimento específico de células cultivadas em condições fotoautotrófica e heterotróficas (RICHMOND, 2004). Em cultivos densos, a assimilação do carbono inorgânico fica prejudicada devido à alta densidade celular, devido à baixa

disponibilidade de luz. Quando a microalga assimila mais carbono tem sua produção de carboidratos, proteínas e lipídeos aumentada (DERNER, 2006). Cerón Garcia *et al.* (2006), ao realizar cultivo mixotrófico com a microalga *Phaeodactylum tricornutum*, cultivadas com adição de glicerol e injeção de CO_2 suplementando a aeração alcançou elevadas taxas de biomassa seca. A fonte de carbono adicional a estes cultivos possibilita maior rendimento em biomassa, já que haverá maior disponibilidade de carbono além do produzido via metabolismo fotossintético. Andrade e Costa (2008) realizaram experimentos com enriquecimento do meio de cultivo com melaço em pó e melaço líquido aos cultivos da microalga *Spirulina plantensis,* os quais atingiram maiores concentrações de biomassa e produtividade que em cultivo autotrófico. Com adição desta fonte de carbono além de ser possível manter os cultivos por mais cinco dias a biomassa alcançada foi aproximadamente o dobro em relação ao cultivo autotrófico.

Em cultivos de grande escala é recomendada a injeção de CO_2 para contribuir ao processo de fotossíntese. A injeção de ar aos cultivos proporciona uma difusão efetiva dos nutrientes, um aporte parcial de CO_2 inorgânico, uma estabilidade do pH, a manutenção das algas em suspensão e o cultivo uniformemente distribuído (COLLA, 2002).

2.3.4 Aeração

Em cultivos densos e/ou em grandes volumes é necessário o emprego de aeração, que ocasiona um borbulhamento de ar dentro dos fracos de cultivo. A aeração é obtida por meio de compressores de ar instalados externamente ou no local de cultivo. A aeração lançada no fundo do frasco se dá através de mangueiras de silicone e/ou pipetas (materiais que podem ser autoclavados), que permite a subida do ar acarretando na dissolução de parte do conteúdo do gás no meio de cultura (LOURENCO, 2006). Este processo de mistura do meio de cultivo auxilia as células no melhor aproveitamento da luz, ocasiona uma distribuição homogênea de nutrientes e favorece a troca de gases e como consequência aumenta a produtividade microalgal (LEE *et al.*, 2006; LOURENÇO, 2006).

Constatou-se experimentalmente que a agitação sobre a cinética de crescimento promove um aumento na taxa de crescimento específico (SERENOTTI, 2004).

É sugerido o uso de CO_2 à temperatura correspondente a meio de cultivo na corrente gasosa de borbulhamento para se elevar a produtividade (ALONSO *et al.*, 1994; CERÓN GARCÍA *et al.*, 2000).

O aquecimento global é problema que tem se intensificado principalmente pela emissão de dióxido de carbono, sendo as usinas termelétricas responsáveis por cerca de 7% das emissões globais. As microalgas apresentam capacidade de assimilar CO_2 da atmosfera, por isso o crescimento de algumas espécies tem sido estudado quando expostas a diferentes concentrações de CO_2 mostrando assim, o seu grande poder de biofixação (MORAIS e COSTA, 2007).

Para um bom cultivo a aeração é um fator muito importante para a homogeneização dos nutrientes evitando, assim, a sedimentação das microalgas (COLLA *et al.*, 2002).

Contudo na produção de biocombustíveis a partir de microalgas essa dependência de CO_2 na produção de biomassa deve ser criteriosamente avaliada para evitar a utilização de CO_2 fóssil na produção de biodiesel e assim diminuir a capacidade mitigativa em relação ao efeito estufa.

2.3.5 Concentração de nutrientes e salinidade

Muitos meios de cultivos são empregados nos cultivos de microalgas. De acordo com a espécie de microalga e sua finalidade busca-se o meio apropriado para se empregar o cultivo. Os nutrientes presentes no meio de cultura podem estimular, ou inibir o crescimento de acordo com a quantidade de nutriente adicionada (SHEEHAN *et al.*, 1998; MEINERZ, 2007; PENTEADO, 2010). Para a microalga *Phaeodactylum tricornutum* observou-se que a limitação de nitrogênio aumentou o teor lipídico da biomassa (PENTEADO *et al.*, 2009).

Meinerz (2007) testou a a influencia da temperatura, salinidade e nutrientes dissolvidos (nitrogênio e fosfato) no cultivo das microalgas *Thalassiosira weissflogii*, *Skeletonema* sp e *Nannochloropsis oculata* e verificou que a microalga *N. oculata* apresentou maior crescimento e rendimento num menor tempo

apresentando-se mais indicada para cultivos em grande escala pois cresceu numa vasta gama de temperatura, salinidade e nutrientes.

Fitoplânctons marinhos (organismos aquáticos microscópicos com capacidade fotossintética) são extremamente tolerantes às alterações de salinidade. A maioria das espécies cresce melhor em uma salinidade que é ligeiramente inferior ao do seu habitat natural (35g/L), que é obtido pela diluição da água do mar com água de torneira. A salinidade de 20 - 24 g/L foi apontada como ideal (COUTTEAU, 1996).

2.4 MORFOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO DA MICROALGA *P. TRICORNUTUM*

A divisão Chrysophyta é caracterizada por organismos que possuem em seu cromatóforo os pigmentos fotossintetizantes: clorofila *a*, β-caroteno, fucoxantina e outras xantofilas. Os produtos fotossintéticos acumulados como reserva podem ser óleo, leucosina ou volutina; não havendo formação de amido. A membrana celular, mesmo em gêneros filamentosos pode ser formada por duas metades que se recobrem. Pectina é o mais importante componente da membrana, que pode ainda estar impregnada com sílica. Nesta divisão são reconhecidas três classes: *Heterokontae (Xantophyceae), Chrysophyceae e Bacillariophyceae*, as quais englobam cerca de 300 gêneros com aproximadamente 10000 espécies. São organismos predominantemente aquáticos, vivendo tanto no mar como em águas continentais (JOLY, 2005; LEWIN, 1958).

A espécie de microalga foco deste estudo pertence à classe *Bacillariophyceae*, sendo comumente conhecidas como diatomáceas. Nesta classe predominam organismos unicelulares de vida livre, como é o caso da espécie *Phaeodactylum tricornutum*. A membrana celular de pectina é fortemente impregnada com sílica. A célula contém de dois a muitos cromatófaros que lhe confere a cor marrom-dourada, por isso são também chamadas de algas douradas (JOLY, 2005).

A eventual destruição destes organismos, não altera a carapaça, que vem a constituir em material acumulado por sedimentação a formação de diatomito,

conhecido ainda por “terra de diatomáceas”. Este material depositado é amplamente aplicado nas indústrias como material abrasivo, refratário a calor, filtro especial para líquidos corrosivos e ainda como material de dispersão da nitroglicerina (dinamite). São conhecidos depósitos com algumas centenas de metros de espessura e vários quilômetros de extensão em várias partes do mundo (JOLY, 2005). A Figura 7 apresenta a micrografia eletrônica da diatomácea *P. tricornutum.*

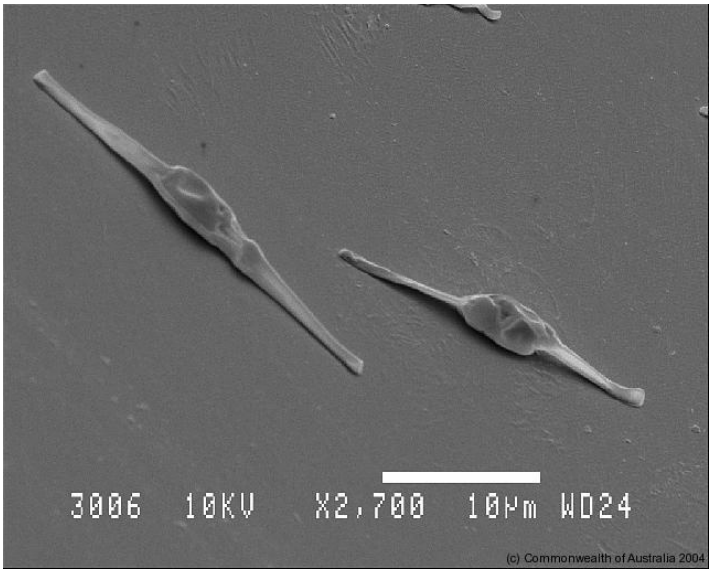

Figura 7 – Micrografia eletrônica da microalga *Phaeodactylum tricornutum.* FONTE: Disponível em: http://www.antarctica.gov.au/science/southern-ocean-ecosystems-environmental-change-and-conservation/southern-ocean-fisheries/krill/antarctic-marine-research-aquarium.

2.5 METABOLISMOS HETEROTRÓFICOS, AUTOTRÓFICOS E MIXOTRÓFICOS

Cultivos de microalgas podem ser autotróficos, onde a célula através do processo de fotossíntese realiza suas funções vitais, cultivos heterotróficos, onde são disponibilizados às células todos os nutrientes necessários para que desempenhem seus processos metabólicos sem a presença de luz e ainda cultivos mixotróficos, no qual atuam o metabolismo heterotrófico e autotrófico, e a microalga simultaneamente assimila o CO_2 autotroficamente e o carbono orgânico

a ela fornecido. De acordo com a literatura, algumas espécies de microalgas apontam rendimento muito maior quando cultivadas em regime mixotrófico. A fonte de carbono é um dos principais componentes na produção de biomassa microalgal (RADMANN *et al.*, 2009). O glicerol é uma fonte de carbono interessante em cultivos mixotróficos onde o foco é a produção de biodiesel devido a sua disponibilidade resultante do processo de transesterificação, no entanto variadas fontes de carbono têm sido utilizadas em cultivos mixotróficos, tais como glucose, melaço, acetato. Cultivos mixotróficos com variadas fontes de carbono têm sido estudados (CHOJNACKA e NOWORYTA, 2004; CERÓN GARCIA *et al.*, 2006; ANDRADE e COSTA, 2008; RADMANN, 2009).

A Figura 8 exemplifica de forma ilustrativa o significado do metabolismo mixotrófico como sendo a interação dos metabolismos heterotróficos e autotróficos, ou seja, enquanto o cultivo heterotrófico representado em cinza na figura é realizado pelo fornecimento de carbono realizado pela introdução de compostos orgânicos ao meio de cultura, em branco é representado o cultivo autotrófico onde a única fonte de carbono é o CO_2 inorgânico proveniente do ar. A intersecção dos dois metabolismos representa o metabolismo mixotrófico, onde o carbono é disponibilizado tanto por meio de compostos orgânicos quanto pelo ar atmosférico.

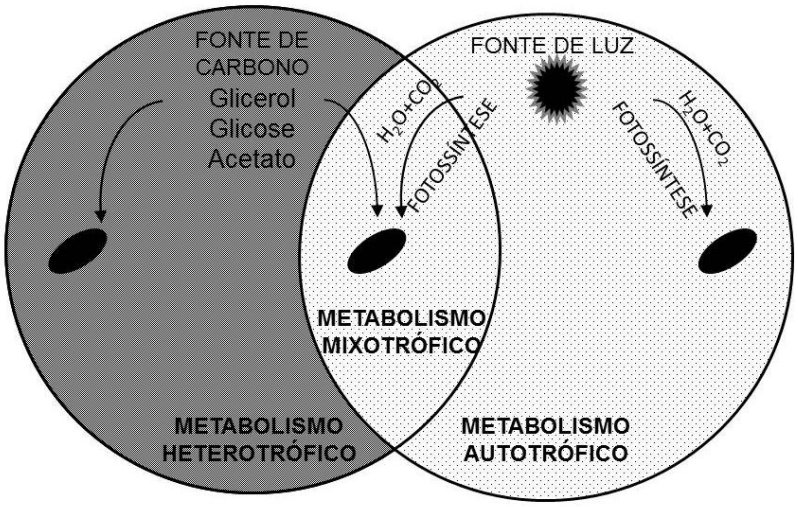

Figura 8 - Diferenças entre os metabolismos autotróficos, heterotróficos e mixotróficos. FONTE: Adaptado de MARIANO *et al.,* 2010.

O dióxido de carbono (CO_2) é a fonte de carbono preferencial das microalgas, pois se difunde passivamente do meio de cultivo ao meio intracelular, sendo utilizado diretamente nos processos de fixação de carbono (Derner, 2006). Portanto, a adição de CO_2 no meio de cultivo pode aumentar em até sete vezes a multiplicação celular enquanto que a redução da disponibilidade de carbono pode limitar o crescimento microalgal (ISHIDA e*t al,* 2000). Ao cultivar a microalga *Phaeodactylum tricornutum* em regime mixotróficos, com adição de glicerol e injeção de CO_2, Cerón García *et al.*(2006), obteve um aumento de 100% da biomassa quando comparado com cultivos autotrófico.

Como a injeção de dióxido de carbono em um sistema de cultivo em larga escala aumenta o custo do processo, este pode ser substituído em partes por outras fontes de carbono como sais carbonatos, bicarbonatos, entre outros.

2.5.1 O uso do glicerol em cultivos mixotróficos

A molécula de óleo provinda da microalga é formada por três moléculas de ácidos graxos ligadas a uma molécula de glicerina, o que faz dele um triglicerídeo. O processo para a transformação do óleo em biodiesel chama-se transesterificação, que é a separação da glicerina do óleo microalgal. A glicerina torna o óleo mais denso e viscoso. Durante o processo de transesterificação, a glicerina é removida do óleo, deixando o óleo mais fino e reduzindo a viscosidade.

O termo “glicerol” aplica-se somente ao componente químico puro 1,2,3-propanotriol. O termo “glicerina” aplica-se aos produtos comerciais purificados normalmente contendo menos de 95% de glicerol (MOTA *et al.,* 2009). O glicerol é muito valioso como agente lubrificante, devido à sua alta viscosidade e habilidade em permanecer fluido a baixas temperaturas, sem exigir qualquer modificação química. A sua viscosidade pode ser diminuída com adição de água. O glicerol ocorre em forma combinada em todas as gorduras e óleos vegetais e animais. È raramente encontrado em estado livre nestas gorduras, onde está frequentemente presente como triglicerídeos, em combinação ácidos graxos de ocorrência natural;

estes geralmente correspondem a misturas de glicerídeos que apresentam várias combinações de ácidos graxos (KNOTHE *et al.*, 2006).

Trabalhos com a microalga *Phaeodactylum tricornutum* tem sido publicados, apesar de não ser a microalga mais indicada, tem seu foco em produção de biodiesel. (CERÓN GARCIA *et al.* 2005; SOARES, 2010; PENTADO, 2010). O cultivo mixotrófico com adição de glicerol como fonte de carbono aponta um maior rendimento de produção de biomassa e óleo (CERÓN GARCIA *et al.* 2005; PENTEADO, 2010)

2.6 SIMULAÇÃO NUMÉRICA PARA ESTUDO DAS VARIÁVEIS DE RESPOSTA

A modelagem matemática pode ser definida como a descrição através do ferramental matemático de um evento, processo ou elemento do universo, seja ele ser vivo ou não. Com a modelagem permite fazer novas deduções, ou conclusões, a cerca de sua validade pela comparação de resultados obtidos da situação real com aqueles fornecidos pelo modelo a partir do estudo do objeto modelado. A concepção do modelo, em geral, é feita a partir de simplificações da situação original para buscar elementos matemáticos que possam descrever ou pelo menos se aproximar da realidade sobre a qual se deseja estudar. Nenhum modelo deve ser proposto de forma fechada ou definitiva, busca-se, através de melhorias ou adequações cada vez mais complexas aproximar cada vez mais o modelo e a realidade. Qualquer modelo matemático tem sua utilidade enquanto não é refutado ou até que seja substituído por um mais adequado ou mais realístico. Nem sempre, refutar um modelo é uma tarefa fácil, mesmo que ele esteja baseado em concepções errôneas. A percepção de contradições intrínsecas do modelo pode levar muito tempo e, às vezes, nem sempre é obtida (DINIZ, 2011).

Com os atuais recursos tecnológicos há muitas abordagens que podem ser levadas a cabo com vista à representação e compreensão da solução numérica de um problema. Geralmente, a representação numérica de uma solução de um problema é uma tabela de valores-solução, os quais podem ser exatos ou aproximados Nesse contexto o uso destas representações tem sido aplicado nas mais variadas áreas de conhecimento simultaneamente (RIBEIRO *et al*., 2010).

Uma solução numérica pode ser aplicada em processos biológicos, como por exemplo, no cultivo de microalgas em fotobiorreatores. Devido à grande importância de manutenção das condições do ambiente de cultivo, o desenvolvimento de trabalhos de simulação numérica envolvendo diversos parâmetros é de grande importância. Ribeiro *et al.* (2009) com uso da modelagem matemática e computacional demonstrou graficamente usando os parâmetros iluminação e temperatura o fator fotoinibição, fenômeno que provoca um decréscimo na produtividade devido a condições extremas destas variáveis, com base nos dados da literatura, para investigar a produtividade máxima nos cultivos da microalga *Phaeodactylum tricornutum* dentro de tubos de fotobiorreatores.

A modelagem matemática tem contribuído para estimar a velocidade de crescimento celular, a partir de parâmetros que podem influenciar na produtividade, tais como: temperatura, pH, intensidade luminosa e concentração de nutrientes adicionada ao cultivo. A modelagem relaciona a variável de resposta com as variáveis a serem investigadas sendo capaz de prever o quanto a resposta esperada se desvia da resposta observada (LACERDA, 2009). Atualmente os elevados custos de produção no cultivo de microalgas em fotobiorreatores tem sido uma barreira. A modelagem, ao predizer condições ótimas para o cultivo, consegue promover um aumento de produtividade dos cultivos e consequentemente diminuir o custo de produção de biomassa de microalgas.

Os efeitos da intensidade de luz e da concentração de dióxido de carbono sobre o crescimento de *Chlorococcum littorale* foram avaliados por Kurano e Miyachi (2005), quatro representações matemáticas foram comparados com a curva de taxa de crescimento em resposta da luz e a função hiperbólica deu o melhor ajuste para representar a relação fotossíntese-luz e um modelo de inibição de substrato com concentrações de CO_2 foi utilizado para simular a relação entre a taxa de crescimento específico em resposta ao CO_2.

A partir de dados da literatura foi construído neste trabalho um modelo matemático para compará-lo com os dados experimentais da taxa de crescimento levando em consideração os parâmetros iluminação, temperatura e adição de glicerol nos cultivos da microalga *Phaeodactylum tricornutum.*

3 DESAFIOS E OBJETIVOS

O cultivo de microalgas cultivadas em fotobiorreatores com foco na produção de biodiesel apesar de serem apontadas como promissoras apresentam desafios a serem vencidos tais como:

- Encontrar uma espécie de microalga que seja resistente ao sistema de cultivo e ao mesmo tempo rica em teor de óleos, permitindo assim, uma elevada produção de biodiesel;
- Otimizar o meio de cultura permitindo um melhor desenvolvimento da microalga com foco na produção de óleos;
- Realizar cultivos autotróficos, heterotróficos e mixotróficos a fim de compará-los;
- Testar diversas fontes de carbono nos cultivos mixotróficos;
- Testar o glicerol, já que no processo de produção de biodiesel através do processo de transesterificação este se torna um subproduto;
- Testar o glicerol bruto, onde não seria necessário a sua purificação para que o processo não fosse encarecido;
- Buscar uma adaptação da microalga marinha em baixas taxas de salinidade, quando a região de cultivo não for litorânea a fim de diminuir custos de transporte para o cultivo;
- Avaliar simultaneamente valores de biomassa seca e percentual lipídico;
- Analisar metodologias para verificar a viabilidade financeira de realizar o processo em grande escala;
- Investigar o efeito do fotoperíodo sobre as culturas de microalgas.

Baseados nestes desafios foram definidos os objetivos específicos e as estratégias necessárias para que fossem alcançados, os quais podem ser vistos na Figura 9.

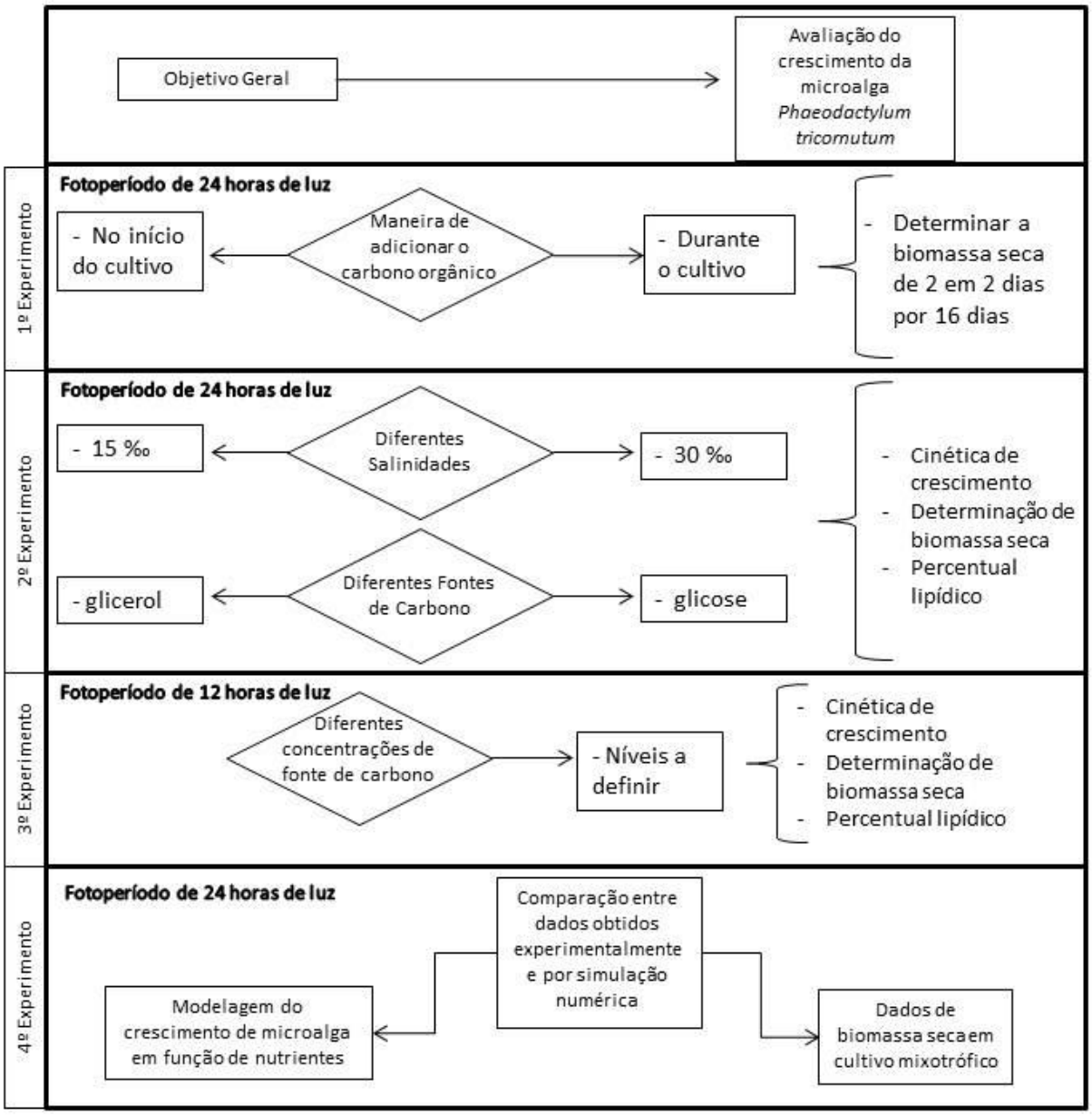

Figura 9 – Fluxograma geral das estratégias de trabalho

3.1 OBJETIVO GERAL

O principal objetivo deste estudo é determinar a maior taxa de produtividade da espécie de microalga da classe Bacillariophyceae: *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin 1897 em crescimento autotrófico e mixotrófico submetida à adição de glicerol e glicose, níveis de salinidade e fotoperíodo.

3.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a melhor maneira de adicionar fonte de carbono ao cultivo;
- Testar as fontes orgânicas glicerol e glicose em cultivos mixotróficos;
- Avaliar o comportamento da microalga sob diferentes níveis de salinidade;
- Realizar experimentos com a melhor fonte de carbono sob a influência de fotoperíodo de 12h;
- Comparar a produtividade de lipídeos com adição de glicerol em diversas concentrações;
- Determinar a curva de crescimento da microalga *Phaeodactylum tricornutum* submetida a diferentes variáveis;
- Determinar ponto de maior produtividade durante a curva de crescimento em cultivos realizados em batelada;
- Comparar resultados realizados experimentalmente e por meio da simulação numérica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MICROALGAS

A microalga *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin 1897, foi gentilmente cedida pelo Grupo Integrado de Aquicultura da UFPR para o NPDEAS, proveniente da Coleção de Microalgas Elisabeth Adair da Universidade Federal Fluminense (CMEA – UFF). A manutenção e repique da cepa foram realizados em sala de cultivo climatizada no laboratório do Grupo Integrado de Aquicultura (GIA).

4.2 MEIO DE CULTIVO

4.2.1 Preparação do inóculo

As cepas oriundas do tubo de aproximadamente 40 ml de volume ficam em torno de 7 a 10 dias no cepário até serem repassadas aos Erlenmeyers de 250 ml sem aeração. Depois de decorridos 7 dias da inoculação do volume total do tubo em 200 ml de meio, o meio foi repicado em Erlenmeyers de volume de 2 litros com 1,5 L de meio de cultura sob aeração constante. Após este procedimento as microalgas estão prontas para serem inoculadas nos Erlenmeyers de acordo com os planejamentos experimentais descritos na seção dos resultados e discussão. Este procedimento de repicagem pode ser observado na Figura 10.

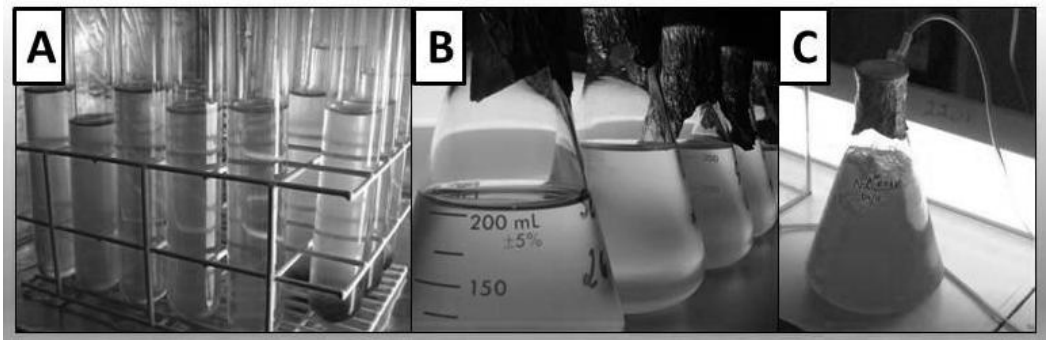

Figura 10 - Repicagem das cepas dos tubos de ensaio até Erlenmeyer de 2 litros de volume. A – Cepas em tubos de 40 ml; B – Microalgas em Erlenmeyer de 250 ml (sem aeração); C – Microalgas em Erlenmeyer de 2 L (com aeração).

4.2.1 Preparação do meio de cultura

A água do mar utilizada nos cultivos tem origem de Guaratuba, litoral do estado Paraná, sendo armazenada em tanques de 10.000L. Porém antes de sua utilização a água foi filtrada por meio de um conjunto de filtros de cartucho de celulose com porosidade de 50μm, 5μm, 1μm e 0,5μm respectivamente. Em seguida, uma solução de hipoclorito de sódio com 10% de cloro ativo foi adicionada na água na proporção 1/1000.

Para a determinação de salinidade foi usado um refratômetro (Instrutherm RTS-28) com precisão de 0,2%, no qual foi possível realizar experimentos com a microalga *Phaeodactylum tricornutum* em diferentes salinidades.

O meio de cultura preparado foi o meio Guillard F/2 Modificado, o qual se encontra descrito na Tabela 1.

Os Erlenmeyers com o meio de cultivo preparado foram esterilizados em autoclave a 125ºC, à pressão de 1,3kgf/cm^2 por 30 minutos. Em seguida foram resfriados e aclimatados em sala climatizada de 20±2ºC para que a fonte de carbono e o inóculo pudessem ser adicionados.

Os cultivos foram realizados em Erlenmeyers com capacidade de 2 litros num volume de 1,8 litros, mantidos em ambiente de temperatura de 18 a 20 ºC sob aeração constante com fluxo de ar atmosférico de 2,7 L/min em cada Erlenmeyer. A intensidade luminosa de 5500 lux de acordo com Lourenço (2006) foi mantida por lâmpadas fluorescentes de 40W em fotoperíodo integral e em fotoperíodo de 12h de luz e 12h de escuro. O meio de cultura F/2 Guillard modificado foi preparado em água do mar padronizada em 15 ‰ e 30 ‰.

Neste trabalho os cultivos foram realizados em Erlenmeyers de 2litros com 1,8litros de volume de meio, os quais após a inoculação foram vedados com papel alumínio e papel filme, com a finalidade de evitar a contaminação com o meio externo.

Tabela 1 – Composição do meio Guillard F/2 modificado.

Solução	Para cada 1litro de água destilada foi adicionado:
1,0 ml de solução de N e P (Nitrato e Fosfato)	75,0 g de Nitrato ($NaNO_2$); 5,0 g de Fosfato ($Na_2HPO_4.7H_2O$).
1,0 ml de solução de Trabalho de Metais	5,50 g de EDTA ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2.2H_2O$); 4,00 g de Cloreto de Ferro ($FeCl_3.6H_2O$); 0,18 g de Cloreto de Manganês ($MnCl_2.4H_2O$); 10,0 ml de solução Estoque de Metais; *Para o preparo da solução estoque de metais adicionou-se em 1L de água:* 1,0 g de $CuSO_45H_2O$; 2,2 g de $ZnSO_47H_2O$; 1,0 g de $CoCl_26H_2O$; 0,6 g de $Na_2MoO_42H_2O$.
1,0 ml de solução de Vitaminas	2,0 mL de solução estoque de vitaminas; *Para o preparo da solução estoque de vitaminas adicionou-se em 1L de água:* 0,5 g de Biotina (Vitamina H); 50,0 g de Tiamina (Vitamina B1); 0,5 g de Cianocobalamina (Vitamina B12).
0,75 ml de Solução de Silicato	30,0 g de Silicato de Sódio Alcalino;
5,0 ml de Solução de TRIS	90,0 g de TRIS (Tris Hidróximetil Amino Metano); 60,0 ml de Ácido Clorídrico.

FONTE: Adaptado de SOARES, 2010; COUTTEAU, 1996

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO

Em todos os experimentos realizados neste trabalho, foi realizada uma caracterização da cinética de crescimento. Após a preparação do meio de cultivo o inóculo foi padronizado em $30x10^4$ cél.ml^{-1} em todos os experimentos. Esta concentração foi escolhida de acordo com o trabalho de Soares (2010), a qual verificou que esta concentração é a mais apropriada para cultivos realizados em batelada com a microalga *Phaeodactylum tricornutum*.

Para a determinação da densidade celular diária, uma alíquota de 1 ml foi retirada diariamente para que a pudesse ser feita uma contagem em câmara de Neubauer (*Improved Chamber*) em microscópio em aumento de 400x, conforme protocolo de Vega e Voltolina (2007).

4.3.1 Equação logística

A equação logística (Equação 1) foi ajustada aos dados do experimento por regressão não linear, com auxilio do programa TK Solver 5.0, afim de que esta descrevesse melhor o perfil de crescimento celular.

Equação Logística na Forma Diferencial

$$\frac{dN}{dt} = \mu.N.\left(1 - \frac{N_0}{N_{\max}}\right) \quad (1)$$

onde:

N = densidade celular (células. ml^{-1})

N_0 = densidade celular inicial (células. ml^{-1})

μ = velocidade específica de crescimento (dia $^{-1}$)

t = tempo de cultivo (dias)

A solução analítica da equação 1 resultou na equação 2 para calcular a densidade celular da microalga.

Equação Logística na Forma Algébrica

$$N = \frac{N_{\max}}{\left[1 + \left(\frac{N_{\max}}{N_0 - 1}\right).e^{(-\mu.t)}\right]} \quad (2)$$

onde:

N = densidade celular (células. ml^{-1})

N_0 = densidade celular inicial (células. ml^{-1})

N_{max} = densidade celular máxima (células. ml^{-1})

μ = velocidade específica de crescimento (dia $^{-1}$)

t = tempo de cultivo (dias)

4.9 RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA

A biomassa obtida em escala laboratorial é obtida pelo processo de centrifugação e liofilização, porém o processo de liofilização tem um custo elevado para obter biomassa em escala comercial. Para escala industrial são investigadas outras maneiras de se obter biomassa e óleo de tal maneira que não haja perdas em qualidade e quantidade. Neste trabalho, para a obtenção de biomassa foram utilizados os seguintes processos: floculação, centrifugação e liofilização. Tais procedimentos estão descritos abaixo.

4.9.1 Floculação

A floculação é um processo que usa uma substância a fim de que as partículas em suspensão se tornem pequenos flocos que em seguida sofrem decantação. Foram adicionados inicialmente 0,5 ml de solução de NaOH (hidróxido de sódio) na concentração 0,1M para cada 100 ml de meio de cultura, seguida de homogeneização para que os flocos pudessem ser formados. Ao não se constatar a floculação, devido à diferença de concentração entre as amostras, pequenas alíquotas de 0,1 ml foram adicionados às amostras que não floculavam. Em seguida, foram mantidas em ambiente fresco e em repouso para decantação das células. Após a decantação o sobrenadante foi retirado e transferido ao tubo de ensaio para que as células pudessem ser centrifugadas. O processo de floculação reduz o volume total do meio em aproximadamente 10% do volume.

A Figura 11 apresenta seis becker com a mesma amostra de cultura de microalga nos quais foram adicionados em cada um, diferentes quantidades de hidróxido de sódio na contração de 0,1 M ao mesmo tempo a fim de verificar a melhor quantidade para se obter a máxima concentração de células. A quantidade adicionada do Becker 1 ao 6 foram respectivamente 0 mL; 0,2 mL; 0,3 mL; 0,5 mL;

1,0 mL e 1,5 mL. Percebeu-se que o becker de número 4 foi o que apresentou melhor processo de floculação onde a microalga sedimentou no fundo do frasco. Neste foi adicionado 0,5 ml de solução de NaOH na concentração 0,1M em 100 ml de meio de cultura.

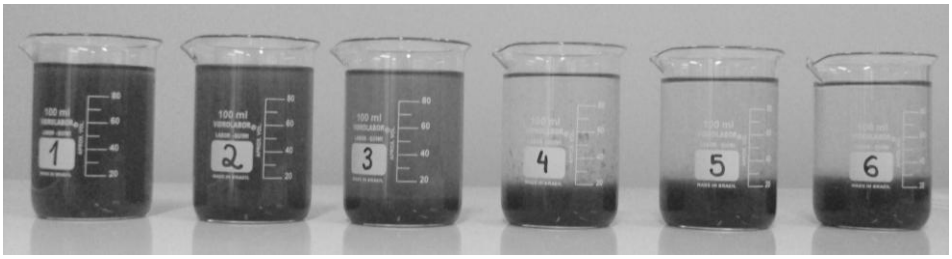

Figura 11 – Floculação com adição de diferentes quantidades de hidróxido de sódio.

4.9.2 Centrifugação e Liofilização

O processo de centrifugação foi realizado após a floculação do meio de cultura. Os tubos contendo a amostra foram centrifugadas por 20 minutos na centrífuga (BioEng / BE-6000) a 5000 rpm. Para cada amostra o sobrenadante foi descartado e a biomassa úmida foi congelada para posterior liofilização. Todas as amostras congeladas foram transferidas ao liofilizador (Edwards – Modulyo) na pressão de 10^{-1} mbar e temperatura do condensador de -40ºC para que a amostra seja sublimada retirando assim, a umidade da biomassa.

4.10 DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA SECA

A determinação de biomassa seca foi realizada de acordo com o objetivo do experimento, para tanto no dia escolhido para determinação da biomassa seca, foi coletado 150 ml do meio em frascos com tampa devidamente lacrados para que a biomassa seca pudesse ser quantificada em triplicata. Para isso, após agitamento do frasco foi filtrado 50 ml do meio de cultivo em papel filtro quantitativo com auxílio de bomba à vácuo, como pode ser vista na Figura 12A. Os papéis filtros foram mantidos em estufa a 60ºC até que o peso se mantivesse constante. A biomassa seca foi estimada através da diferença da massa do papel antes e depois da filtragem, os papéis quantitativos com a biomassa são apresentados na

Figura 12B. Para aferir a massa dos papéis foi utilizada uma balança analítica com precisão de 0,1 mg. Porém para a determinação da umidade do ar, foi colocado o papel filtro com massa previamente aferida na estufa juntamente com os papéis com a biomassa seca, desta maneira, a umidade foi determinada de acordo com a equação 3.

$$U = P - P_0 \quad (3)$$

onde:

U = umidade (g);

P_0 = massa do papel filtro antes de ser seco em estufa (g);

P = massa do papel filtro depois de ser seco em estufa (g).

Após atingirem o peso constante (aproximadamente 24h), os papéis foram cuidadosamente retirados da estufa e colocados no dessecador, que tem o intuito de retirar o ar para que as amostras não sofram influência da umidade. Ao retirar as amostras do dessecador, a massa dos papéis filtros com a biomassa foram aferidas e a determinação da biomassa seca em g/L foram determinadas de acordo com a equação 4.

$$B_f = \frac{\left(P_t - P_u + U\right)*1000}{50} \quad (4)$$

onde:

B_f = Biomassa Seca (g/L);

P_t = Massa do papel filtro com biomassa seca (g);

P_u = Massa do papel filtro úmido (g);

U = umidade do ambiente (g).

50 = quantidade de amostra filtrada em mL

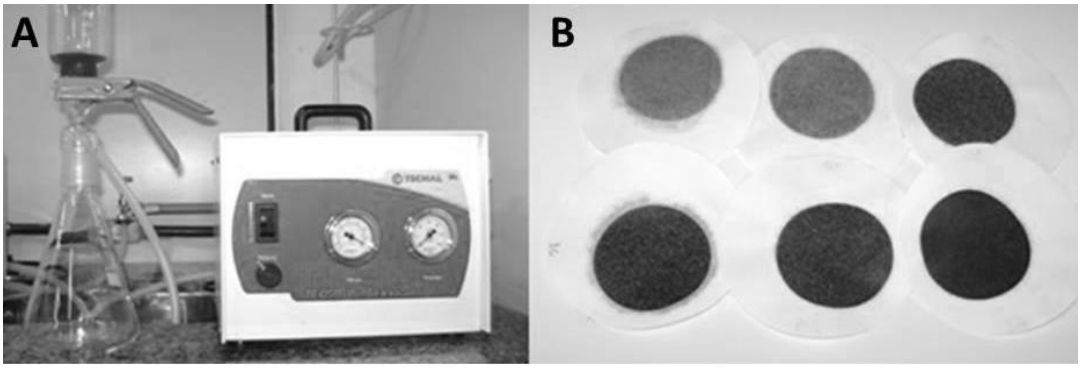

Figura 12 – Determinação da biomassa seca de microalgas: (a) aparato experimental; (b) aspecto das amostras.

4.11 DETERMINAÇÃO DE LIPÍDEOS TOTAIS

Para a determinação de lipídeos totais foi utilizada a amostra após ter sido liofilizada. A metodologia Bligh & Dyer (1959) adaptada de Lourenço (2006) foi adotada neste trabalho devido ao trabalho de Soares (2010) apontar esta metodologia como a mais apropriada para a espécie de microalga *Phaeodactylum tricornutum*.

Para tal metodologia foi utilizada 50 mg de amostra de microalga liofilizada em um tubo de ensaio (tubo1) onde adicionou-se 3 ml de uma mistura de clorofórmio:metanol (2:1, v:v) e 10µL de uma solução de butil-hidroxitolueno – BHT (1% em metanol) e o tubo foi agitado. Esta mistura foi submetida à ultrassom em um sonicador (USC 700 de frequência 55Hz) por 3 ciclos de 15 min a fim de facilitar a extração de lipídeos devido ao rompimento celular. Após isto o tubos foram incubados por 24h sob refrigeração, protegidos da luz dentro de um becker envolto por papel alumínio evitando assim, a fotooxidação das amostras. Decorridos 24h, os tubos contendo as amostras foram novamente submetidos ao ultrassom durante 3 ciclos de 15 minutos e centrifugadas a 4000 rpm (Centrífuga HITACHI, modelo himac CR-21E) por 10 min a 4ºC; o sobrenadante com a fase lipídica foi recuperada com uma pipeta Pasteur e reservado em outro tubo (Tubo 2). No tubo com a biomassa residual, foi adicionado 1,5 ml da mistura de $CHCl_3/CH_3OH$ e centrifugou-se novamente a 4000 rpm por 10 min a 4 °C, e o sobrenadante foi recuperado com uma pipeta Pasteur e transferido ao tubo

reservado com a fase lipídica (Tubo 2). Foram adicionados 2 ml de água destilada e 1 ml de clorofórmio ao Tubo 2, as amostras foram então centrifugadas a 4000 rpm por 10 min a 4 °C. Em seguida, a fase inferior (clorofórmio:lipídeo) foi recuperada, com uma pipeta Pasteur, e transferida para um vial de vidro pré-pesado. A fase aquosa foi lavada com 1 ml de clorofórmio e centrifugada novamente a 4000 rpm por 10 min a 4 °C. Então, a fase inferior foi recuperada e transferida para o frasco (F1) de vidro. O frasco de vidro foi levado a uma câmara de exaustão de gases, onde o clorofórmio da fase clorofórmio:lipídeo foi evaporado. Então, o frasco com a fração lipídica foi pesado e a quantidade de lipídeos totais foi determinada em% (L_t) de biomassa seca e em miligramas de lipídeo por litro de cultura microalgal(L) de acordo com as equações 5 e 6 respectivamente:

$$\%L_t = \frac{(T_2 - T_1) * 100\%}{B} \quad (5)$$

onde:

B = biomassa seca pesada em gramas

T_1 = massa do vial (tubo) vazio e seco

T_2 = massa do vial (tubo) com o óleo extraído

$$L = \frac{(T_2 - T_1) * C}{B} * 1000 \quad (6)$$

onde:

B = biomassa seca pesada em gramas

T_1 = massa do vial (tubo) vazio e seco

T_2 = massa do vial (tubo) com o óleo extraído

C = biomassa seca em gramas por litro

4.12 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DAS AMOSTRA

Aos valores obtidos a partir da contagem celular diária em câmara de Neubauer foram aplicadas as barras que representam o erro de no máximo 10% em cada ponto. Os pontos com erros maiores de que 10% em relação a curva obtida pelo ajuste logístico foram desprezados.

Os valores de biomassa seca e lipídeos apresentados neste trabalho são médias dos resultados de três amostras seguida do erro padrão das mesmas. A equação 7 foi utilizada para determinação do erro padrão.

$$s = \frac{\sqrt{\sum (x_i - x')^2}}{(n-1)} \qquad (7)$$

onde:

s = erro padrão das amostras;

x_i= valor de cada resultado;

x’ = média aritmética dos valores x_i;

n = número de amostras.

Foi aplicado o teste t, com auxílio das ferramentas de análise do Excel para comparar se as amostras apresentavam diferenças significativas, com nível de significância de 5%, onde:

p > 0,05 = não houve diferenças significativas entre a média das amostras;

p > 0,05 = houve diferenças significativas entre a média das amostras.

5 Resultados e Discussão

Os resultados obtidos serão apresentados em quatro seções. A primeira investiga, devido à falta de publicações que visassem à maneira adequada de adicionar fonte de carbono ao cultivo, qual a melhor maneira para adicionar o glicerol, avaliando o cultivo com a inserção do glicerol durante todos os dias de cultivo e, em outros, no início do cultivo. A determinação da biomassa seca obtida de dois em dois dias foi comparada com um experimento controle (autotrófico). Após escolhida a melhor maneira de fornecer fonte de carbono, na próxima seção, verificou-se a curva de crescimento, biomassa seca e lipídeos em experimentos com fontes variáveis de carbono e salinidade, investigando qual delas seriam melhor assimiladas pela microalga *Phaeodactylum tricornutum*. Na terceira seção, discute-se a necessidade de realizar experimentos com fotoperíodo, sendo assim, foram avaliadas as melhores concentrações da fonte de carbono e de sal escolhidas a partir do experimento anterior, para identificar qual seria a concentração mais produtiva. Por fim, na ultima seção, a fim de demonstrar os dados experimentais num modelo matemático obtido da literatura, é apresentado uma comparação dos cultivos mixotróficos e autotróficos com a modelagem computacional.

5.1 VERIFICAÇÃO DA MELHOR MANEIRA DE ADIÇÃO DE FONTE DE CARBONO

Em decorrência da falta de publicações que visassem à maneira adequada de inserir a fonte de carbono nos cultivos mixotróficos, houve motivação para verificar se este se tratava de um parâmetro de influencia. Para tanto se determinou o acréscimo de biomassa no decorrer dos dias de cultivo realizando duas maneiras de adicionar o carbono: no início do cultivo e durante o cultivo, neste último a concentração total foi dividida pelo total de dias do cultivo. Cerón Garcia *et al.* (2006) ao realizar experimentos com diferentes níveis de glicerol verificou que a melhor produção de biomassa ocorreu com a adição da maior

concentração testada: 0,1M de glicerol. Por isso, neste trabalho optou-se por testar um valor mais elevado de concentração de glicerol: 0,15M.

O inóculo de todos os experimentos deste trabalho foi padronizado a $30x10^4$ cél/ ml, de acordo com Soares (2010), representando aproximadamente 100mg/L de biomassa seca, assemelhando-se assim, ao trabalho de Cerón García *et al.* (2000) onde utilizou a concentração de biomassa para inoculação entre 70-100 mg/L. em experimentos com a espécie de microalga *P. tricornutum.*

No experimento 1 não houve adição de glicerol, a fim de manter um experimento controle (autotrófico), no experimento 2 o glicerol foi adicionado diariamente e no experimento 3, o glicerol foi adicionado no início do cultivo. Os valores médios de concentração a cada dois dias são apresentados na Tabela 2. A concentração máxima de biomassa obtida no cultivo mixotrófico foi de 1,294g/L no experimento onde o glicerol foi adicionado no início do cultivo. Enquanto isso, no cultivo autotrófico a biomassa seca máxima obtida foi de 0,88 g/L. O cultivo mixotrófico com adição diária de glicerol foi 23,1% maior que o cultivo autotrófico, já o experimento com adição de glicerol no início do cultivo apresentou biomassa 31,6% maior que o controle.

Tabela 2 – Biomassa seca em gramas por litro em experimentos autotróficos e mixotróficos com diferentes maneiras de adição de glicerol

Tempo (h)	1 - Controle	2 - Diariamente	3 - Início
0	0,100 ± 0,02	0,100 ± 0,02	0,100 ± 0,02
48	0,114 ± 0,03	0,178 ± 0,03	0,201 ± 0,03
96	0,204 ± 0,04	0,227 ± 0,01	0,272 ± 0,02
144	0,274 ± 0,04	0,377 ± 0,02	0,386 ± 0,03
192	0,387 ± 0,02	0,477 ± 0,02	0,511 ± 0,02
240	0,593 ± 0,05	0,656 ± 0,02	0,804 ± 0,02
288	0,636 ± 0,02	0,731 ± 0,02	0,848 ± 0,03
336	0,746 ± 0,02	0,893 ± 0,02	1,013 ± 0,02
384	0,885 ± 0,02	1,151 ± 0,02	1,294 ± 0,03

A evolução da biomassa seca no decorrer de 384h de cultivo apresentada mostra que nos cultivos onde esta fonte foi adicionada no início, apresentou diferença de 12% em acréscimo ao cultivo onde o glicerol foi adicionado diariamente.

Devido à grande quantidade de meio de cultivo utilizada para realização do experimento em triplicata, de acordo com a metodologia adotada que utiliza grande volume do meio de cultivo, não foi possível realizar a análise diariamente, ou mesmo perdurar o experimento por mais alguns dias, para isto, sugere-se outra metodologia, tal como centrifugação seguida de liofilização para que seja possível verificar a curva de crescimento na fase estacionária até a de declínio. O fato que pode acarretar diminuição do crescimento da biomassa é a depleção de nutrientes num cultivo em batelada, onde não há reposição de nutrientes.

Estes resultados são importantes para os experimentos seguintes, pois como todos os experimentos realizados neste trabalho ocorreram com adição de carbono foi possível verificar que a adição no início do cultivo é melhor do que a adição diária.

5.2 CULTIVOS EM DIFERENTES SALINIDADES E COM FONTES DE CARBONO DIVERSIFICADAS

A microalga *Phaeodactylum tricornutum* é de ambiente marinho e, portanto, é adaptada a salinidade de 30 ‰. Isto é uma desvantagem por duas razões. Primeiro, o custo de transporte de água de mar do litoral para Curitiba é alta. Segundo, a alta salinidade pode causar corrosão nas partes metálicas da estrutura e ainda afetar a transparência dos tubos, devido ao incrustamento nas paredes internas o que dificulta a passagem de luz através das paredes dos tubos. Portanto, foi feito um experimento para ver ser era factível cultivar a microalga em salinidade de 15 ‰

Foi feito um experimento para testar dois fatores - a salinidade e a fonte de carbono - procurou-se adaptar a microalga às condições de salinidade de 15 ‰ e 30 ‰. Foram também avaliadas duas fontes de carbono para investigar quais

delas seriam melhores assimiladas pela espécie *Phaeodactylum tricornutum.* Foi escolhido o glicerol como fonte de carbono por ser uma substância que resulta do processo de transesterificação na produção de biodiesel. A concentração de glicerol usada foi de 0,1M, a mesma usada por Camacho *et al.* (2005), em cultivos com a mesma espécie.

O glicerol é um composto orgânico pertencente à função álcool que apresenta 3 carbonos na sua cadeia principal (ARRUDA *et al*., 2007) como pode ser observado na Figura 13A .Porém, além do glicerol, o carboidrato glicose, também conhecida como glucose ou dextrose foi testada neste trabalho. A glicose apresenta 6 carbonos em sua cadeia principal como pode ser observado na 13B, por isso a fim de compará-la com o glicerol foi utilizada a metade da concentração molar.

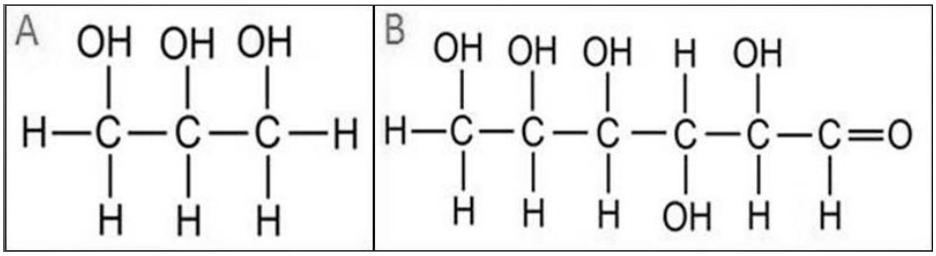

Figura 13 – Representação da forma estrutural das fontes de carbono usadas. (A): glicerol (3 moléculas carbonos na cadeia principal) ; (B): glicose (6 moléculas de carbono na cadeia principal).

O planejamento dos cultivos realizados, bem como os tratamentos e as varáveis investigadas podem ser vistos na Tabela 3.

Tabela 3 – Planejamento Experimental das variáveis salinidade e fonte de carbono

Experimento	Salinidade	Fonte de carbono	Concentração
1	15 ‰	Ausente	0M
2	15 ‰	Glicerol	0,1M
3	15 ‰	Glicose	0,05M
4	30 ‰	Ausente	0M
5	30 ‰	Glicerol	0,1M
6	30 ‰	Glicose	0,05M

A avaliação deste cultivo foi subdividida nas seguintes etapas: caracterização da cinética de crescimento, determinação de biomassa e determinação de lipídeos.

5.2.1 Caracterização da cinética de crescimento

A curva foi ajustada de acordo com a equação logística aos perfis de crescimento, conforme descrito na (seção 4.3.1)

Na Tabela 4 é apresentada a análise cinética das curvas de crescimentos de acordo com o ajuste realizado pela equação logística.

Tabela 4 – Análise cinética da curva de crescimento da microalga *P. tricornutum* em cultivos com diferentes fontes de carbono de acordo com a equação logística.

Experimento	N_0 ($x10^4$ células. ml^{-1})	$N_{máx}$ ($x10^4$ células. ml^{-1})	$\mu_{máx}$ (dia^{-1})	Tempo (dia)
1	30	1595	0,840	0 – 18
2	29	1772	1,080	0 – 18
3	31	1840	1,152	0 – 18
4	18	1785	1,128	0 – 18
5	20	1977	1,008	0 – 18
6	16	2017	1,320	0 – 18

Na Figura 14 são apresentados gráficos (a – f) com o ajuste logístico de cada experimento realizado e as curvas foram construídas em mesmas escalas. Os pontos indicam os valores médios obtidos e a linha contínua descreve a curva ajustada, segundo regressão do modelo logístico.

Valores próximos ao deste trabalho foram obtidos por Ohse *et al.* (2008) que cultivou a microalga *P. tricornutum* por sete dias em regime autotrófico no meio Guillard com fotoperíodo integral de luz atingiu 1 $482,5.10^4$ células por ml enquanto neste trabalho obteve-se 1 451.10^4 células por ml no sétimo dia de cultivo. O ajuste logístico também foi adotado para avaliação dos pontos experimentais.

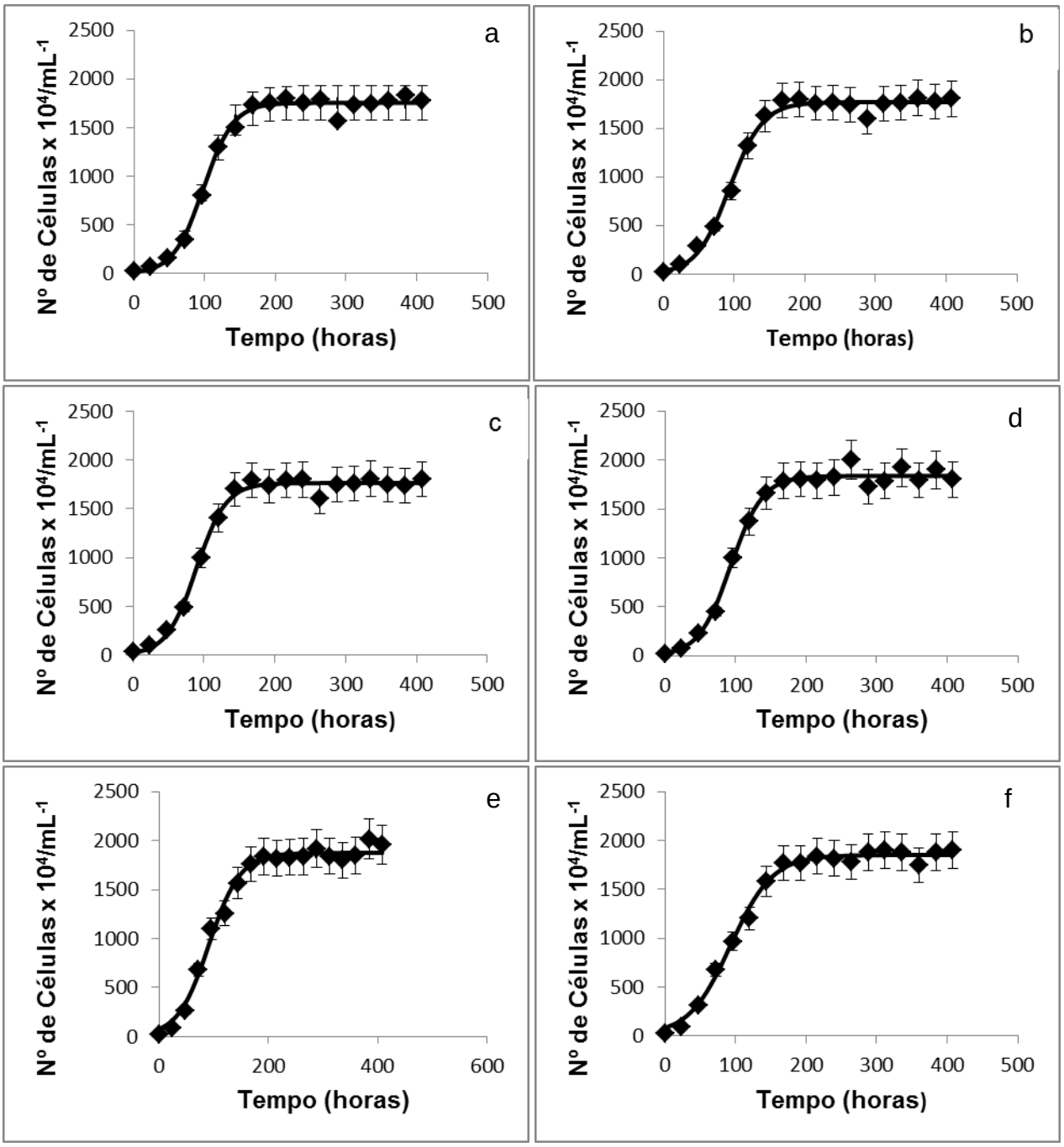

Figura 14 – Curva de crescimento dos experimentos 1 ao 6, (♦) dados experimentais e (—) ajuste pela equação logística. a) Experimento 1: Cultivo autotrófico – sal. 15 ‰; b) Experimento 2: Cultivo mixotrófico – sal. 15 ‰ e glicerol; c) Experimento 3: Cultivo mixotrófico - sal. 15 ‰ e glicose; d) Experimento 4:Cultivo autotrófico – sal. 30 ‰; e) Experimento 5: Cultivo mixotrófico - sal. 30 ‰ e glicerol; f) Experimento 6: Cultivo mixotrófico - sal. 30 ‰ e glicose.

5.2.2 Recuperação de biomassa e extração de lipídeos totais.

5.2.2.1 Determinação de biomassa seca

A biomassa seca para os dos 12 tratamentos foram determinada. Uma média foi realizada em relação à determinação de biomassa em triplicata. A determinação de biomassa foi feita no 10º, 12º, 14º, 16º e 18º dia.

Tabela 5 – Biomassa Seca entre o 10º e 18º dia em gramas por litro de meio de cultivo.

Trat.	10º dia	12º dia	14º dia	16º dia	18º dia
1 (g/L)	0,43 ± 0,01	0,52 ± 0,05	0,68 ± 0,02	0,70 ± 0,03	0,74 ± 0,02
2 (g/L)	0,66 ± 0,02	0,75 ± 0,03	0,99 ± 0,02	1,12 ± 0,01	**1,26** ± 0,03
3 (g/L)	0,51 ± 0,04	0,66 ± 0,05	0,85 ± 0,04	0,86 ± 0,06	0,82 ± 0,02
4 (g/L)	0,36 ± 0,03	0,39 ± 0,02	0,65 ± 0,04	0,70 ± 0,04	0,89 ± 0,01
5 (g/L)	0,62 ± 0,06	0,63 ± 0,01	0,83 ± 0,05	0,94 ± 0,04	**1,11** ± 0,01
6 (g/L)	0,52 ± 0,02	0,53 ± 0,01	0,74 ± 0,02	0,77 ± 0,04	0,88 ± 0,02

* Os resultados apresentados são referentes à média de três análises seguida do erro padrão.

Os valores destacados na Tabela 5 correspondem aos melhores resultados de biomassa em g/L sendo os experimentos com concentração de glicerol na concentração 0,1M em salinidade 15 ‰ e glicose na concentração 0,05M em salinidade 30 ‰ . Apesar de os melhores resultados em relação ao número de células serem os tratamentos 3 e 6, a biomassa seca apresentou melhores resultados para os tratamentos 2 e 5, mostrando que não há uma relação direta entre número celular e biomassa seca. Este resultado comprova que o aumento da biomassa seca nos experimentos 2 e 5 nesse período foi devido ao acúmulo lipídico na célula.

Ao analisar os dois melhores valores obtidos de biomassa seca foi possível perceber que o glicerol e a glicose em concentrações proporcionais apresentaram resultados também muito próximos, o que indica que as duas fontes de carbono

são igualmente eficientes. Foram obtidos melhores resultados em salinidade 15 ‰ do que em salinidade 30 ‰, o que contribui para esta pesquisa, já que o intuito era o de proporcionar uma adaptação da microalga *Phaeodactylum tricornutum* em níveis mais baixos de salinidade.

O tratamento 2 foi o que apresentou melhor resultado no último dia de análise, duplicando a biomassa em relação ao primeiro dia de análise, chegando a aproximadamente 1,3g/L de biomassa seca no 18º dia, mostrando que após atingir o estado estacionário a microalga passa a consumir os nutrientes do meio de cultivo acarretando num aumento da biomassa.

5.2.2.2 Teor lipídico

No decorrer dos dias de cultivo entre o 10º e 18º dias de cultivo houve um aumento significativo no teor lipídico em todos os tratamentos. Assim como para a biomassa seca, o teor de lipídeos também foi melhor em salinidade 15 ‰ do que em 30 ‰, porém a diferença entre o tratamento que foi usado glicose e o tratamento que foi usado o glicerol não foi significativa, pois ambas apresentaram um percentual de aproximadamente 27% em salinidade de 15 ‰, mas apresentaram um valor significativo do 10º ao 18º dia passando de 10% para 27% aproximadamente. Os tratamentos realizados com o uso das fontes de carbono (glicose e glicerol) tanto para salinidade 15 ‰ quanto para 30 ‰ acarretou num maior percentual lipídico em relação ao tratamento controle como pode ser visto na Figura 15. O maior percentual lipídico para esta microalga foi encontrada no experimento 3, no qual foi usado glicose na concentração de 0,05M, em salinidade 15 ‰ no 18º dia de cultivo.

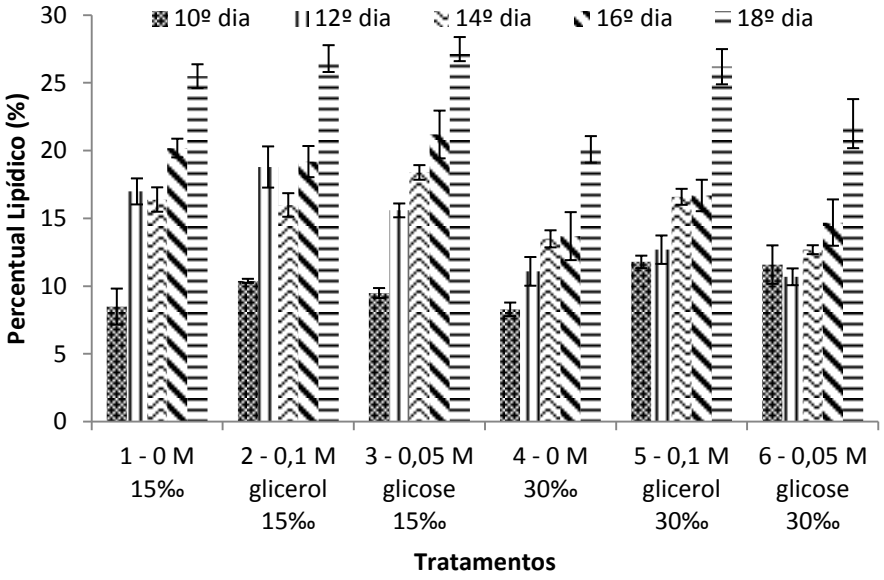

Figura 15 – Aumento percentual lipídico por grama de biomassa seca entre 10º e 18º dias.

A determinação da quantidade de lipídeos em miligrama por litro de meio de cultura para todos os experimentos é mostrado na Figura 16.

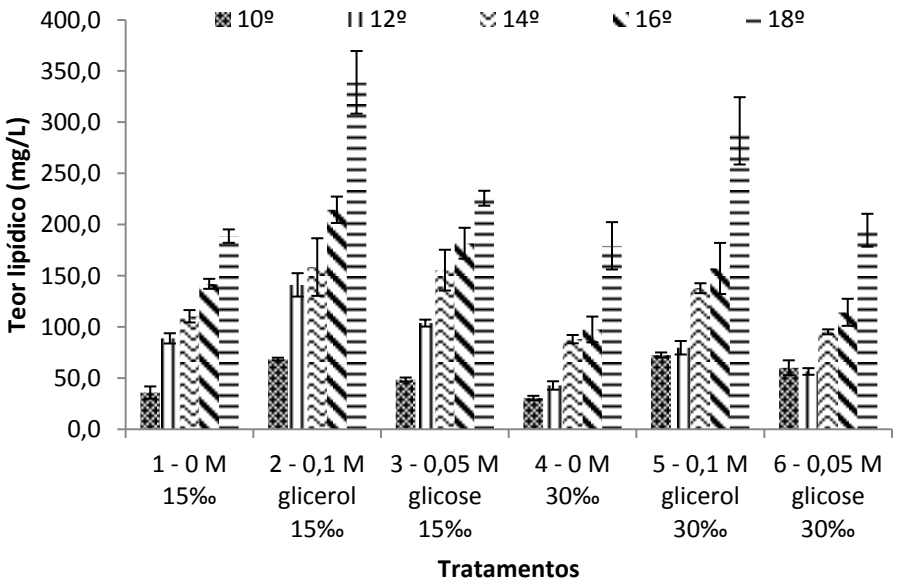

Figura 16 – Aumento do teor lipídico em miligramas por litro de meio de cultura cultivado entre 10º e 18º dias de cultivo.

Apesar de o tratamento com adição de glicose apresentar percentual de lipídeos mais elevado que o tratamento com adição de glicerol, na Figura 16 é possível verificar que a quantidade de lipídeo em mg/L em cultivos com o uso de glicerol como fonte de carbono é muito maior. Enquanto o experimento 1(autotrófico) resultou em 188,75 mg/L de lipídeos, o tratamento com o uso de glicerol foi de 338,97 mg/L, ou seja, 80% mais produtivo que o controle. Enquanto isso o tratamento com o uso de glicose como fonte de carbono apresentou 225,77 mg/L de lipídeos, sendo portanto 20% melhor que o tratamento controle, ambos para 18º dia de cultivo. Conforme a Figura 15, tanto a glicose quanto o glicerol adicionado aos cultivos com salinidade 15 ‰, apresentaram maiores valores de lipídeos do que para os tratamentos com o uso destas fontes de carbono em salinidade 30 ‰. Ao comparar os resultados obtidos em relação à melhor fonte de carbono fornecida, constatou-se que o glicerol foi uma fonte que melhor contribuiu para o aumento de lipídeos para a microalga *Phaeodactylum tricornutum*. Na Tabela 6 os resultados de produtividade lipídeos em miligrama por litro de meio por dia podem ser comparados, na qual se encontram em destaque os melhores resultados obtidos. O Tratamento 2 administrado com adição de glicerol no início do cultivo apresentou o maior valor de produtividade, como pode ser vista na Tabela 6. Neste tratamento, foi encontrado 18,83 mg/L.dia^{-1} de produção de lipídeo. Penteado (2010) ao realizar experimentos com a mesma espécie de microalga adicionando glicerol e aumentando sete vezes mais a concentração de metais, do que a deste experimento encontrou um valor mais elevado: 24,39 mg/L.dia^{-1}. Isto indica que não apenas o glicerol contribui para a elevação da produtividade, mas que outras variáveis devem ser investigadas simultaneamente.

A partir deste experimento ficou estabelecido que o glicerol é a fonte de carbono melhor assimilada e que a salinidade de 15 ‰ propiciou maior produtividade. Por isso nos próximos experimentos o glicerol será adicionado no início do cultivo e o meio será preparado em salinidade 15 ‰.

Tabela 6 – Produção de lipídeos da microalga *Phaeodactylum tricornutum*

Trat. ($mg.L^{-1}.d^{-1}$)	10º	12º	14º	16º	18º
1	3,60 ± 0,60	7,41 ± 0,42	7,89 ± 0,43	8,88 ± 0,31	10,49 ± 0,36
2	6,87 ± 0,13	11,76 ± 0,95	11,32 ± 2,01	13,41 ± 0,8	18,83 ± 1,7
3	4,86 ± 0,20	8,65 ± 0,28	11,11 ± 1,42	11,36 ± 0,95	12,54 ± 0,41
4	3,06 ± 0,22	3,57 ± 0,34	6,30 ± 0,29	6,10 ± 0,78	9,96 ± 1,29
5	7,27 ± 0,25	6,64 ± 0,55	9,85 ± 0,35	9,82 ± 1,56	16,20 ± 1,83
6	6,02 ± 0,73	4,71 ± 0,27	6,81 ± 0,17	7,15 ± 0,83	10,81 ± 0,89

* Os resultados apresentados são referentes à média de três análises seguida do erro padrão.

5.3 CULTIVOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLICEROL COM FOTOPERÍODO

Neste experimento foram realizados experimentos para identificar a melhor produtividade em diferentes concentrações de glicerol, variando a concentração de 0M a 0,15M. Conforme estudado na seção anterior, todos os experimentos foram realizados em meio salino de 15 ‰. O fotoperíodo de 12 horas foi realizado com o intuito de aproximar o experimento das condições reais. O planejamento dos cultivos realizados em duplicata, bem como os tratamentos e suas respectivas concentrações de glicerol podem ser vistos na Tabela 7.

Tabela 7 – Planejamento experimental dos tratamentos realizados em várias concentrações de glicerol

Experimento	Concentração de glicerol
1	0 M
2	0,05 M
3	0,1 M
4	0,15 M

5.3.1 Caracterização da cinética de crescimento

Os gráficos de a - d apresentados na Figura 17 apresentam as curvas de crescimento, com ajuste logístico nos quatro tratamentos realizados.

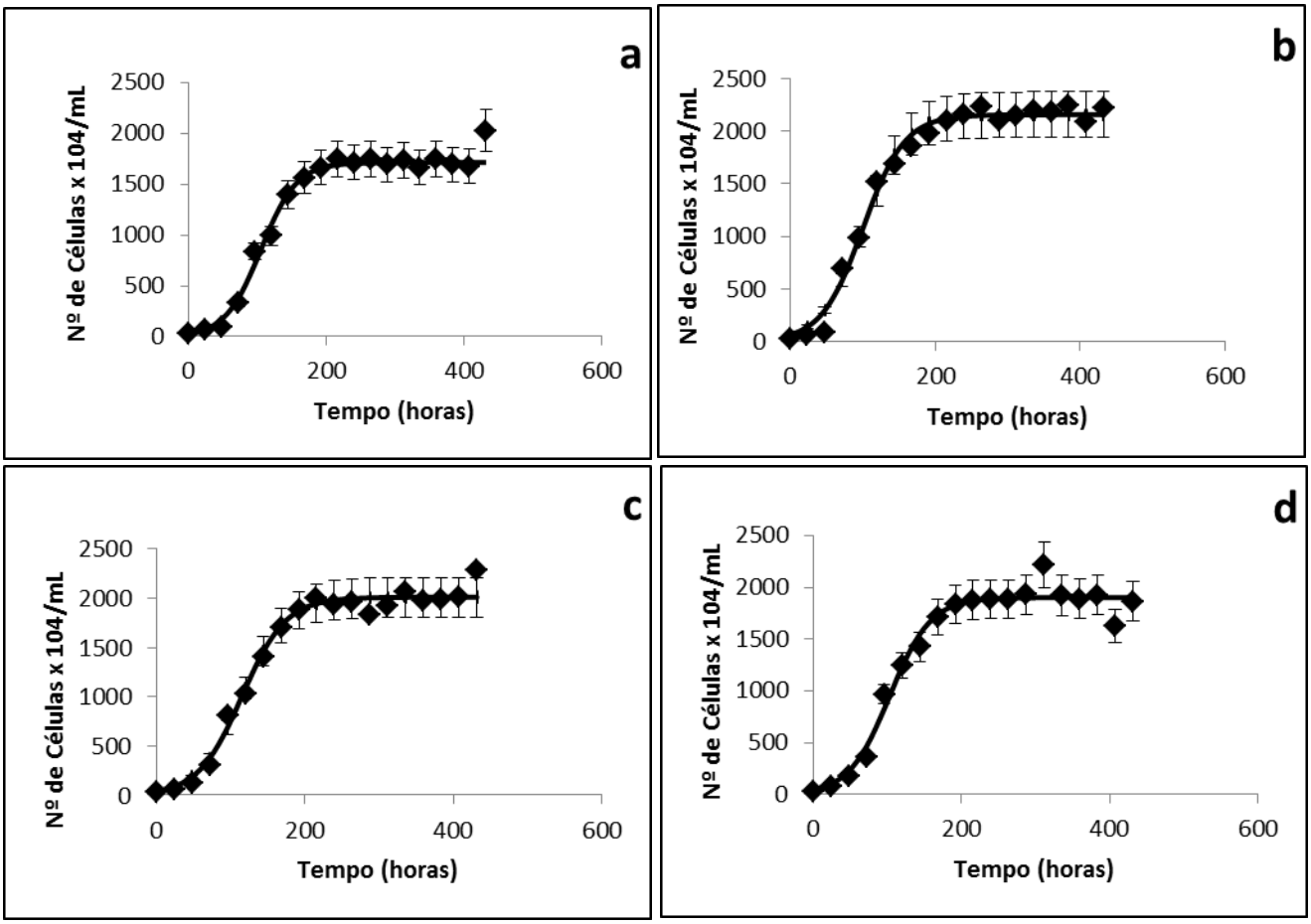

Figura 17 - Curva de crescimento para o tratamento 1 ao 4. (♦) dados experimentais e (—) ajuste pela equação logística. a) Experimento 1: Cultivo autotrófico – 0,0M de glicerol; b) Experimento 2: Cultivo mixotrófico – 0,05M de glicerol; c) Experimento 3: Cultivo mixotrófico – 0,1M de glicerol; d) Experimento 4 – Cultivo mixotrófico – 0,15M de glicerol.

A Tabela 8 apresenta os valores da densidade celular inicial, densidade celular máxima alcançada, velocidade específica de crescimento e o intervalo de tempo do ajuste da equação logística para todos os experimentos realizados nas seguintes concentrações de glicerol: 0M, 0,05M, 0,1M e 0,15M. Verifica-se que

nem sempre a maior concentração de glicerol determina um aumento no crescimento celular. Conforme a tabela 8, na concentração de 0,15 M de glicerol o número máximo de células é inferior ao valor do tratamento onde o glicerol não foi adicionado.

Tabela 8 – Análise cinética da curva de crescimento da microalga *P. tricornutum* em cultivos com diferentes concentrações de glicerol

Trat.	N_0 ($x10^4$ células. ml^{-1})	$N_{máx}$ ($x10^4$ células. ml^{-1})	$\mu_{máx}$ (dia^{-1})	Tempo (dia)
0M	30	2029	1,0125	0-18
0,05M	30	2222	0,8172	0-18
0,1M	29	2289	0,9350	0-18
0,15M	31	1865	0,8698	0-18

5.3.2. Determinação de biomassa seca

No período entre 12 e 20 dias o número de células ficou essencialmente constante (Figura 17), enquanto a biomassa seca quase dobrou como pode ser observado na Figura 18. A provável explicação é que ocorre um acúmulo de lipídios neste período.

A biomassa seca no experimento com o uso de glicerol na concentração de 0,1M foi o maior valor encontrado, portanto, em relação ao experimento controle, teve um aumento de apenas 12% no 20º dia de cultivo, conforme os valores de biomassa obtidos na seção anterior onde os cultivos foram mantidos a exposição de 24 horas de luz, percebeu-se que o fotoperíodo de 12 h foi desfavorável no aumento de biomassa. Ao comparar os experimentos realizados com fotoperíodo de 12 h com os experimentos em exposição de 24 h à luz mantendo à outras condições foi constatado um menor acréscimo de biomassa na em fotoperíodo de 12 h.

De acordo com o experimento realizado na seção 5.2.2.1,tratamento com concentração de 0,1M de glicerol no 18º dia cultivados em 24 h de luz apresentou a 1,26 g/L de biomassa seca, enquanto o cultivo em exposição de 12 h de luz na

mesma concentração de glicerol a biomassa atingida foi de 0,92 g/L. Esta diferença demonstra o quanto a variável luz é importante nos cultivos mixotróficos.

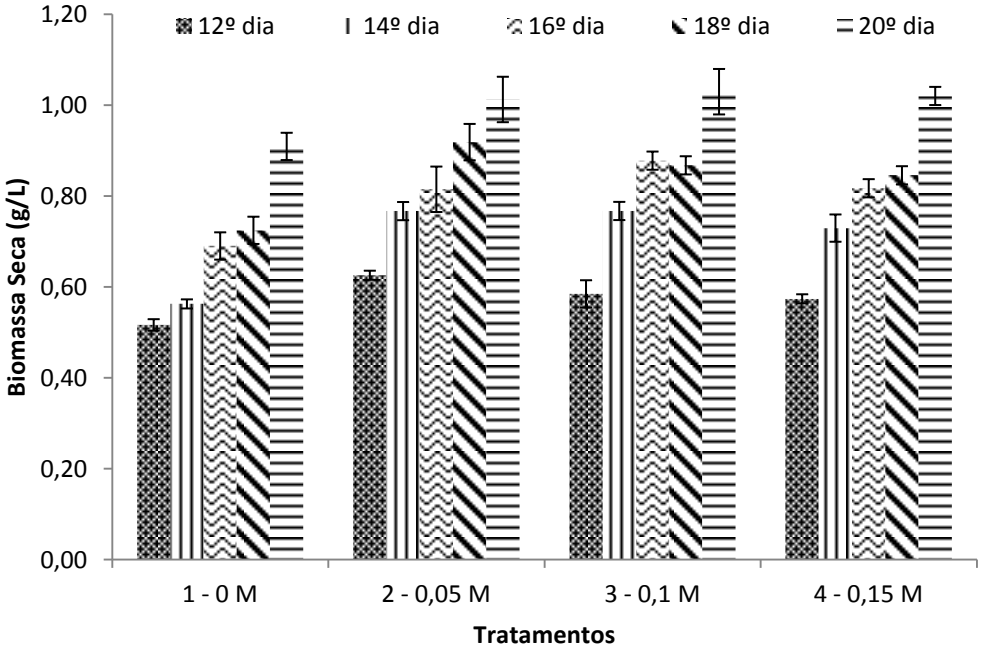

Figura 18 – Aumento de biomassa seca em gramas por litro de meio de cultivo entre 12º e 20º dias em diferentes concentrações de glicerol.

Ao comparar o valor da biomassa seca em diferentes fotoperíodos, pode ser previsto que no fotobiorreator não será possível alcançar a biomassa seca máxima obtida em cultivos com 24 h de luz, pois a manutenção de um fotobiorreator com iluminação artificial com foco na produção de biodiesel torna-se inviável. Porém as microalgas podem oferecer inúmeros compostos de altíssimo valor agregado, sendo assim, a análise custo/benefício permite estimar a viabilidade financeira da realização de um investimento no bom funcionamento do fotobiorreator para estes fins.

A Figura 19 mostra o valor da biomassa seca observada por Camacho *et al.* (2005), e os dados experimentais obtidos neste trabalho ambos em fotoperíodo integral de luz, com adição de 0,1M de glicerol aos cultivos, sendo o de Camacho *et al* (2005) adicionado CO_2.

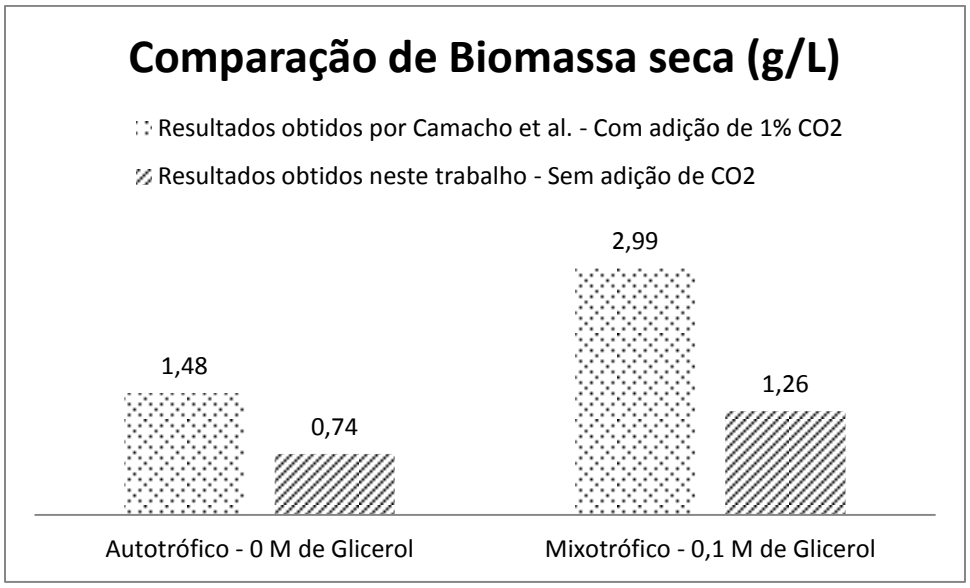

Figura 19– Comparação de biomassa seca obtida por Camacho *et al.*, (2005) e valores encontrados neste trabalho.

Cabe lembrar que há pequenas diferenças no cultivo que podem contribuir para esta diferença de resultados, tais como pequenas variações de temperatura, as lâmpadas usadas no experimento realizado por Camacho *et al.* foram de 36 W, e a deste trabalho foi de 40 W. A salinidade do meio de cultivo também não foram as mesmas, pois as microalgas empregadas no cultivo deste trabalho foi de 15 ‰ enquanto a de Camacho *et al.* foi de 30 ‰. O meio de cultivo usado por Camacho *et al.* foi proposto por García Sanchés, 1995 enquanto neste trabalho utilizou-se o meio Guillard, 1975.

Conforme apresentado na Figura 19 a adição de CO_2 aos cultivos determina um aumento de biomassa seca, porém propositalmente o CO_2 não foi adicionado neste trabalho porque este propõe a obtenção de óleo de maneira renovável. O uso do CO_2 apontaria a dependência de um derivado de um combustível fóssil fugindo assim do propósito deste trabalho.

A Tabela 9 mostra os valores de biomassa seca encontradas em cada experimento realizado neste trabalho, em destaque encontra-se o maior valor de biomassa seca atingido. Pode-se perceber que o tratamento 3, onde o glicerol foi adicionado na concentração 0,1M foi obtido o melhor resultado, mostrando que

tanto em fotoperíodo de 24 h de luz ou de 12 h de luz a concentração de glicerol apropriada é a mesma: 0,1M.

Tabela 9– Resultados Biomassa Seca (g/L)

	Trat. 1 – 0 M	Trat. 2 – 0,05 M	Trat. 3 – 0,1 M	Trat. 4 – 0,15 M
12º dia	0,52 ± 0,01	0,63 ± 0,01	0,59 ± 0,03	0,57 ± 0,01
14º dia	0,56 ± 0,01	0,77 ± 0,02	0,77 ± 0,02	0,73 ± 0,03
16º dia	0,69 ± 0,03	0,82 ± 0,05	0,88 ± 0,02	0,82 ± 0,02
18º dia	0,72 ± 0,03	0,92 ± 0,04	0,87 ± 0,02	0,85 ± 0,02
20º dia	0,91 ± 0,03	1,01 ± 0,05	**1,03 ± 0,05**	1,02 ± 0,02

5.3.2.Teor lipídico

Ao comparar a produção de lipídeos em diferentes concentrações de glicerol, percebeu-se que a o experimento na concentração de 0,15M foi o que produziu menor valor de lipídeos em relação as demais concentrações utilizadas, o que permite confirmar que a elevada concentração de glicerol não está diretamente relacionada à elevação da produção de lipídeos, pelo contrário, gerou desperdício da fonte de carbono e implicou num decréscimo na produção de óleos.

A Figura 20 apresenta o percentual lipídico dos 4 tratamentos realizados com variação de concentração de nutrientes, onde o melhor percentual atingido foi de 28% onde a concentração de glicerol adicionada foi de 0,1M. A Figura 21 apresenta os resultados do teor lipídico alcançado para os mesmos tratamentos. O valor máximo alcançado de 288 mg/L corresponde ao mesmo tratamento que o maior percentual lipídico, com concentração de glicerol de 0,1M adicionado ao cultivo.

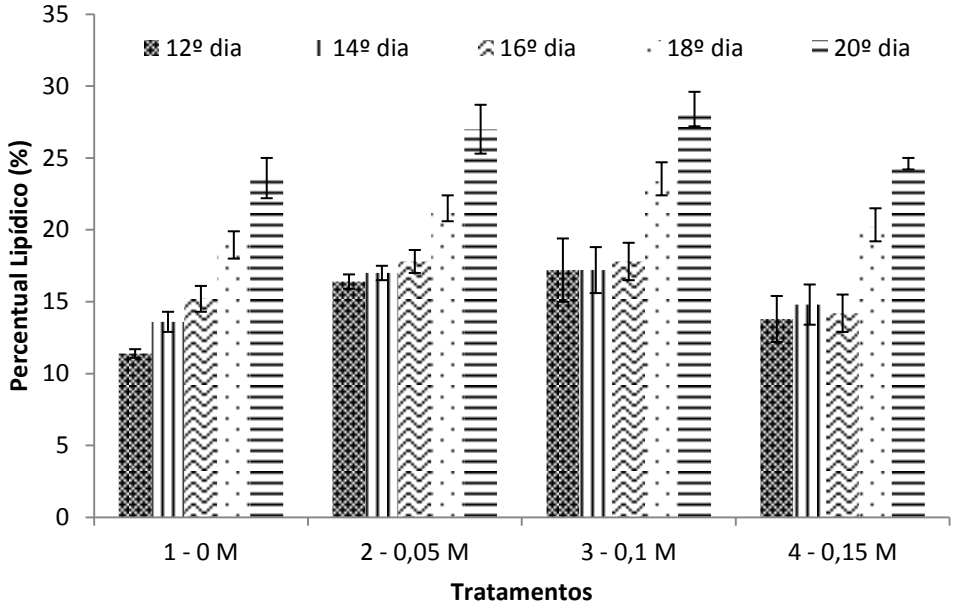

Figura 20 – Percentual de lipídeos em cultivos com diferentes concentrações de glicerol.

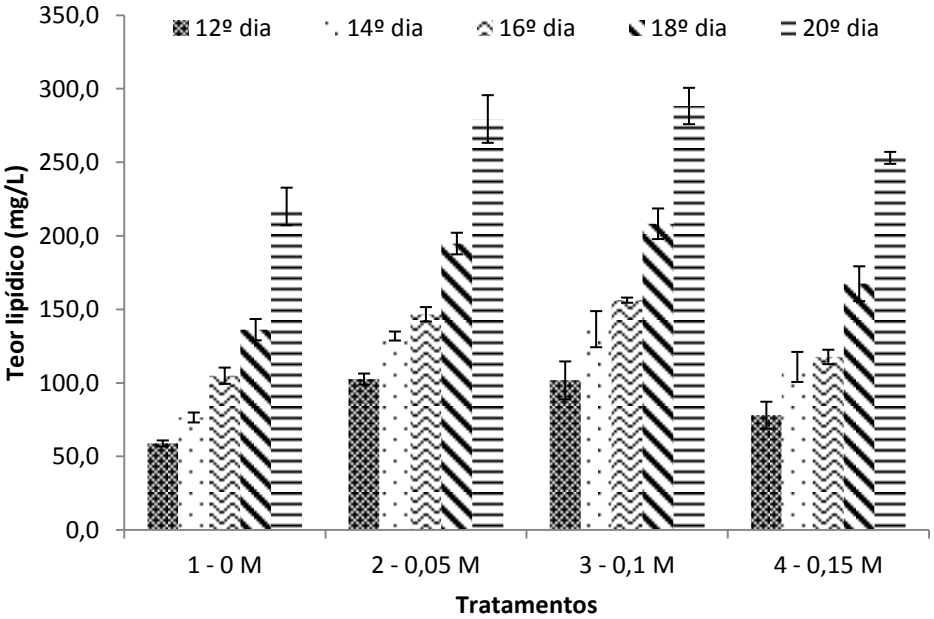

Figura 21 – Aumento da quantidade de lipídeos em gramas por litro de meio de cultura entre 12º e 20º dia.

O teor de lipídeos apresentou melhores resultados para o experimento com uso de glicerol na concentração de 0,1M (tratamento 3), apesar de a melhor biomassa encontrada ser para o glicerol na concentração 0,15M (tratamento 4).

5.4 VIABILIDADE DA MODELAGEM COMPUTACIONAL APLICADA AOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS

A modelagem demonstrada neste trabalho utiliza resultados já discutidos em seções anteriores. A biomassa seca foi determinada de dois em dois dias, durante 16 dias, conforme descrito em na seção 5.1. A intenção desta seção será criar uma modelagem matemática capaz de estimar os resultados experimentais de biomassa seca.

5.4.1. MODELAGEM MATEMÁTICA DA VELOCIDADE DE CRESCIMENTO CELULAR COM ADIÇÃO DE GLICEROL

O código do programa foi desenvolvido em Fortran 95, onde foi implementado computacionalmente o modelo matemático referente às Equações 7–9. O programa Gnuplot [http://www.gnuplot.info], chamado diretamente do modelo computacional, foi usado como interface gráfica para a plotagem dos resultados. Através da modelagem computacional com o uso de elementos de volume foi construído um modelo para calcular a taxa de crescimento para a microalga *P. tricornutum* usando parâmetros de um cilindro de 2 litros de volume.
O método de Runge-Kutta de quarta ordem, com passo adaptativo, foi utilizado para a solução dos sistemas de equações diferenciais ordinárias do modelo matemático proposto. O modelo matemático proposto por Grima (1994) que mostra o crescimento da concentração de um cultivo de biomassa microalgal é dado por:

$$\frac{dC}{dt} = C(\mu - m) \tag{7}$$

Onde: C = concentração de biomassa

μ = taxa de crescimento específica

m = taxa de manutenção

A Equação 7, uma equação diferencial ordinária de primeira ordem que demonstra o crescimento da concentração do cultivo ao decorrer do tempo foi resolvida utilizando o método Runge–Kutta de 4º ordem.

A Equação 8 proposta por García-Malea *et al.* (2005) foi utilizada, ela demonstra a influência da irradiação e da concentração de nutrientes no crescimento da microalga.

$$\mu = \frac{\left(\frac{N.\mu N_{\max}}{K_N + N}\right).I_{av}^{n}}{(a - b.N)^{n} + I_{av}^{n}} \tag{8}$$

Para calcular a taxa de crescimento (μ), foi utilizada K_N que é a constante de saturação para a relação entre os teores de nutrientes (N) e o $\mu_{máx}$ observado. A taxa de crescimento específica independente dos nutrientes ($\mu N_{máx}$) foi obtida através de dados da literatura para a microalga *Phaeodactylum tricornutum.* Os coeficientes *a* e *b* foram dados utilizados da literatura que referem-se a taxa de crescimento celular relacionado a acumulação do pigmento carotenoide (GARCÍA-MALEA, 2005).

Para determinação da intensidade luminosa, foi utilizada a seguinte equação:

$$I_{av} = \frac{I_0}{K_a p C_b}\left(1 - \exp\left(-K_a p C_b\right)\right) \tag{9}$$

Onde:

I_0 = irradiância sem células

p = o comprimento do caminho óptico de luz

C_b = concentração de biomassa

K_a = coeficiente de extinção de biomassa em função dos pigmentos contidos nas células

A Figura 22 demonstra os resultados realizados experimentalmente e através da simulação, ambos iluminados por lâmpadas de 40W e volume total de 1,7 l de meio de cultura. Num dos experimentos foi realizado o cultivo mixotrófico, no qual foi adicionado glicerol e no outro o cultivo autotrófico, sem a presença de glicerol. A geometria do sistema utilizada no modelo computacional não foi a mesma utilizada no experimento. O Erlenmeyer possui uma geometria que não garante ao cultivo excelente distribuição de ar, luz e outros fatores que influenciam no crescimento do cultivo. Quando uma célula sobrepõe-se as outras, ocorre o fenômeno chamado auto sombreamento, na qual dificulta a chegada de luz a todas as células de forma regular. Num Erlenmeyer este fenômeno é a ainda mais evidente devido a diferença do diâmetro em todo o comprimento do frasco. A região inferior, por possuir um raio maior, tem como consequência o auto sombreamento mais intenso devido à alta concentração de biomassa em relação à região superior do frasco. Devido à dificuldade de adaptar a geometria do Erlenmeyer no cálculo da modelagem matemática referente à luminosidade, as dimensões do Erlenmeyer foram transformadas, resultando num cilindro de 10 cm de diâmetro x 26,5 cm de altura. Portanto, no experimento foi usado o Erlenmeyer, e na modelagem foi usado um cilindro, essa diferença de geometria pode ser observada na Figura 22. Nesta figura também pode ser visto a variável que é de suma importância para o crescimento de biomassa: a intensidade luminosa que é proporcionada através das lâmpadas de 40 W. Ainda na figura 22 é mostrado o sistema de aeração que fornece a agitação do meio de cultura, minimizando os efeitos do auto sombreamento e permitindo que todas as células sofram exposição à luz e à sombra de forma uniforme.

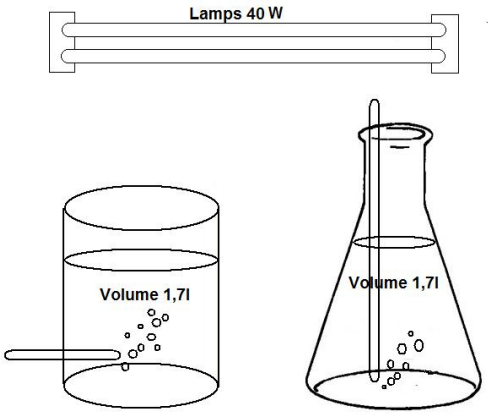

Figura 22 – Comparação dos experimentos realizados por meio da modelagem (cilindro) e experimentalmente (Erlenmeyer)

O modelo computacional utiliza dados relacionados da microalga *Phaeodactylum tricornutum* adquiridos da literatura Pérez *et al.* (2008), Grima *et al.* (2001), Fernández *et al.* (1997) e Sánchez *et al.* (2008) e parâmetros do fotobiorreator cilíndrico (Erlenmeyer adaptado). A Tabela 10 apresenta um resumo das constantes usadas na simulação numérica.

Tabela 10 – Constantes usadas na simulação numérica

Constantes
Volume = 1,7 l
C_0 = 0.100 g/l
Tempo = 384 h (16 dias)
N = 0,15M
T_0 = 293 K
$I_{0,Max}$ = 2500 $\mu Em^{-2}s^{-1}$
Raio = 5 cm
Q= 2,7 L/min

A Figura 23 mostra a diferença de coloração do meio de cultivo no término do experimento. Na Figura 23A a cor é mais escura devido a maior densidade de células onde o glicerol foi adicionado, enquanto a Figura 23B, devido à ausência

de glicerol houve uma menor divisão celular e o cultivo apresentou uma coloração mais clara.

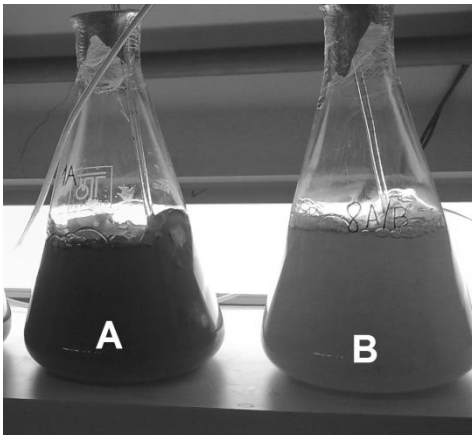

Figura 23 – Diferença de concentração no último dia de cultivo: 23A: maior concentração de microalgas com glicerol; 23B: menor concentração de microalgas sem glicerol.

As duas simulações realizadas consideram o cultivo em regime mixotrófico onde *N* da equação 8 representa a concentração de glicerol adicionada. Uma das simulações ocorre em 12h de luz/12h de escuro (1), e a outra em 24 horas de luz (2). Os resultados apresentados na coluna 3 referente ao cultivo realizado em escala laboratorial ocorreu em regime mixotrófico sob intensidade luminosa constante durante 24 horas (3), enquanto um experimento realizado em regime autotrófico (2), sob as mesmas condições de luz, foi avaliado. Todos os valores experimentais apresentados no gráfico estão seguidos do erro padrão.

A concentração máxima de biomassa obtida no cultivo mixotrófico foi de 1,294 g/L enquanto isso, no cultivo autotrófico a biomassa seca máxima obtida foi de 0,88 g/L. O cultivo mixotrófico com adição de glicerol foi 31,6% maior que o cultivo autotrófico. A biomassa seca obtida na simulação com as mesmas condições que o experimento foi de 1,3 g/L, este resultado foi o mesmo obtido experimentalmente, porém o modelo concordou somente com o ponto experimental final, e não concordou com os outros pontos, isto sugere que o modelo precisa ser melhorado e outras variáveis devem ser inseridas no modelo como por exemplo o auto sombreamento. A Figura 24 mostra os resultados da simulação realizada para o cultivo com 24 horas de luz e os dados experimentais

realizado sob luz constante por 24 horas, ambas com concentração inicial de 0,1g/L até a produtividade máxima de aproximadamente 1,3 g/L no decorrer de 16 dias de cultivo. Abaixo destas curvas é apresentada as curvas do experimento mixotrófico e autotrófico.

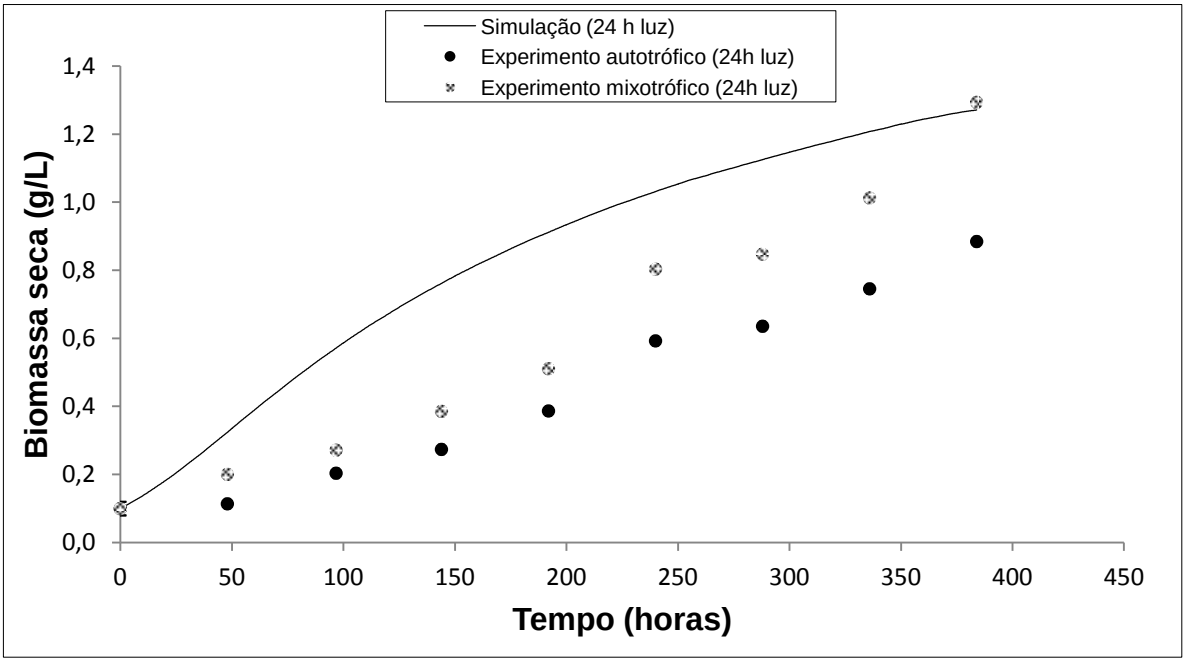

Figura 24 – Concentração de biomassa em relação ao tempo para simulação de 24 horas de luz.

Ao comparar os dados experimentais com a simulação na figura 24 deve ser considerado que a modelagem proporciona condições ideais, enquanto o experimento sofre limitações no decorrer do tempo que afetam o crescimento do cultivo, como supostamente o modelo deveria descrever a situação experimental, o modelo não incorporou todos os fatores que influenciam no crescimento. Alteração de pH, decréscimo de nutrientes no meio, auto-sombreamento em decorrência da elevação da concentração de biomassa, instabilidade de temperatura em dias extremamente quentes ou frios e ainda variação de intensidade luminosa em decorrência da geometria do sistema de cultivo apesar de a intensidade luminosa incidente ser constante, são algumas das variáveis que podem influenciar no crescimento do cultivo. Como este modelo não incorpora todos os fenômenos que influenciam no crescimento celular o modelo não foi

capaz de reproduzir todos os pontos experimentais apresentando uma deficiência no modelo. O fato de a taxa de crescimento obtida através da simulação ser um pouco maior no decorrer das horas, demonstra a deficiência do modelo. Na Figura 25, a linha tracejada refere-se aos dados obtidos da simulação numérica realizada em fotoperíodo de 12h. Ao comparar os resultados experimentais com os resultados da simulação numérica na Figura 25, verificou-se que o cultivo mixotrófico realizado com fotoperíodo de 12 h claro/12 h escuro foi mais próximo do resultado obtido experimentalmente, o qual foi cultivado sob luz durante 24h. Nota-se pontos em comum com os dados obtidos experimentalmente, porém é possível assumir que a variável fotoperíodo adicionada no modelo foi proporcional aos efeitos deletérios que limitaram o crescimento no cultivo realizado em fotoperíodo de 24h.

Os cultivos mixotróficos podem aumentar a concentração de biomassa de microalgas quando a fonte de carbono é adicionada em concentrações adequadas, demonstrando assim a capacidade metabólica de algumas espécies de microalgas em regimes mixotróficos. A modelagem matemática foi capaz de estimar a concentração de biomassa final com adição de glicerol distanciando-se dos demais pontos experimentais. É importante o uso da simulação numérica, juntamente com diversos dados experimentais para que sejam verificadas as condições extremas de influência das variáveis na produtividade da microalga, estabelecendo assim, condições apropriadas para que seja possível atingir a máxima produtividade nos cultivos realizados. As simulações realizadas com fotoperíodo integral e parcial foram parcialmente aceitáveis quando comparadas com o experimento realizado em escala laboratorial, pois apenas o último ponto foi coincidente mostrando que há necessidade de melhorar o modelo considerando outras variáveis durante o cultivo. Portanto o modelo proposto pode ser uma ferramenta útil para o concepção e gestão de culturas microalgas e poderia permitir melhorar o rendimento desse processo de produção.

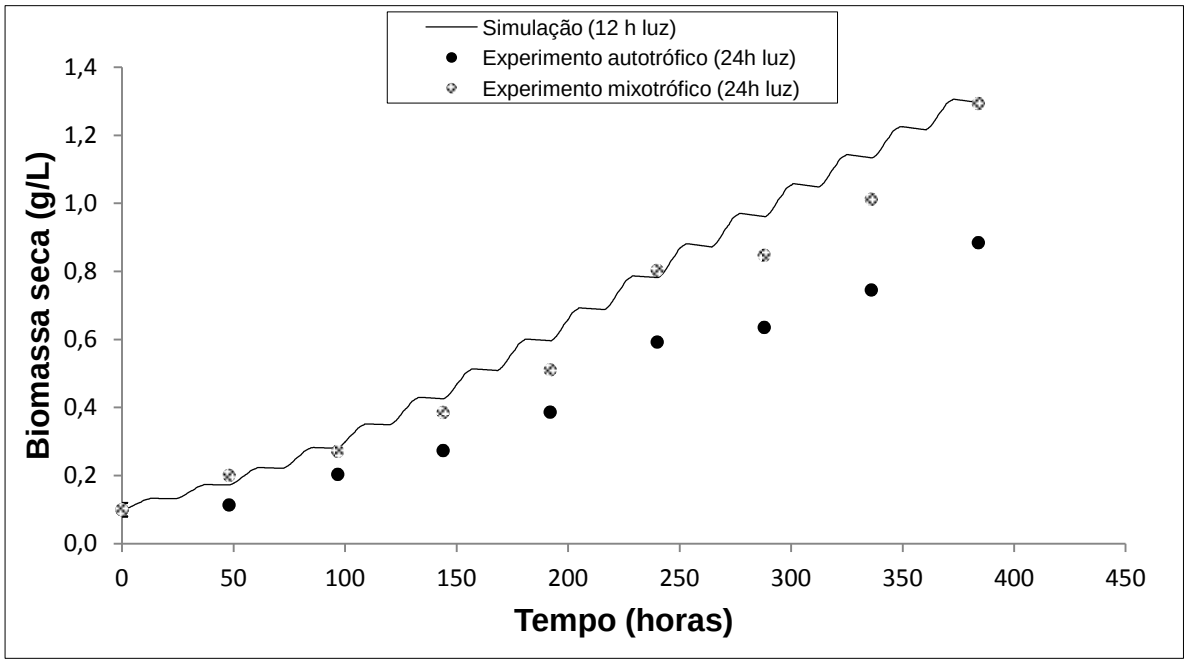

Figura 25 – Concentração de biomassa em relação ao tempo para simulação de 12 horas de luz.

6 Conclusões

Este trabalho avaliou o crescimento celular, a biomassa seca, o percentual lipídico e a quantidade de lipídeos armazenados na célula durante o cultivo da diatomácea *Phaeodactylum tricornutum* em diferentes meios de cultivo. Testou-se diferentes níveis de salinidade, diferentes fontes e concentrações de carbono, e fotoperíodo de 12 horas de luz e de 24 horas de luz. Cada bloco de experimentos realizados foi o ponto de partida para os experimentos seguintes. Esta dissertação seguiu a seguinte estrutura:

- Em decorrência da falta de publicações que visassem à maneira correta de adicionar fonte de carbono aos cultivos mixotróficos, foram realizados experimentos com adição de carbono de duas maneiras: diariamente e no início do cultivo e os mesmos foram comparados com o cultivo autotrófico. A adição da fonte de carbono no início do cultivo apresentou maior produção de biomassa seca em relação à adição diária;
- Posteriormente foram realizados experimentos com fotoperíodo integral de luz para constatar qual a melhor fonte de carbono (glicerol ou glicose) e melhor salinidade (15 ‰ ou 30 ‰) assimilada pela microalga de acordo com a biomassa seca e lipídeos armazenados na célula. Constatou-se que a microalga apresentou maior teor lipídico em salinidade 15 ‰ e o glicerol foi a fonte de carbono que apresentou melhores resultados do que a glicose caracterizando a necessidade de reaproveita-lo como sendo um subproduto do processo de transesterificação;
- Em regime de fotoperíodo de 12 horas de luz foram avaliadas a biomassa seca e a produção de lipídeos em diferentes concentrações de glicerol (0 M; 0,05 M; 0,1 M; 0,15 M). A ausência da luz apresentou-se com o um fator limitante ao crescimento, porém a concentração de 0,1 M permitiu melhor produção de biomassa e reserva de lipídeos;
- Notou-se que na presença de fotoperíodo integral, ou seja, 24 h de luz houve melhor assimilação de glicerol do que em fotoperíodo de 12 h claro/ 12 escuro. Com o fotoperíodo integral o cultivo realizado com adição de

glicerol foi 80% mais produtivo em relação ao cultivo autotrófico. Cultivo em fotobiorreatores com iluminação artificial apenas para produção de biodiesel torna-se muito caro, no entanto deixa de ser inviável ao se pensar em compostos de valor agregado.

- Resultados referentes à biomassa seca máxima alcançada neste trabalho foram comparados com dados da literatura onde o CO_2 foi utilizado. O CO_2 incorporado ao meio de cultivo apresentou valores significativos, no entanto a proposta deste trabalho foi a de não depender de derivado de combustíveis não-renováveis;
- Com base em dados da literatura e dos resultados deste trabalho foi possível estimar um custo R$18.500,00 para produzir 1 kg de óleo de microalga *Phaeodactylum tricornutum,* o que evidencia a necessidade de substituição de nutrientes ou mesmo escolher outra espécie de microalga que com teores de óleos destinados à produção de biodiesel.
- Resultados obtidos da biomassa seca realizada de dois em dois dias durante 16 dias de cultivo da microalga *P. tricornutum* foram comparados com uma modelagem matemática obtida a partir de dados da literatura. Apesar de estimar a concentração de biomassa final com adição de glicerol, distanciou-se dos demais pontos experimentais mostrando que o modelo proposto pode ser melhorado ao incorporar outras varáveis que influenciam no crescimento da microalga.

7 Trabalhos Futuros

Sugere-se que em trabalhos futuros o glicerol bruto ou pré purificado seja testado em cultivos mixotróficos, visando um menor custo à produção de biodiesel. Aconselha-se, portanto, que outra microalga seja selecionada de acordo com a realidade das instalações do NPDEAS e com o clima da região. Numa tentativa de obter óleo da microalga *Phaeodactylum tricornutum* a mesma foi submetida a um teste com prensa, mas o processo não foi obtido com êxito devido a carapaça rígida impregnada de sílica que entupiu a prensa. Pesquisas recentes no NPDEAS mostram que mix de microalgas (diferentes espécies) provenientes de parques de Curitiba, são muito apropriadas para cultivos massivos, pois estão sujeitas a frequentes variáveis, tais como mudança brusca de temperaturas, chuvas e intensidade luminosa. Com isso, seria importante realizar experimentos, como os realizados com a espécie *Phaeodactylum tricornutum*, a fim de conhecer a sua viabilidade para a produção de biodiesel.

8 Referências

ABIOVE – Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais. Congresso IASC Mumbai, 2009.

ALONSO, L. D.; SÁNCHEZ, G. J. L.; GRIMA, E. M. CAMACHO, F. G.; PÉREZ, J. A. S. Estudio de macronutrientes para la producción de PUFAs a partir de la microalga marina *Isochrysis galbana.* **Grasas y aceites international journal of fats and oils**, v. 45, p.323-331, 1994.

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina plantensis* using molasses a organic substrate. **Aquaculture**, v.264, p.130-134, 2007.

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Cultivo da microalga *Spiulina plantensis* em fontes alternativas de nutrientes. **Ciência e Agrotec.**, v.32, n5, p.1551-1556, 2008.

ANP – Agência Nacional do Petróleo. Disponível em: http://www.udop.com.br/download/estatistica/anp__biodiesel/2011/0211_boletim_mensal.pdf

ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. A. Glicerol: um subproduto com capacidade industrial e metabóbica. **Revista Analytica.** N. 26, p. 56 – 62. 2007.

ANTARTIC MARINE RESEARCH AQUARIUM. Disponível em: http://www.antarctica.gov.au/science/southern-ocean-ecosystems-environmental-change-and-conservation/southern-ocean-fisheries/krill/antarctic-marine-research-aquarium. Acesso em 13/06/2011.

ARAÚJO, S. A. C.; DEMINICIS, B. B. *Fotoinibição da Fotossíntese.* **Brasilian Journal of Biosciences,** v. 7, n. 4, p. 463-472, 2009.

ARAÚJO, V. C.; SANTOS, H. I. Análise do método da transesterificação no processo de fabricação do biodiesel de soja. 2008. Disponível em: www.ucg.br/ucg/prope/cpgss/Arquivosupload/36/file/Continua/AN%C3%81LISE%20DO%20M%C3%89TODO%20DE%20TRANSESTERIFICA%C3%87%C3%83O%20NO%20PROCESSO%20DE%20FABRICA%C3%87%C3%83O%20DO%20BIODIESEL%20DE%20SOJA.pdf. Acesso em 30/03/2011.

BAKER, N. R.; BOWYER, J. R. Photoinhibition of protosynthesis: from molecular mechanisms to the Field. **Bios Scientific Limited**, p.471, 1994.

BIODIESELBR. Portal do Biodiesel. Disponível em: http://www.biodieselbr.com/. Acesso em 03 de agosto de 2011.

CERÓN GARCIA, M. C.; F. GARCÍA CAMACHO; J. M FERNÁNDEZ SEVILLA; F. G. ACIÉN FERNÁNDEZ, E. MOLINA GRIMA. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on glycerol: growth rate and fatty acid profile. **Journal of Applied Phycology**. v. 12, p. 239-248, 2000.

CERÓN GARCIA, M. C. C.; CAMACHO, G.; MIRÓN, A. S.; SEVILLA, J. M. F.; GRIMA, E. M. Mixotrophic growth of the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* influence of different nitrogen and organic carbón sources on productivity and biomass composition. **Process Biochemistry**, v. 40, p.297-305, 2005

CERÓN GARCIA, M. C.; F. GARCÍA CAMACHO; A. SÁNCHEZ MIRÓN; J. M FERNÁNDEZ SEVILLA; Y. CHISTI; E. MOLINA GRIMA. Mixotrophic production of marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* on various carbon sources. J. Microbiol. **Biotechnology Advances**, v.16, n.5, p. 689-694, 2006.

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

CHOJNACKA, K. NOWORYTA, A. Evalution of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v.34,p. 461-465, 2004.

COLLA, L.; RUIZ, W. A.; COSTA, J. A. V. Metabolismo de carbono e nitrogênio em microalgas, Vetor, 12, p.61 – 78, 2002.

COSTA, J. A. V.; RADMANN E. M. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO_2, SO_2 e NO. **Quimica Nova**, v. 31, n 7, p.1609-1612, 2008.

COUTTEAU, P. Micro-algae. In: LAVENS, P.; SORGELOOS, P. **Manual on the production and use of live food for aquaculture**. FAO Fisheries Technical Paper,n. 361. Rome, FAO. 1996.

CYANOTECH. Disponível em: http://www.cyanotech.com/pdfs/spirulina/Cyanotech Spirulina.pdf. Acesso em 29/03/2011.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural,** v.36, n 6, p. 1959-1967, 2006.

DINIZ, G. L. Equações de diferenças e sistemas com aplicações biológicas – São Carlos, São Paulo - SP. SBMAC, 2011.

EARTHRISE. Disponível em http://www.earthrise.com/about.html. Acesso em 29/03/2011.

FÁBREGAS, J.; MORALES, E. D.; LAMELA, T.; CABEZAS, B.; OTERO, A. Short communication: Mixotrophic productivity of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* cultured with soluble fraction of rye, wheat and potato. **Microbiology e Biotechnology**, v.13, p. 349-351, 1997.

FENG CHEN, F.; WEN, Z. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. **Biotechnology Advances**, v.21,p. 273-294, 2003.

GARCÍA SANCHÉS, J.L.; E MOLINA GRIMA, F. GRACÍA CAMACHO, J. A. SÁNCHEZ PÉREZ; D. LÓPEZ ALONSO. Estudio de macronutrientes para La producción de PUFAs a partir de La microalga marina *Isochysis galbana.* **Grasas Aceites Sevilla.** v.45, p. 323-332, 1995.

GARCÍA-MALEA, M.C.; BRINDLEY, C.; DEL RÍO, E.; ACIÉN, F. G.; FERNÁNDEZ, J. M.; MOLINA, E. Modelling of growth and accumulation of carotenoids in *Haematococcus pluvialis* as a function of irradiance and nutrients supply. **Biochemical Engineering Journal,** v. 26, p.107-114, 2005.

GRIMA, E. M., CAMACHO, F. G., PÉREZ, J. A. S., SEVILLA, J. M. F., FERNANDEZ, F.G. A., CONTRERAS GOMEZ, A., A mathematical model of microalgal growth in light–limited chemostat culture. **J. Chem. Tech. Biotechnol**, 61, 167–173, 1994.

ISHIDA, Y.; HIRAGUSHI, N.; KITAGUCHI, H.; MITSUTANI, A.; NAGAI, S.; YOSHIMURA, M. A highly CO_2- tolerant diatom, *Thalassiosira weissflogii* H1, enriched from coastal sea, and its fatty acid composition. **Fisheries Science**, n.66, p. 655-659, 2000.

JOLY, A. B. Botânica: Introdução à taxonomia vegetal. Companhia Editora Nacional. 13ª edição. São Paulo, 2005.

KNOTHE, G; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. Manual de Biodiesel. Editora Blucher. São Paulo, 2006.

KURANO, N.; MIYACHI, S. Selection of microalgal growth model for describing specific growth rate-light response using extended information criterion. **Bioscience and Bioengeneering,** v.100, n. 4,p. 403-408, 2005.

LEE, H.; SEO, M. KIM, Z.; LEE, C. Determining the best specific light uptake rates for the lumostatic cultures in bubble column photobioreactors. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39,p. 447-452, 2006.

LEWIN, J. C. The taxonomic of *Phaeodactylum tricornutum.* **J. Gen. Microbiol.** V. 18, p. 427-432, 1958.

LIN C.; CHIU S.; KAO C.; TSAI M.; ONG S.; CHEN, C. Lipid accumulation and CO_2 utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO_2 aeration. **Bioresource Technology**, n.100, p. 833-838, 2009.

LOURENÇO, S. O. Cultivo de microalgas marinhas – princípios e aplicações. São Carlos: RiMa, 2006.

MARIANO, A. B.; RAMOS, L. P.; VARGAS, J. V. C; PULLIAN, R.; BALMANT, W.; MORAIS, K. C. C.; DZUMAN, M. J.; ARANTES, A. C. C. Comparação de meios de cultivo autotróficos, mixotróficos e heterotróficos para produção de biomassa de microalga com foco em biocombustíveis e co-produtos. In: 5º Congresso Internacional de Bioenergia, 2009, Curitiba. 5º Congresso Internacional de Bioenergia; 1º Congresso Brasileiro de Geração Distribuída e Energias Renováveis, 2010.

MEINERZ, L. I. Influência da temperatura, salinidade e nutrientes dissolvidos (N e P) no cultivo de microalgas de agua estaurina e costeira. Dissertação de mestrado. Programa de pós graduação em Aquicultura. Rio Grande – RS, 2007.

MELLO, T. C.; GNOATTO, V. E.; MORAIS, K. C. C.; RIBEIRO, K.; MIYAWAKI, B.; CARDOSO, A. T. M.; BECKER, A.; PULLIAM, R.; VARGAS, J. V. C.; MARIANO, A. B. Efeito econômico da utilização de fertilizantes como substrato no cultivo de microalgas. In: 5º Congresso Internacional de Bioenergia, 2009, Curitiba. 5º Congresso Internacional de Bioenergia; 1º Congresso Brasileiro de Geração Distribuída e Energias Renováveis, 2010.

MENG, X.; YANG, J.; XU, X.; ZHANG, L. NIE, Q.; XIAN, M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, n34, p.1-5, 2009.

MORAIS, K. C. C.; RIBEIRO, R. L. L.; SANTOS, K. R.; TAHER, D. M.; MARIANO, A. B.; VARGAS, J. V. C. *Phaeodactylum tricornutum* microalgae growth rate in heterotrophic and mixotrophic conditions. **Thermal Engineering**, v.8, n.1,p. 84-89, 2009.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbono dioxide. **Energy Coversion and Management**, v. 48, p.2169-2173, 2007.

MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C. Gliceroquímica: Novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 32, p. 639-648, 2009.

MOTTA, V. T. Bioquímica Básica. EDUCS, 2005.

OHSE, S.; DERNER, R. B.; OZÓRIO, R. A.; BRAGA, M. V. C.; CUNHA, P.; LAMARCA, C. P.; SANTOS, M. E. Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário. **Revista Biotemas**, v.21, p.7-18, 2008.

PENTEADO, D. M. R. Estudos de otimização do meio de cultura para a microalga *Phaeodactylum tricornutum* para produção de lipídios. *Dissertação de Pós-Graduação em Bioquímica*. Curitiba, 2010.

PENTEADO, D. M. R.; SOARES, D.; MITCHELL, D. A.; NOSEDA, M. D.; NDJAYE, P. M.; BECKER, A. Influência da privação do nitrogênio no meio de cultura para o aumento da produção de lipídeos pela *Phaeodactylum* tricornutum. In: IX Simpósio de hidrólise enzimática de biomassa. Maringá: Universidade estadual de Maringá – UEM. 2009.

PÉREZ E. B.; PINA I. C.; RODRÍGUES L. P. Kinetic model for growth of *Phaeodactylum tricornutum* in intensive culture photobioreactor.Biochemical Engineering. (48), 520-525, 2008.

RADMANN, E.; OLIVEIRA, C. F.; ZANFONATO, K.; VIEIRA, J. A. *Cultivo Mixotrófico da Microalga Spirulina sp. LEB-18 com Adição Noturna de Diferentes Fontes de Carbono Orgânico*. XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos. Natal-RN, 2009

RENAUD, S. M.; ZHOU, H. C.; PARRY, D. L.; THINH, L. V.; WOO, K. C. Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis sp., Nitzschia closterium, Nitzschia paleacea,* and commercial species *Isochrysis sp.*(Clone T. ISO). **Journal of Applied Phycology**, v. 7, p. 595-602, 2004.

RIBEIRO, R. L. L. ; MORAIS, K. C. C. ;MARIANO, A. B. ; SOUZA, J. A. ; MITCHELL, D. A. ; VARGAS, J. V. C. . Simulação numérica da influência da temperatura e intensidade luminosa na produção de microalgas em fotobiorreatores demonstrando efeitos de fotoinibição. In: 4º Congresso Internacional de Bioenergia, 2009, Curitiba. 4º Congresso Internacional de Bioenergia; 1º Congresso Brasileiro de Geração Distribuída e Energias Renováveis, 2009.

RIBEIRO, R. L. L.; VARGAS, J. V. C.; SOUZA, J. A. Modelagem matemática e computacional para fotobiorreatores tubulares que cultivam microalgas. In: XXXIII Congresso Nacional de Matemática Aplicada e Computacional. v. 3, p.1093-1094. Anais do CNMAC, 2010.

RIGANO, V. D. M.; VONA, V.; ESPORITO, S.; CARILLO, P.; CARFAGNA, S.; RIGANO, C. The physiologican significance of light and dark NH4+ metabolism in Chlorella sorokiniana. **Phytochemistry**, v.47, p.177-181, 1998.

SATYANARAYANA, K. G; MARIANO, A. B.; VARGAS, J. V. C. A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. **International Journal of Energy Research.** v. 35, p. 291 – 311, 2010.

SERENOTTI, F.; CRESPI B. A.; TORRES, L. G. Contribuição à modelagem da produção de *Spirulina máxima* em fotobiorreatores. **Rev. Univ. Rural**. Vol. 23. Nº 1-2. p.08-17, 2004.

SHEEHAN, J.; DUNAHA, Y. T.; BENEMANN,J.; ROESSLER, P. A look back at the U.S. Departament of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae. U.S. Report NREL/TP-580-24190. Golden CO: National Renewable Energy Laboratory, 323p. Colorado, 1998.

SIERRA, E. MOLINA, E.; FERNÁNDEZ, J. M. GARCÍA, J. L.; GONZÁLEZ C. Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae.**Chemical Engeneering**, v.138, p.136-147, 2008.

SOARES, D. Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo. *Dissertação de Pós-Graduação em Bioquímica*. Curitiba, 2010.

SPOLAORE, P.; CASSAN, C. J. ; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial aplications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, p.87-96, 2006.

TAIZ. L; ZEIGER. E. Fisiologia Vegetal. Editora Artmed. 3ª edição. Porto Alegre, 2006.

TEIXEIRA, C. M.; MORALES, M. E. Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel. Biodiesel o novo combustível do Brasil. Rio de Janeiro, 2006.

THOMPSON, P. A.; GUO, M.; HARRISON, P. J. Effects of variation in temperature: On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton. **Journal of Phycology**, v. 28, p. 481-488, 1992.

TSUZUKI, M.; OHNUMA E.; SATO N.; TAKAKU T.; KAWAGUCHI A. Effects of CO_2 Concentration during Growth on Fatty Acid Composition in Microalgae. **Plant Physiol**., v.93, p. 851-856, 1990.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**, v.27,p.139-145, 2004.