

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALINE BESCROVAINE PEREIRA

PRODUÇÃO DE BIOMASSA E DE LIPÍDEOS POR CULTIVO MISTO DE  
MICROALGAS SUPLEMENTADO COM CO<sub>2</sub>

CURITIBA

2013

ALINE BESCROVAINE PEREIRA

PRODUÇÃO DE BIOMASSA E DE LIPÍDEOS POR CULTIVO MISTO DE  
MICROALGAS SUPLEMENTADO COM CO<sub>2</sub>

Dissertação apresentada ao Curso de  
Pós-Graduação em Engenharia Química,  
Área de Concentração em  
Desenvolvimento de Processos  
Químicos, Departamento de Engenharia  
Química, Setor de Tecnologia,  
Universidade Federal do Paraná, como  
parte das exigências para obtenção do  
título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. David Alexander  
Mitchell

Coorientador: Prof. Dr. André Bellin  
Mariano

CURITIBA

2013

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor David Mitchell, pela orientação e confiança e, principalmente, pela incansável dedicação em possibilitar o desenvolvimento dos seus alunos.

Ao NPDEAS, em especial ao professor André Bellin Mariano, pelo apoio e por disponibilizar a estrutura utilizada nesse trabalho.

À colega de pós-graduação, Maria Judite Dzuman, pela amizade, companheirismo e ajuda durante todo o período de mestrado.

Aos meus colegas do TECPAR, Alexandre Akira Takamatsu, Anderson Sakuma e Leandro Pegoraro, por me incentivarem a desenvolver o talento para a pesquisa.

À minha família, em especial à minha avó Irena Kokieli, por ser meu exemplo de força, perseverança, honestidade e amor. Em especial também à minha mãe Marilene Bescrovaine, pelo incondicional amor e pelo grande incentivo na realização desse mestrado.

A Mikhail Anatholy Koslowski, pela dedicação, companheirismo e apoio em todos os âmbitos da minha vida, inclusive e especialmente, no desenvolvimento do mestrado.

Ao amigo Luiz Carlos Beraldi, pelo conforto, orientação e incentivo nos momentos de mudança que antecederam a realização desse mestrado.

À Capes, pelo auxílio financeiro.

## RESUMO

A biomassa de microalgas se tornou uma promessa de matéria-prima para a produção de biocombustíveis, pois algumas espécies podem acumular em sua biomassa grandes quantidades de lipídeos, precursores da produção de biodiesel. O presente estudo está inserido no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPDEAS) da Universidade Federal do Paraná, o qual busca desenvolver a cadeia de tecnologias que possibilita a produção de biomassa e biodiesel de microalgas. O presente estudo uniu, pela primeira vez em escala laboratorial no NPDEAS, duas estratégias já utilizadas na literatura para aumentar a produção de biomassa e lipídeos de microalgas. A primeira é a utilização de aeração enriquecida com CO<sub>2</sub> puro comercial no período iluminado, a fim de aumentar a velocidade de transferência de CO<sub>2</sub> para o meio líquido e, por consequência, favorecer a realização da fotossíntese. A segunda é a utilização de cultivos mistos de microalgas, ou seja, cultivos originados de um primeiro inóculo composto de uma amostra coletada em ambiente aquático natural contendo uma mistura de espécies de microalgas. A comunidade de microalgas em um cultivo misto tende a apresentar oscilações no perfil de espécies, o que pode alterar a quantidade e a qualidade da biomassa, porém nenhum dos estudos sobre cultivos mistos descritos anteriormente na literatura aborda a reprodutibilidade dos experimentos. O presente trabalho teve o objetivo não somente de avaliar o efeito das duas estratégias na produção de biomassa e lipídeos, mas também de avaliar a repetibilidade e a reprodutibilidade de cultivos mistos. Este estudo demonstrou que a aeração enriquecida com 2% (v/v) de CO<sub>2</sub> aumentou significativamente ( $\alpha=0,01$ ) a velocidade de crescimento na fase linear de 12 mg.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>, com aeração exclusiva por ar atmosférico, para 28 mg.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>. Porém, a inserção de aeração com 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> demonstrou a falta de reprodutibilidade desses resultados, uma vez que, enquanto em um 1<sup>o</sup> experimento, a velocidade de crescimento na fase linear, 32 mg.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>, não apresentou diferença significativa ( $\alpha=0,01$ ) em relação à do cultivo com 2% (v/v), em um 2<sup>o</sup> experimento, essa velocidade apresentou o valor significativamente menor ( $\alpha=0,01$ ) de 17 mg.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>. A falta de reprodutibilidade também se repetiu no conteúdo de lipídeos totais da biomassa seca, o qual se manteve inalterado ( $\alpha=0,01$ ) e em torno de 15% nos cultivos com apenas ar atmosférico, com 2% (v/v) de CO<sub>2</sub> e no 1<sup>o</sup> cultivo com 5% (v/v) de CO<sub>2</sub>, mas apresentou queda significativa ( $\alpha=0,01$ ) para 12% no 2<sup>o</sup> cultivo. A utilização de aeração enriquecida de CO<sub>2</sub> aumentou a repetibilidade dos cultivos mistos, uma vez que tornou mais próximas as curvas de crescimento dentro das replicatas de condição experimental. Essa aeração também diminuiu de 27% para 0% a fração de frascos que sofreram colapso, ou seja, morte prematura das células. Em experimentos futuros, o aumento da concentração celular inicial dos cultivos e o uso de inóculos mistos padronizados, pela mistura de cultivos estoque unialgais, são alternativas para aumentar a reprodutibilidade dos resultados.

Palavras-chave: Microalga. Cultivos mistos. CO<sub>2</sub>. Lipídeos. Reprodutibilidade.

## ABSTRACT

Microalgal biomass has become a promising raw material for the production of biofuels, with some species of microalgae being able to accumulate large quantities of lipids, precursors of biodiesel, in their biomass. The present study contributes to the investigations being undertaken by the Nucleus of Research and Development of Self-Sustainable Energy (NPDEAS) of the Federal University of Paraná, which is seeking to develop a network of technologies for the production of biomass and biodiesel from microalgae. The present study brought together, for the first time in NPDEAS, two strategies that have been proposed in the literature to increase the production of microalgal biomass and lipids. The first is the use of air enriched with pure CO<sub>2</sub> during the period of illumination, with the aim of increasing the rate of transfer of CO<sub>2</sub> to the liquid phase and, consequently, increasing the rate of photosynthesis. The second is the use of mixed cultures of microalgae, namely cultures originating from samples collected in natural aquatic environments that contain various microalgal species. The microalgal community within a mixed culture tends to suffer from oscillations of the relative proportions of the various species present, which can affect the quantity and composition of the biomass produced. However, none of the previous literature studies that have involved mixed cultures has addressed the question of the reproducibility of the experiments. The present study, therefore, had the aim not only of evaluating the effect of these two strategies on the production of biomass and lipids, but also of evaluating the repeatability and reproducibility of the mixed cultures. Aeration with normal atmospheric air gave linear growth at a rate of 12.mg.L<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup>. This was increased to a linear growth rate of 28 mg.L<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup> by using air enriched with 2% (v/v) CO<sub>2</sub>. However, the results obtained in two experiments using air enriched with 5% (v/v) CO<sub>2</sub> demonstrated the lack of reproducibility of the results: in the first experiment the linear growth rate of 32 mg.L<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup> was not significantly different ( $\alpha=0.01$ ) from that obtained with 2% (v/v) CO<sub>2</sub>, however, in the second experiment the linear growth rate was significantly lower ( $\alpha=0.01$ ), 17 mg.L<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup>. This lack of reproducibility was also apparent in the results for the total lipid content of the dry biomass: a value of 15% was obtained with atmospheric air, air enriched with 2% (v/v) CO<sub>2</sub> and the first experiment with air enriched with 5% (v/v) CO<sub>2</sub>, however, in the second experiment with air enriched with 5% (v/v) CO<sub>2</sub> the value was significantly lower ( $\alpha=0.01$ ), 12%. On the other hand, the use of air enriched with CO<sub>2</sub> increased the repeatability of the mixed cultures: the growth curves obtained with the replicates supplied with CO<sub>2</sub>-enriched air were closer to one another than those for the replicates supplied with normal air. The use of CO<sub>2</sub>-enriched air also decreased the fraction of flasks that suffered "collapse", namely premature death of the cells: this collapse happened in 1 in 4 flasks for cultures supplied with normal air but did not happen for flasks supplied with CO<sub>2</sub>-enriched air. In future experiments, alternative strategies for improving the reproducibility of the results could involve, firstly, an increase in the initial concentration of the inoculum and, secondly, the use of controlled mixed cultures produced by mixing several pure strains of microalgae.

Key-words: Microalgae. Mixed cultures. CO<sub>2</sub>. Lipids. Reproducibility.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – INFLUÊNCIA DO pH NO EQUILÍBRIO $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ EM ÁGUA ...	24
FIGURA 2 – DESENHO ESQUEMÁTICO DAS LAGOAS TIPO <i>RACEWAY</i> .....	27
FIGURA 3 – DESENHO ESQUEMÁTICO DE FOTOBIOREATOR TUBULAR .....	28
FIGURA 4 – DESENHO ESQUEMÁTICO DE FOTOBIOREATOR DE PLACAS PLANAS .....	29
FIGURA 5 – COMPARAÇÃO ENTRE SISTEMAS DE CULTIVO DE MICROALGAS .....	30
FIGURA 6 – PRODUÇÃO DE BIODIESEL DE MICROALGAS .....	45
FIGURA 7 – FLUXOGRAMA DA UNIDADE AUTOSSUSTENTÁVEL DO NPDEAS .....	53
FIGURA 8 – APARATO DE CULTIVO DOS INÓCULOS .....	56
FIGURA 9 – APARATO DE CULTIVO COM ATMOSFERA PADRÃO .....	58
FIGURA 10 – DESENHO ESQUEMÁTICO E FOTOGRAFIA DO APARATO DE CULTIVO COM ATMOSFERA ENRIQUECIDA DE $\text{CO}_2$ .....	60

FIGURA 11 – CURVA DE CRESCIMENTO DE MIX1 (1º EXPERIMENTO DA COMPARAÇÃO ENTRE CEPAS) .....	71
FIGURA 12 - VALORES DE pH AO LONGO DO CULTIVO DE MIX1 (1º EXPERIMENTO DA COMPARAÇÃO ENTRE CEPAS) .....	72
FIGURA 13 – MICROSCOPIA ÓPTICA (400X) AO FINAL DOS CULTIVOS DE MIX1 (1º EXPERIMENTO DE COMPARAÇÃO DE CEPAS MISTAS) .....	73
FIGURA 14 – CURVA DE CRESCIMENTO DE MIX2 (1º EXPERIMENTO DA COMPARAÇÃO ENTRE CEPAS) .....	74
FIGURA 15 - MÉDIA DO pH AO LONGO DO CULTIVO DE MIX2 (1º EXPERIMENTO DA COMPARAÇÃO ENTRE CEPAS) .....	75
FIGURA 16 - MICROSCOPIA ÓPTICA (400X) DOS CULTIVOS DE MIX2 (1º EXPERIMENTO DA COMPARAÇÃO ENTRE CEPAS) .....	76
FIGURA 17 – BIOMASSA SECA AO FINAL DO 1º EXPERIMENTO DA COMPARAÇÃO ENTRE CEPAS .....	76
FIGURA 18 – CURVAS DE CALIBRAÇÃO ENTRE BIOMASSA SECA E DO <sub>540</sub> PARA MIX1 E MIX2 (1º EXPERIMENTO DE COMPARAÇÃO ENTRE CEPAS) .....	77
FIGURA 19 - CURVA DE CRESCIMENTO DE MIX1 (2º EXPERIMENTO DA COMPARAÇÃO ENTRE CEPAS) .....	78

FIGURA 20 – MÉDIAS E ERRO PADRÃO DA MÉDIA PARA DO <sub>540</sub> E pH AO LONGO DO CULTIVO DE MIX2 (2º EXPERIMENTO DA COMPARAÇÃO ENTRE CEPAS) .....	79
FIGURA 21 - MICROSCOPIA ÓPTICA (400X) DOS CULTIVOS DE MIX2 (2º EXPERIMENTO DE COMPARAÇÃO DE CEPAS) .....	80
FIGURA 22 - BIOMASSA SECA <i>versus</i> DO <sub>540</sub> DOS CULTIVOS DE MIX2 NO 1º E NO 2º EXPERIMENTO .....	81
FIGURA 23 – CURVA DE CRESCIMENTO DE MIX2 EM ATMOSFERA PADRÃO .....	82
FIGURA 24 – CURVA DE CRESCIMENTO DE MIX2 EM ATMOSFERA ENRIQUECIDA COM 2% DE CO <sub>2</sub> (v/v) .....	83
FIGURA 25 – VALORES DE pH AO LONGO DO CULTIVO DA CEPA MIX2 COM E SEM AERAÇÃO ENRIQUECIDA COM CO <sub>2</sub> A 2%(v/v) .....	85
FIGURA 26 - BIOMASSA SECA <i>versus</i> DO <sub>540</sub> DOS CULTIVOS DE MIX2 COM E SEM SUPLEMENTAÇÃO DE CO <sub>2</sub> (2% v/v) NA AERAÇÃO .....	86
FIGURA 27 – CURVAS DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DE BIOMASSA SECA MÉDIA PARA CULTIVOS DE MIX2 EM ATMOSFERA PADRÃO E ENRIQUECIDA COM 2% DE CO <sub>2</sub> (v/v) .....	87
FIGURA 28 - VALORES MÉDIOS DE DO <sub>540</sub> E pH AO LONGO DO CULTIVO DE MIX2 COM ATMOSFERA A 5% (v/v) DE CO <sub>2</sub> (1º EXPERIMENTO) ...	90

FIGURA 29 - BIOMASSA SECA <i>versus</i> DO <sub>540</sub> DOS CULTIVOS DE MIX2 COM SUPLEMENTAÇÃO DE CO <sub>2</sub> A 2% (v/v) E A 5% (v/v) NA AERAÇÃO .....	91
FIGURA 30 - CURVAS DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DE BIOMASSA SECA MÉDIA PARA CULTIVOS DE MIX2 EM ATMOSFERA COM 2% (v/v) E 5% (v/v) DE CO <sub>2</sub> .....	92
FIGURA 31 – CURVA DE CRESCIMENTO DE CULTIVOS DE MIX2 COM ATMOSFERA PADRÃO E COM ATMOSFERA ENRIQUECIDA COM 5% (v/v) DE CO <sub>2</sub> (2° EXPERIMENTO) .....	93
FIGURA 32 – VALORES DE pH AO LONGO DO CULTIVO DE MIX2 COM E SEM AERAÇÃO ENRIQUECIDA COM CO <sub>2</sub> A 5% (v/v) .....	94
FIGURA 33 - BIOMASSA SECA <i>versus</i> DO <sub>540</sub> DOS CULTIVOS DE MIX2 COM E SEM SUPLEMENTAÇÃO DE CO <sub>2</sub> A 5% (v/v) NA AERAÇÃO .....	95
FIGURA 34 - CURVAS DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DE BIOMASSA SECA MÉDIA PARA CULTIVOS DE MIX2 COM ATMOSFERA PADRÃO E COM ATMOSFERA ENRIQUECIDA A 5% (v/v) DE CO <sub>2</sub> .....	96
FIGURA 35 – VELOCIDADE DE CRESCIMENTO MÉDIA DE MIX2 NA FASE LINEAR E SEU INTERVALO DE CONFIANÇA DE 90% .....	98
FIGURA 36 – CONTEÚDO DE LIPÍDEOS TOTAIS NA BIOMASSA SECA DE MIX2 E SEU ERRO PADRÃO COM INTERVALO DE CONFIANÇA DE 90% .....	100

FIGURA 37 – MÉDIAS DOS VALORES DE ERRO PADRÃO DA DO<sub>540</sub> AO LONGO  
DE CULTIVOS COM ATMOSFERA PADRÃO E ENRIQUECIDA  
(INTERVALO DE CONFIANÇA DE 99%) .....101

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	17
2.1 BIOMASSA DE MICROALGAS .....	17
2.1.1 Grupos de microalgas .....	17
2.1.2 Tipos de metabolismo de microalgas .....	18
2.1.3 Usos comerciais de microalgas .....	19
2.2 CULTIVO DE MICROALGAS .....	19
2.2.1 Parâmetros que afetam os cultivos .....	19
2.2.1.1 Luz .....	20
2.2.1.2 Nutrientes .....	21
2.2.1.3 Gases dissolvidos .....	22
2.2.1.4 pH .....	23
2.2.1.5 Temperatura .....	24
2.2.1.6 Agitação .....	25
2.2.2 Sistema de cultivo .....	26
2.2.2.1 Lagoas .....	26
2.2.2.2 Fotobiorreatores .....	27
2.2.2.3 Comparação entre lagoas e fotobiorreatores .....	29
2.2.2.4 Ambiente do sistema de cultivo .....	30
2.3 CULTIVOS ENRIQUECIDOS COM CO <sub>2</sub> .....	31
2.3.1 Princípios .....	31
2.3.2 Suplementação com CO <sub>2</sub> comercial .....	32
2.3.3 Suplementação com CO <sub>2</sub> de gás de escape .....	34
2.4 CULTIVOS MISTOS DE MICROALGAS .....	37
2.4.1 Princípios .....	37

2.4.2 Estudos do uso de cultivos mistos para a produção de lipídeos .....	38
2.5 CONTEÚDO DE LIPÍDEOS NA BIOMASSA DE MICROALGAS .....	41
2.5.1 Composição lipídica da microalga .....	41
2.5.2 A variação entre as espécies .....	42
2.5.3 A variação entre estágios do ciclo de vida .....	43
2.5.4 A variação entre condições de cultivo .....	43
2.6 BIODIESEL DE MICROALGA .....	44
2.6.1 Etapas da produção do biodiesel de microalgas .....	44
2.6.1.1 Colheita e concentração .....	44
2.6.1.2 Pré-tratamento .....	46
2.6.1.3 Extração dos lipídeos .....	46
2.6.1.4 Separação e purificação .....	47
2.6.1.5 Reação de transesterificação .....	48
2.6.1.6 Purificação do biodiesel .....	49
2.6.2 Promessas e desafios .....	49
<b>3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS .....</b>	<b>52</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>55</b>
4.1 MANUTENÇÃO DAS CEPAS E PRODUÇÃO DO INÓCULO .....	55
4.2 CULTIVOS COM ATMOSFERA PADRÃO .....	57
4.3 CULTIVOS COM ATMOSFERA ENRIQUECIDA COM CO <sub>2</sub> .....	57
4.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA .....	61
4.4.1 Densidade óptica e pH .....	61
4.4.2 Concentração de biomassa seca .....	62
4.4.3 Curva de calibração e velocidade de crescimento .....	63
4.4.4 Diversidade de espécies nos cultivos mistos .....	65
4.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS .....	65
4.6 ANÁLISE DE DADOS .....	67
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>

5.1 AVALIAÇÃO DE DUAS CEPAS MISTAS DE MICROALGAS .....	70
5.1.1 Primeiro experimento .....	70
5.1.2 Segundo experimento .....	76
5.2 COMPARAÇÃO ENTRE CULTIVOS COM ATMOSFERA PADRÃO E ENRIQUECIDA COM 2% DE CO <sub>2</sub> .....	81
5.3 COMPARAÇÃO ENTRE CULTIVOS COM ATMOSFERA PADRÃO E ENRIQUECIDA COM 5% DE CO <sub>2</sub> .....	88
5.3.1 Primeiro experimento .....	88
5.3.2 Segundo experimento .....	92
5.4 AVALIAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE E DA REPETIBILIDADE .....	96
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>102</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>105</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>108</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Obter matéria-prima abundante, acessível e, principalmente, sustentável é vital para as novas indústrias de biocombustíveis (U.S. DOE, 2010). Segundo o guia de Pesquisa & Desenvolvimento publicado em 2010 pelo Departamento de Energia dos Estados Unidos, *National Algal Biofuels Technology Roadmap*, as microalgas devem integrar o conjunto de matérias-primas utilizadas na produção de biocombustíveis, uma vez que, em condições específicas de cultivo, algumas espécies de microalgas podem acumular em sua biomassa grandes quantidades de lipídeos, que podem ser convertidos em biodiesel.

Um aspecto positivo da produção de microalgas é a possibilidade de atingir alta produtividade por hectare, ocupar terras não férteis, utilizar grande variedade de fontes de água, reciclar CO<sub>2</sub> e produzir bioprodutos (ração animal, enzimas, fertilizantes) de forma integrada, o que aumentou o interesse de pesquisadores e empreendedores ao redor do mundo na produção de biodiesel microalgal (U.S. DOE, 2010).

Para reduzir as incertezas da produção de biodiesel de microalgas em escala industrial e alcançar a comercialização, são necessárias pesquisas em toda uma cadeia de tecnologias, além do desenvolvimento de regulamentos e formação de parcerias público-privadas. Essa cadeia de tecnologias envolve diversas áreas, como: biologia das microalgas, produção das microalgas, colheita da biomassa, extração de precursores, conversão em biocombustível, aproveitamento de co-produtos, distribuição e utilização dos produtos (U.S. DOE, 2010).

O funcionamento de instalações eficientes que permitam a experimentação de novas tecnologias envolvendo a produção de biomassa e biodiesel de microalgas, bem como a Avaliação do Ciclo de Vida do biodiesel, foram destacadas pelo *National Algal Biofuels Technology Roadmap* como algumas das direções importantes de Pesquisa & Desenvolvimento (U.S. DOE, 2010). Essas direções vão

ao encontro dos objetivos do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPDEAS) da Universidade Federal do Paraná, o qual busca o desenvolvimento e aplicação da cadeia de tecnologias que possibilite a produção de biomassa e biodiesel de microalgas.

O NPDEAS busca aumentar a produtividade de biomassa e lipídeos de microalgas por meio da suplementação de CO<sub>2</sub> nos cultivos. As microalgas necessitam de CO<sub>2</sub> para realizarem a fotossíntese, porém, o fornecimento de CO<sub>2</sub> através da inserção de ar atmosférico no cultivo é limitado pela velocidade de transferência gás-líquido. Para aumentar o fornecimento de CO<sub>2</sub> e alcançar uma produção eficiente de microalgas, é necessária a inserção de atmosfera enriquecida de CO<sub>2</sub> de origem comercial ou residual (gases de escape). O melhoramento da produção de microalgas a partir de gases ricos em CO<sub>2</sub> não é uma questão simples, uma vez que a velocidade de utilização de CO<sub>2</sub> varia com a espécie de microalga, as condições de iluminação e o sistema de cultivo utilizado (U.S. DOE, 2010).

Outra estratégia utilizada pelo NPDEAS em uma tentativa de aumentar a produtividade de biomassa e lipídeos é a utilização de cultivos mistos de microalgas, ou seja, cultivos derivados de uma amostra coletada em ambiente aquático natural que possui uma mistura de espécies de microalgas. A ideia é aproximar o sistema de cultivo ao ecossistema aquático de ocorrência natural das microalgas, no qual, de acordo com um princípio da ecologia, o crescimento de uma mistura de espécies tipicamente gera uma produção de biomassa maior se comparada à produção de cultivos com uma única espécie (SMITH, 2011). O cultivo de cepas mistas de microalgas evita a necessidade de manter cultivos de uma única espécie em escala comercial livre de contaminações, que é economicamente dispendiosa (SMITH, 2011).

A presente pesquisa foi a primeira investigação em escala laboratorial realizada no NPDEAS de cultivos mistos de microalgas em atmosfera enriquecida com CO<sub>2</sub> puro. Esta pesquisa buscou comparar o crescimento de biomassa e o

conteúdo de lipídeos totais entre cultivos mistos com e sem suplementação de CO<sub>2</sub>, bem como avaliar a repetibilidade e a reprodutibilidade desses resultados.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 BIOMASSA DE MICROALGAS

#### 2.1.1 Grupos de microalgas

As microalgas são organismos microscópicos unicelulares ou multi-celulares simples, encontrados em ambientes aquáticos e realizadores de fotossíntese, ou seja, são sintetizadores primários de matéria orgânica (ALABI; TAMPIER; BIBEAU, 2009) (SINGH; GU, 2010). Possuem alta razão superfície:volume, o que possibilita, em comparação às plantas terrestres, uma mais rápida captação de nutrientes e CO<sub>2</sub>, bem como uma velocidade de crescimento celular maior (ALABI; TAMPIER; BIBEAU, 2009).

Foram descritas mais de 40.000 espécies de microalgas, as quais estão distribuídas nos mais diversos habitats e possuem exemplares que toleram os mais diversos valores de pH, salinidade e temperatura (COPLIN, 2012). Na área da produção de biomassa e de biocombustíveis, o termo “microalgas” abrange tanto as algas procarióticas, ou seja, as cianobactérias (COPLIN, 2012), quanto as algas eucarióticas, das quais os grupos mais estudados são as algas verdes (grupo *Chlorophyta*), as algas vermelhas (grupo *Rhodophyta*) e as diatomáceas (grupo *Bacillariophyta*) (SINGH; GU, 2010).

### 2.1.2 Tipos de metabolismo de microalgas

O metabolismo fotoautotrófico de microalgas é realizador de fotossíntese, ou seja, capta energia da luz, e obtém carbono de fontes inorgânicas, como CO<sub>2</sub> ou sais de carbonatos (BRENNAN; OWENDE, 2010). As informações referentes ao cultivo de microalgas abordadas nas próximas seções são referentes ao metabolismo fotoautotrófico.

Várias espécies de microalgas são capazes de outros tipos de metabolismo. No metabolismo heterotrófico, não é realizada a fotossíntese, mas a energia e o carbono são obtidos de compostos orgânicos, como a glicose, a partir da realização de respiração aeróbica. Como o crescimento neste caso não depende da luz, os cultivos são realizados em biorreatores agitados e com pequena razão superfície:volume, o que simplifica o aumento da escala de produção (BRENNAN; OWENDE, 2010). No metabolismo mixotrófico ocorre a união dos metabolismos fotoautotrófico e heterotrófico. Nesse caso, as microalgas possuem a habilidade de realizar fotossíntese, mas também podem obter energia a partir de compostos orgânicos. Em uma produção mixotrófica de microalgas, o crescimento é afetado não somente pela disponibilidade de luz, mas também pela suplementação do meio com uma fonte orgânica de carbono. Nesse tipo de crescimento, a adição de uma fonte orgânica de carbono durante o período iluminado pode diminuir a inibição do crescimento causado por uma alta incidência luminosa. Sua adição no período não iluminado pode diminuir a perda de biomassa nesse período (BRENNAN; OWENDE, 2010).

### 2.1.3 Usos comerciais de microalgas

As microalgas são utilizadas atualmente na produção em escala comercial de suplementos alimentares, de rações para larvas de peixes e mariscos, e na produção de químicos, produtos farmacêuticos e pigmentos (ALABI; TAMPIER; BIBEAU, 2009). Também são utilizadas na produção de biofertilizantes e no tratamento biológico de efluentes (BECKER, 1994).

Nas décadas de 80 e 90, grandes pesquisas foram realizadas na área do cultivo de biomassa de microalgas aplicada à produção de biocombustíveis em larga escala (ALABI; TAMPIER; BIBEAU, 2009). Essas pesquisas demonstraram que a produção da biomassa e a aplicação em biocombustíveis eram possíveis tecnicamente, porém a falta da viabilidade econômica causou a descontinuação de muitas pesquisas. Recentemente, resurgiram o interesse e as pesquisas na área de cultivo de microalgas para produção de bioenergia, pois aumentaram as preocupações com o aumento do custo dos combustíveis fósseis, com a diminuição das suas fontes, com os possíveis impactos das emissões de CO<sub>2</sub> no clima do planeta e com a insuficiência na produção das matérias-primas convencionais para biocombustíveis (ALABI; TAMPIER; BIBEAU, 2009).

## 2.2 CULTIVO DE MICROALGAS

### 2.2.1 Parâmetros que afetam os cultivos

Os parâmetros de cultivo mais importantes que afetam o crescimento das microalgas e que serão descritos a seguir são: a luz, os nutrientes, os gases dissolvidos, o pH, a temperatura e a agitação. As faixas de tolerância e os pontos

ótimos dos parâmetros variam de acordo com a espécie. Além disso, esses parâmetros são interdependentes, ou seja, o ponto ótimo de um parâmetro em um conjunto de condições ambientais pode não ser o mesmo em outro conjunto (BARSANTI; GUALTIERI, 2006).

#### 2.2.1.1 Luz

A luz é a fonte de energia para os cultivos fotoautotróficos de microalgas, e sua disponibilidade e intensidade afetam o crescimento. A velocidade de fotossíntese e de crescimento das células aumenta com o aumento da intensidade luminosa até que seja alcançado o ponto de saturação. A partir desse ponto, o aumento da intensidade luminosa não aumenta a velocidade de crescimento e pode causar fotoinibição. Na fotoinibição ocorrem danos aos receptores de luz das células, causando a diminuição das velocidades de fotossíntese e de crescimento (ALABI; TAMPIER; BIBEAU, 2009).

Os receptores de luz das microalgas são muito eficientes e, devido a essa eficiência, em cultivos com grande concentração de células, quase toda luz útil é absorvida por uma fina camada de células na superfície, enquanto o resto é sombreado e recebe luz insuficiente (ALABI; TAMPIER; BIBEAU, 2009). A espessura ótima de um cultivo para o aproveitamento da luz está entre 2 e 4 cm (COPLIN, 2012).

Pode-se diminuir o sombreamento das células ao se diminuir a espessura da camada líquida dos cultivos, permitindo uma maior penetração da luz. Já a ocorrência da fotoinibição diminui com o aumento da densidade de células no cultivo, o que permite a ocorrência do sombreamento mútuo. A agitação constante contribui para a minimização desses dois problemas, pois as células ficam

constantemente transitando pelas regiões mais e menos iluminadas (ALABI; TAMPIER; BIBEAU, 2009).

#### 2.2.1.2 Nutrientes

O meio de cultivo deve fornecer componentes a serem usados no crescimento das células, como macronutrientes inorgânicos e micronutrientes inorgânicos e orgânicos. Porém, poucos estudos foram publicados sobre os níveis ótimos de nutrientes para a produção em larga escala de biomassa de microalgas (ALABI; TAMPIER; BIBEAU, 2009).

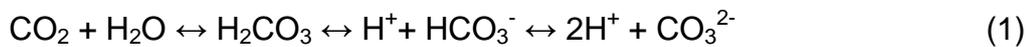
Os sais utilizados para fornecer os macronutrientes, nitrogênio, fósforo e silício (para microalgas do grupo das diatomáceas), e os principais íons,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{SO}_4^{2-}$ , geralmente apresentam alta solubilidade, baixa toxicidade e são adicionados no meio de cultivo em concentrações maiores que as necessárias para evitar limitação do crescimento por sua falta (ANDERSEN, 2005) (ALABI; TAMPIER; BIBEAU, 2009).

Também é necessária a adição de micronutrientes inorgânicos, como íons metálicos de ferro, manganês, zinco, cobalto, cobre, molibdênio e selênio, alguns dos quais são tóxicos em altas concentrações. As vitaminas  $\text{B}_1$ ,  $\text{B}_{12}$  e H são os micronutrientes orgânicos mais comumente utilizados no cultivo de microalgas (ANDERSEN, 2005).

### 2.2.1.3 Gases dissolvidos

Nos cultivos fotoautotróficos, as microalgas necessitam de uma fonte de carbono inorgânico para realização da fotossíntese, adicionada na forma de sais de carbonato ou bicarbonato dissolvidos no meio ou, mais comumente, na forma de CO<sub>2</sub> de uma fase gasosa em contato com o meio líquido. Apesar de a agitação melhorar a transferência do CO<sub>2</sub> do ar atmosférico para o cultivo (ANDERSEN, 2005), a concentração de CO<sub>2</sub> no ar é muito baixa (0,04%) (MORAIS; COSTA, 2008), originando uma concentração de CO<sub>2</sub> dissolvido no meio também baixa, e que frequentemente limita o crescimento. Portanto, para alcançar uma alta produtividade de biomassa, é comum suplementar CO<sub>2</sub> ao meio através do fornecimento de ar enriquecido com CO<sub>2</sub> a concentrações entre 0,2 e 5% (v/v) (BECKER, 1994) (ANDERSEN, 2005) (ALABI; TAMPIER; BIBEAU, 2009).

O CO<sub>2</sub> em água pode se modificar para as seguintes formas:



e a razão entre as concentrações de cada forma varia de acordo com o pH, a temperatura e a concentração de sais no meio (BECKER, 1994). Portanto, quando ar enriquecido com CO<sub>2</sub> é utilizado, cuidados devem ser tomados para que a dissolução de CO<sub>2</sub> em água e a consequente liberação de íons H<sup>+</sup> não abaixe o pH do cultivo a ponto de alcançar valores que prejudiquem o crescimento das microalgas (ANDERSEN, 2005) (ALABI; TAMPIER; BIBEAU, 2009).

Tão importante quanto a inserção de CO<sub>2</sub> é a retirada de O<sub>2</sub>, pois o O<sub>2</sub> produzido durante a fotossíntese pode permanecer dissolvido no cultivo até alcançar níveis que causam danos foto-oxidativos aos centros reacionais de clorofila, inibindo a fotossíntese e reduzindo a produtividade de biomassa. Níveis de O<sub>2</sub> limitantes não são comuns em cultivos agitados e com grande interface com a atmosfera, devido à

facilidade de remoção de  $O_2$  para a fase gasosa. Por outro lado, em sistemas fechados, como os fotobiorreatores, câmaras para trocas gasosas são necessárias. Em cultivos aerados continuamente com ar atmosférico ou com mistura de ar atmosférico e  $CO_2$ , o  $O_2$  dissolvido entra em equilíbrio com o ar inserido, alcançando níveis não limitantes (ALABI; TAMPIER; BIBEAU, 2009).

#### 2.2.1.4 pH

Os valores de pH de um cultivo variam de acordo com as ações do metabolismo microbiano. A realização da fotossíntese pelas microalgas causa o aumento do pH do meio, pois o aparato fotossintético transporta íons  $OH^-$  para o exterior da célula e íons  $H^+$  para o interior (LOPES, 2007). O aumento da concentração celular em cultivos pode fazer com que a velocidade de utilização de carbono pelas células exceda a velocidade em que o  $CO_2$  é fornecido para o meio, causando a diminuição do  $CO_2$  dissolvido e consequente aumento do pH no meio. O consumo de nitrato pelas microalgas também causa um aumento do pH do meio (ANDERSEN, 2005).

Valores de pH favoráveis para a maioria dos cultivos estão na faixa entre 7 e 9 (BARSANTI; GUALTIERI, 2006). Somando o baixo poder tamponante dos meios tipicamente utilizados ao metabolismo fotossintético de cultivos com alta densidade celular, a ausência de um sistema de controle do pH pode resultar num aumento do pH do cultivo para valores maiores que 9, limitando o crescimento e alterando o equilíbrio de  $CO_2$ ,  $HCO_3^-$  e  $CO_3^{2-}$  dissolvidos em água (FIGURA 1) (BECKER, 1994) (BARSANTI; GUALTIERI, 2006). O pH do cultivo deve ser controlado para estar dentro da faixa ótima da espécie utilizada e permitir a assimilação do carbono na forma de  $CO_2$  e  $HCO_3^-$  (BECKER, 1994).

A inserção de  $\text{CO}_2$  no meio de cultivo é uma alternativa utilizada para diminuir o pH do meio e prevenir mudanças bruscas no pH devido à formação do sistema tampão  $\text{CO}_2$ - $\text{HCO}_3^-$  (BARSANTI; GUALTIERI, 2006).

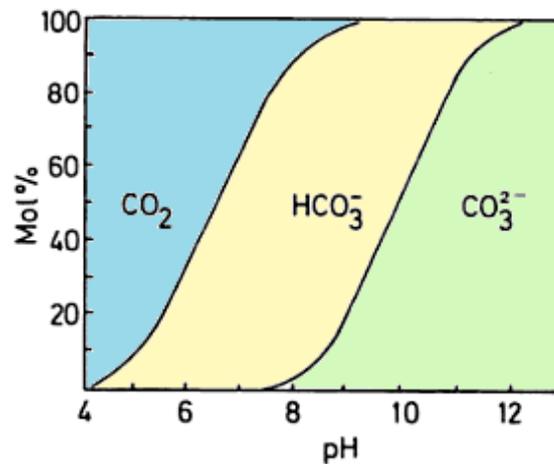


FIGURA 1 – INFLUÊNCIA DO pH NO EQUILÍBRIO  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$  EM ÁGUA  
 FONTE: BECKER, 1994.

#### 2.2.1.5 Temperatura

Geralmente, a temperatura ótima para o crescimento de microalgas situa-se na faixa entre 25 e 35°C (LOPES, 2007). Enquanto temperaturas abaixo do ponto ótimo geralmente não causam morte celular, exceto em condições de congelamento, temperaturas acima do ponto ótimo geralmente causam a morte celular (ALABI; TAMPIER; BIBEAU, 2009).

O controle da temperatura é um desafio importante para os cultivos expostos diretamente às condições meteorológicas, como os cultivos realizados em ambiente externo. A temperatura desses cultivos é influenciada pela temperatura atmosférica, pela irradiação solar e pela umidade do ar, podendo variar mais de 20°C em um dia.

Geralmente, pela manhã ocorre o aumento da intensidade da luz solar e consequente aumento da temperatura atmosférica, porém a temperatura ótima do cultivo pode ser alcançada apenas após o meio dia, uma vez que a variação de temperatura em grandes volumes de água ocorre mais lentamente do que a variação na temperatura atmosférica. Essa falta de sincronização dos fatores ambientais impede que se mantenha uma alta produtividade de biomassa durante o dia em cultivos realizados em ambientes externos (ALABI; TAMPIER; BIBEAU, 2009).

#### 2.2.1.6 Agitação

A agitação do cultivo de microalgas previne a sedimentação das células, previne a formação de gradientes ao longo do meio líquido, como gradientes de nutrientes, pH e temperatura, e minimiza os efeitos do gradiente de luminosidade. A agitação também melhora as trocas gasosas entre o ar e o meio de cultivo (SILVA-BENAVIDES; TORZILLO, 2012) (BARSANTI; GUALTIERI, 2006).

Tipicamente, a agitação do meio de cultivo é realizada por aeração, movimentação de pás ou bombeamento do líquido (BARSANTI; GUALTIERI, 2006), porém o stress causado pela tensão de cisalhamento durante o processo pode atrapalhar o cultivo de células frágeis, como as microalgas filamentosas. Em cultivos de clorófitas e diatomáceas, a intensidade de agitação escolhida pode favorecer o seu crescimento, e remover quase totalmente a contaminação por cianobactérias filamentosas que pode ocorrer em cultivos abertos (SILVA-BENAVIDES; TORZILLO, 2012).

### 2.2.2 Sistema de cultivo

O sistema ideal de cultivo de microalgas para a indústria deve, a um menor custo possível, manter a produtividade de biomassa e de produto durante o escalonamento do processo da escala laboratorial para a comercial, e maximizar a robustez do sistema, no sentido de diminuir perdas ou instabilidade do cultivo por causas biológicas ou físico-químicas. Existem dois sistemas de cultivo de microalgas, o sistema aberto realizado em lagoas, e o sistema fechado realizado em fotobiorreatores (COPLIN, 2012).

#### 2.2.2.1 Lagoas

O sistema de lagoas abertas é utilizado na maioria dos processos de produção de microalgas em escala comercial, devido a seu menor custo e a sua maior facilidade de construção em larga escala, quando comparado ao sistema de fotobiorreatores. Em sistemas abertos, é preferível produzir biomassa de espécies que possuem a habilidade de se desenvolver em ambientes com características seletivas, como alta salinidade, alto pH ou alta concentração de bicarbonato, reduzindo a população de organismos contaminantes como protozoários ou outras espécies de microalgas (COPLIN, 2012).

Os dois formatos mais comuns de lagoas abertas são as lagoas redondas ou circulares e as lagoas do tipo *raceway*. As lagoas circulares possuem de 30 a 70 cm de profundidade e são agitadas através de braços giratórios instalados no centro, porém, a eficiência da mistura é baixa em sistemas com diâmetro maior que 50 m. As lagoas do tipo *raceway* são compostas por canais como aqueles exemplificados na FIGURA 2, possuem de 15 a 40 cm de profundidade e rodas de pás ou bombas

de ar comprimido para manter o fluxo de líquido através dos canais e melhorar a transferência de  $\text{CO}_2$  para o meio líquido (COPLIN, 2012).

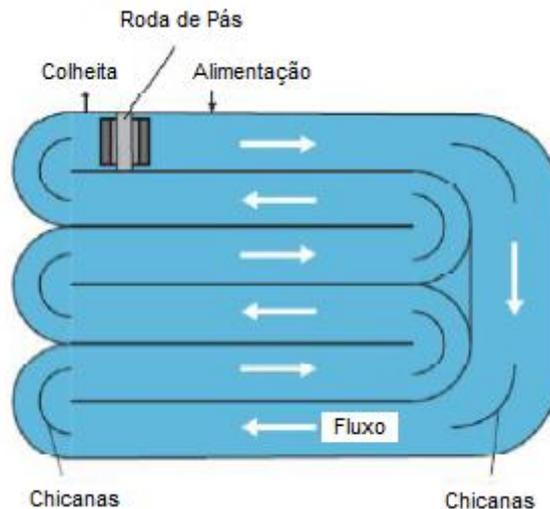


FIGURA 2 – DESENHO ESQUEMÁTICO DAS LAGOAS TIPO *RACEWAY*

FONTE: COPLIN, 2012.

#### 2.2.2.2 Fotobiorreatores

Os fotobiorreatores são recipientes transparentes com grande razão superfície/volume, permitindo ótimo aproveitamento da luz. Os fotobiorreatores tubulares e de placas planas são os tipos mais comumente utilizados (COPLIN, 2012).

Os fotobiorreatores tubulares geralmente apresentam duas partes, como descrito na FIGURA 3, uma onde ocorre a captação da luz e outra onde ocorre a transferência gás-líquido de  $\text{CO}_2$  e  $\text{O}_2$  (BRENNAN; OWENDE, 2010). A tubulação desses fotobiorreatores pode apresentar diversas configurações, como horizontal, vertical, helicoidal e triangular. A adesão de microalgas às paredes e os gradientes

de pH,  $O_2$  e  $CO_2$  ao longo da tubulação são algumas desvantagens a serem superadas (COPLIN, 2012).

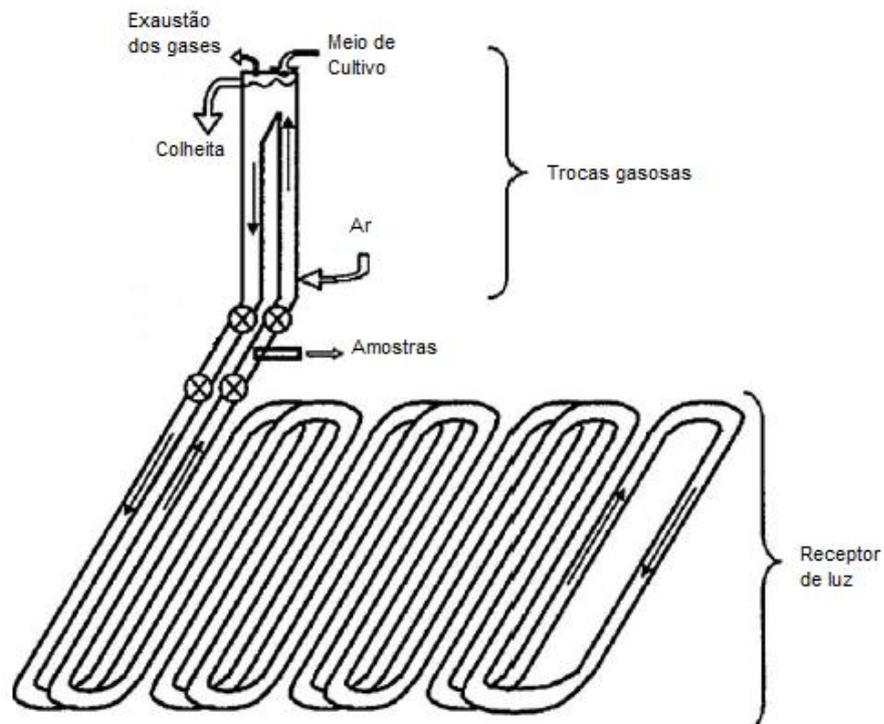


FIGURA 3 – DESENHO ESQUEMÁTICO DE FOTOBIORREATOR TUBULAR  
 FONTE: BRENNAN; OWENDE, 2010.

Os fotobiorreatores de placas planas são recipientes retangulares (FIGURA 4), usualmente verticais ou inclinados, com 1 a 30 cm de espessura e agitação por inserção de gases no fundo do recipiente (COPLIN, 2012).

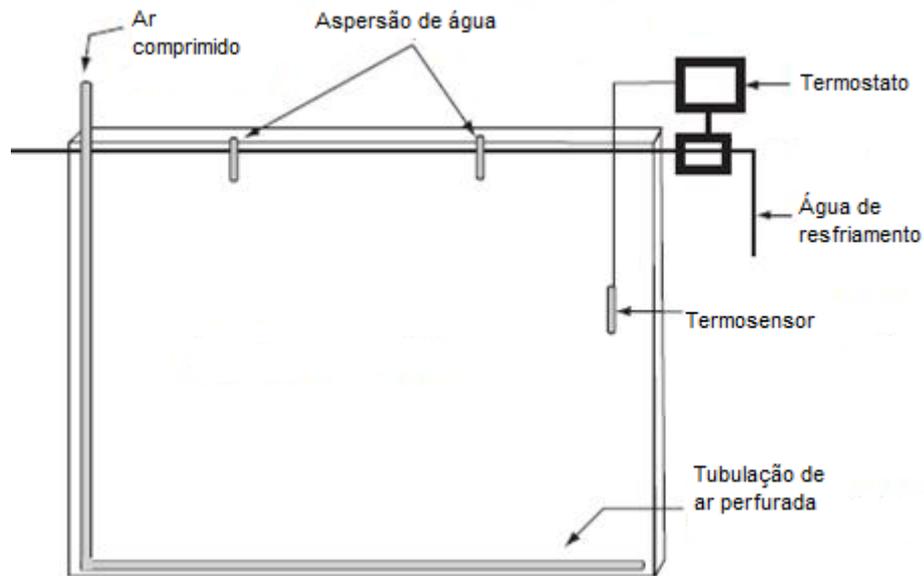


FIGURA 4 – DESENHO ESQUEMÁTICO DE FOTOBIORREATOR DE PLACAS PLANAS

FONTE: OILGAE, 2013.

### 2.2.2.3 Comparação entre lagoas e fotobiorreatores

O cultivo de microalgas em fotobiorreatores apresenta vantagens sobre o cultivo em lagoas, como uma produtividade mais alta e estável e um nível mais baixo de contaminação. Porém, o alto custo de construção e manutenção dos fotobiorreatores é uma desvantagem em relação às lagoas (COPLIN, 2012). A FIGURA 5 compara as lagoas e os fotobiorreatores, levando em conta essas e outras características.

<b>Parâmetros</b>	<b>Sistemas Abertos (Lagoas)</b>	<b>Sistemas Fechados (Fotobiorreatores)</b>
<b>Custo</b>	menor	maior
<b>Energia de bombeamento</b>	menor	maior
<b>Facilidade no aumento de escala</b>	maior	menor
<b>Perda de água por evaporação</b>	maior	menor
<b>Área requerida</b>	maior	menor
<b>Risco de contaminação</b>	maior	menor
<b>Produtividade</b>	menor	maior
<b>Estabilidade do cultivo</b>	menor	maior
<b>Perda de CO<sub>2</sub> inserido</b>	maior	menor

FIGURA 5 – COMPARAÇÃO ENTRE SISTEMAS DE CULTIVO DE MICROALGAS  
 FONTE: COPLIN, 2012.

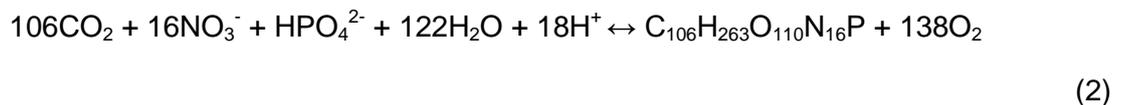
#### 2.2.2.4 Ambiente do sistema de cultivo

Os cultivos de microalgas podem ser realizados em ambientes externos (*outdoor*), utilizando o sistema de lagoas ou de fotobiorreatores, ou em ambientes internos (*indoor*), utilizando geralmente o sistema de fotobiorreatores. Nos cultivos *outdoor*, as células estão expostas às variações de temperatura e de intensidade luminosa de acordo com as condições meteorológicas. Nesse sistema, são comuns grandes variações nas velocidades de crescimento, além da maior susceptibilidade às espécies invasoras quando comparado ao sistema *indoor*. Em cultivos *indoor*, as condições de operação podem ser mais bem controladas em comparação aos cultivos *outdoor*, porém o custo de operação é mais alto (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

## 2.3 CULTIVOS ENRIQUECIDOS COM CO<sub>2</sub>

### 2.3.1 Princípios

Apesar da composição elementar das células de microalgas variar de acordo com as condições de crescimento e com a espécie, a equação estequiométrica para geração de biomassa pela via fotoautotrófica pode ser, em média, descrita como (COPLIN, 2012):



Portanto, a razão molar dos principais nutrientes (carbono, nitrogênio e fósforo) para geração de um mol de biomassa pode ser considerada em média como C106:N16:P1. A partir dessa razão, observa-se a grande demanda de carbono na produção de microalgas, aproximadamente 50% em massa da biomassa seca, e a importância do seu fornecimento para o meio líquido, seja pela transferência de CO<sub>2</sub> através de interface gás-líquido ou pela adição de sais de bicarbonato (COPLIN, 2012). Em uma aproximação grosseira, 100 t de biomassa microalgal seca capta 183 t de CO<sub>2</sub> (DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2011).

A concentração de CO<sub>2</sub> no ar atmosférico é tão baixa que permite a transferência de uma quantidade de CO<sub>2</sub> para o meio líquido de cultivo também baixa, o que frequentemente limita o crescimento das microalgas. Portanto, a suplementação do cultivo com uma atmosfera enriquecida com CO<sub>2</sub> é uma prática amplamente utilizada para aumentar as velocidades de crescimento de biomassa (COPLIN, 2012).

A suplementação de CO<sub>2</sub> em lagoas rasas geralmente é realizada utilizando-se pedras porosas ou tubos de PVC perfurados posicionados no fundo para inserção de atmosfera rica em CO<sub>2</sub>. Porém, com esses métodos, as bolhas de gás possuem um baixo tempo de residência, e os gases são pouco aproveitados pelos microrganismos, o que resulta em uma grande perda de CO<sub>2</sub> para a atmosfera (COPLIN, 2012). A diminuição do tamanho das bolhas é uma alternativa para facilitar a difusão e melhorar o aproveitamento desse gás (ANDERSEN, 2005). Porém, é importante lembrar que a velocidade de utilização de CO<sub>2</sub> não depende apenas do tamanho e do tempo de permanência das bolhas no cultivo, mas também depende da espécie de microalga utilizada, da sua velocidade de crescimento e da disponibilidade de luz (U.S. DOE, 2010).

Em fotobiorreatores, a perda do CO<sub>2</sub> suplementado para a atmosfera é afetada pelo *design* e pelo modo de operação. Por exemplo, fotobiorreatores de placas planas geralmente possuem uma coluna para passagem de gases mais curta se comparado aos fotobiorreatores tubulares, e conseqüentemente apresentam uma maior perda de CO<sub>2</sub>. Essa perda pode ser minimizada ao se reutilizar o efluente gasoso do fotobiorreator na aeração do cultivo, porém um efluente com alta concentração de O<sub>2</sub> pode inibir o crescimento das microalgas (COPLIN, 2012).

### 2.3.2 Suplementação com CO<sub>2</sub> comercial

A utilização de aeração rica em CO<sub>2</sub>, obtida pela mistura de ar atmosférico com CO<sub>2</sub> puro comercial, é uma prática comum em cultivos de escala laboratorial e é aplicada com a finalidade de aumentar a velocidade de crescimento das microalgas. Alguns exemplos do uso da suplementação de CO<sub>2</sub> comercial e seus resultados são descritos a seguir.

Kaewkannetra, Enmak e Chiu (2012) investigaram o efeito do aumento da concentração de CO<sub>2</sub> puro na corrente de aeração sobre o crescimento da microalga *Scenedesmus obliquus*. Os cultivos foram realizados em fotobiorreator tubular vertical de 2 L de volume útil, com aeração a 600 mL.min<sup>-1</sup>. Nos cultivos com aeração por ar atmosférico, os autores obtiveram uma concentração de biomassa de 1,5 g.L<sup>-1</sup> após 15 dias de cultivo. O aumento da concentração de CO<sub>2</sub> na aeração para 5% (v/v) não aumentou a produção de biomassa nesse período. Porém, o aumento da concentração de CO<sub>2</sub> para 15% (v/v) aumentou a produção de biomassa para 2,3 g.L<sup>-1</sup> ao final dos 15 dias. O aumento da concentração de CO<sub>2</sub> para valores maiores de 15% (v/v) causou queda na produção de biomassa (KAEWKANNETRA; ENMAK; CHIU, 2012).

À medida que se aumenta a concentração de CO<sub>2</sub> até um ponto ótimo, o crescimento é estimulado pela maior disponibilidade de carbono. Porém, o aumento da concentração de CO<sub>2</sub> após o ponto ótimo faz com que o CO<sub>2</sub> não utilizado pelas células seja convertido em H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, que então se dissocia, diminuindo o pH do meio para valores que inibem o crescimento (KAEWKANNETRA; ENMAK; CHIU, 2012). Para isolar o efeito da suplementação de CO<sub>2</sub> do efeito da diminuição do pH no crescimento, os autores deveriam ter utilizado um sistema de controle de pH em conjunto com a suplementação. A influência isolada da concentração de CO<sub>2</sub> poderia originar um ponto ótimo diferente do encontrado.

Não é sempre que o aumento da concentração de CO<sub>2</sub> na aeração aumenta o crescimento de microalgas. Por exemplo, nos cultivos de Morais e Costa (2008), realizados em escala laboratorial (volume útil de 1,8 L) com a microalga *Scenedesmus obliquus*, foram aplicadas duas condições de aeração, uma com ar atmosférico (0,038% de CO<sub>2</sub> v/v) e outra com ar atmosférico misturado ao CO<sub>2</sub> puro, originando uma concentração de CO<sub>2</sub> de 6% (v/v). A modificação na concentração de CO<sub>2</sub> da aeração de 0,038% para 6% não causou diferença na média da

concentração de biomassa máxima e na média da velocidade específica máxima de crescimento (MORAIS; COSTA, 2008).

A produção de biomassa de cultivos submetidos a diferentes concentrações de CO<sub>2</sub> na aeração muda de acordo com a densidade celular inicial dos cultivos, como demonstrado por Chiu *et al.* (2008). Os autores realizaram cultivos com *Chlorella* sp. em fotobiorreator tubular vertical de 800 mL, com iluminação contínua e aeração contínua a 0,25 vvm. Foram utilizadas duas condições para a densidade inicial de células no reator ( $8 \times 10^5$  e  $8 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>) e cinco condições de aeração (ar atmosférico; misturas de ar com CO<sub>2</sub> puro a 2, 5, 10 e 15% v/v) (CHIU,S. *et al.*, 2008). Ao final de 8 dias, os cultivos com baixa densidade celular inicial alcançaram uma concentração de biomassa de 0,537 g.L<sup>-1</sup> com aeração sem enriquecimento e de 1,211 g.L<sup>-1</sup> com aeração com 2% de CO<sub>2</sub>, enquanto que as concentrações de 5, 10 e 15% causaram a inibição quase completa do crescimento. Nos cultivos com alta densidade celular inicial, o enriquecimento a 2% de CO<sub>2</sub> continuou originando uma produção maior se comparado ao ar atmosférico (concentrações de biomassa de 1,445 g.L<sup>-1</sup> e 0,682 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente). Porém, nessa condição com inóculo mais concentrado, a aeração com 5% de CO<sub>2</sub> não mais inibiu o crescimento, bem como originou uma concentração de biomassa (0,899 g.L<sup>-1</sup>) maior do que a alcançada pela aeração com ar atmosférico. As condições de 10 e 15% de CO<sub>2</sub> continuaram inibindo o crescimento (CHIU,S. *et al.*, 2008).

### 2.3.3 Suplementação com CO<sub>2</sub> de gás de escape

Em escala comercial de produção de biomassa de microalgas, o enriquecimento da aeração com CO<sub>2</sub> puro comercial é uma prática cara que pode inviabilizar economicamente a produção. A utilização de gases de escape industriais

como fonte enriquecida de CO<sub>2</sub> surge como uma alternativa para diminuir os custos da suplementação de carbono (U.S. DOE, 2010).

Um exemplo de gás de escape que pode ser utilizado nos cultivos de microalgas é o gás liberado por usinas geradoras de energia movidas a combustíveis fósseis, o qual tipicamente possui uma concentração de CO<sub>2</sub> entre 5 e 15% (v/v). Alguns outros exemplos de fontes estacionárias emissoras de CO<sub>2</sub> são as indústrias de cimento, as refinarias de combustíveis fósseis e as indústrias de etanol (U.S. DOE, 2010).

Na literatura, é pequeno o número de experimentos que utilizaram gases de escape reais na aeração de cultivos de microalgas, quando comparado ao número de experimentos com gases de escape simulados (misturas de ar atmosférico com CO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub> e SO<sub>x</sub>). Um exemplo de experimento com gás de escape real são os cultivos realizados por Douskova *et al.* (2009), os quais utilizaram a microalga *Chlorella vulgaris* em fotobiorreatores do tipo coluna de bolhas (300 mL de volume útil) com vazão de aeração controlada (15 L.h<sup>-1</sup>) e iluminação contínua. A velocidade de crescimento de biomassa obtida quando foi utilizado gás de escape de usina de incineração de lixo (2,5 g.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>) foi maior se comparada à velocidade de crescimento obtida quando usado ar atmosférico misturado com CO<sub>2</sub> puro até concentração de 11% v/v (1,7 g.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>), ou seja, a mesma concentração encontrada no gás de escape. Os autores sugeriram que o crescimento foi maior com gás de escape devido a uma concentração de O<sub>2</sub> inferior (8-10% O<sub>2</sub> v/v) à existente no ar enriquecido com 11% de CO<sub>2</sub> (19% O<sub>2</sub> v/v) (DOUSKOVA, I. *et al.*, 2009).

Bons resultados também foram obtidos por Chiu *et al.* (2011) ao utilizar gás de escape real em cultivos de microalgas. Os autores compararam o crescimento de *Chlorella* sp. entre cultivos que receberam como aeração gás de escape de forno de coque (25% CO<sub>2</sub>; 4% O<sub>2</sub>; 80 ppm NO; 90 ppm SO<sub>2</sub>) ou ar atmosférico enriquecido com CO<sub>2</sub> puro a diferentes concentrações (2%, 10% e 25% v/v). Foram utilizados

reatores de 800 mL com iluminação contínua e vazão de aeração controlada (0,05 vvm). Quanto maior a concentração de CO<sub>2</sub> puro utilizada na aeração, menor a concentração máxima de biomassa obtida (2% - 1,67 g.L<sup>-1</sup>; 10% - 1,50 g.L<sup>-1</sup>; 25% - 1,32 g.L<sup>-1</sup>). Porém, a concentração máxima de biomassa no cultivo com gás de escape (2,40 g.L<sup>-1</sup>) superou o valor encontrado no cultivo com CO<sub>2</sub> puro na mesma concentração do gás de escape (25% v/v), não ocorrendo inibição de crescimento, e sim um estímulo (CHIU, S. *et al.*, 2011). Os autores não levantaram hipóteses para esse estímulo, o qual pode ter ocorrido por uma concentração menor de O<sub>2</sub> no gás de escape (DOUSKOVA, I. *et al.*, 2009) ou pelo aproveitamento de NO<sub>x</sub> do gás de escape como fonte de nitrogênio (MORAIS; COSTA, 2008).

Mesmo que seja demonstrado que determinado gás de escape utilizado como aeração estimula o crescimento, a captura, a concentração, o transporte por longas distâncias e a distribuição do gás de escape das indústrias emissoras para os cultivos são processos caros, tornando-se fatores limitantes para que ocorra o aproveitamento desses efluentes gasosos. Para evitar esses custos, o ideal é a instalação da produção de microalgas próxima à indústria emissora de CO<sub>2</sub>, a qual pode oferecer água de resfriamento a ser reutilizada no controle de temperatura dos cultivos, e águas residuárias que podem ser aproveitadas na produção dos meios de cultivos. Porém, nem sempre há disponibilidade de terras e água para os sistemas de cultivo nas proximidades das indústrias emissoras de CO<sub>2</sub> (U.S. DOE, 2010).

## 2.4 CULTIVOS MISTOS DE MICROALGAS

### 2.4.1 Princípios

A utilização de uma variedade de espécies de microalgas em um único cultivo, o que origina um cultivo misto ou co-cultivo, pode trazer vantagens se comparado ao cultivo de espécie única, como a maior produção de biomassa e lipídeos. A maior produção de biomassa em cultivos com mistura de espécies de ocorrência natural deve-se a uma melhor utilização de recursos, como a energia solar e os nutrientes. Apesar das potenciais vantagens do cultivo misto de microalgas, há pouca informação na literatura disponível sobre esse assunto (COPLIN, 2012).

A maioria dos estudos sobre o uso de cultivos mistos de microalgas é aplicada à área de tratamento biológico de águas residuárias, ou seja, remoção de compostos orgânicos e inorgânicos por esses microrganismos que os utilizam como nutrientes para produção de sua biomassa. Um exemplo são os cultivos mistos contendo as microalgas *Rhodospseudomonas sphaeroides* e *Chlorella sorokiniana*, que conseguem remover simultaneamente propionato, amônia, nitrato e fosfato de água residuária, enquanto a monocultura de cada uma dessas espécies não consegue realizar essa remoção simultânea (SILVA-BENAVIDES; TORZILLO, 2012). A utilização de culturas mistas contendo espécies com diferentes características metabólicas (fotoautotrófica, mixotrófica, heterotrófica) proporciona a formação de associações simbióticas com grande potencial para remover matéria orgânica, fosfatos e nitratos de águas residuais (DEVI; SUBHASH; MOHAN, 2012).

De acordo com Mohan *et al.* (2011), os ecossistemas aquáticos envolvidos em processos de tratamento de efluentes são potenciais reservatórios de matéria prima para a indústria de bioenergia, originando o que eles chamaram de “biodiesel

de aproveitamento”. A ideia seria aproveitar, na indústria do biodiesel, a biomassa mista de microrganismos fotossintetizantes já existentes no sistema de tratamento de efluentes. Alguns estudos unem o tratamento de águas residuárias ao aproveitamento da biomassa de microalgas gerada na extração de lipídeos e conversão em biodiesel, e estão descritos a seguir.

#### 2.4.2 Estudos do uso de cultivos mistos para a produção de lipídeos

Experimentos realizados por Silva-Benavides e Torzillo (2012) avaliaram a produção de biomassa e a remoção de nitrogênio e fósforo de efluente municipal realizadas por cultivos da microalga *Chlorella vulgaris* e da cianobactéria *Planktothrix isothrix* em forma monoalgal e misto, com ou sem agitação. Os cultivos foram realizados em escala laboratorial e o inóculo para o cultivo misto foi obtido através da mistura de células de cultivos monoalgais (SILVA-BENAVIDES; TORZILLO, 2012).

Ocorreram diferenças significativas entre as produtividades volumétricas de biomassa dos cultivos monoalgais e mistos. A maior produtividade volumétrica entre os cultivos monoalgais de *Chlorella vulgaris* foi obtida com agitação ( $54,18 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ), enquanto que a maior produtividade entre os cultivos monoalgais de *Planktothrix isothrix* foi obtida sem agitação ( $50,00 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ). O melhor resultado dentre os experimentos foi obtido no cultivo misto sem agitação ( $65,54 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ). Os autores sugerem que a maior parte da biomassa produzida nesse cultivo misto foi da cianobactéria, a qual é beneficiada por uma maior exposição à luz em cultivos sem agitação, uma vez que possui vacúolos para gás e consequente capacidade de flutuar (SILVA-BENAVIDES; TORZILLO, 2012). Porém essa sugestão não foi confirmada com dados experimentais de contagem celular. A utilização simultânea

desses dois organismos colonizadores de profundidades diferentes da coluna de água residuária proporcionou um cultivo econômico, pois foi possível alcançar bons resultados de produção de biomassa microalgal sem agitação, que é um processo custoso em larga escala (SILVA-BENAVIDES; TORZILLO, 2012).

Mohan *et al.* (2011) avaliaram o potencial de produção de biodiesel da biomassa de microalgas originárias de ecossistemas aquáticos, as quais cresceram em um sistema de cultivo econômico: com iluminação natural, com CO<sub>2</sub> disponível na atmosfera e com nutrientes presentes em águas residuárias. Amostras de culturas mistas de microalgas foram coletadas em 5 ecossistemas aquáticos, dentro ou próximos da cidade de Hyderabad na Índia, que recebem efluentes domésticos ou industriais. Essas amostras foram lavadas e utilizadas como inóculo em reservatórios abertos de 40 L de volume útil (MOHAN. *et al.*, 2011).

Foi observada grande variação no conteúdo de lipídeos da biomassa seca (26,90% a 4,67%) obtidos dos cultivos com diferentes origens de inóculo, ou seja, a natureza do ecossistema aquático influencia na diversidade de espécies de microalgas presentes, que, por sua vez, influencia a capacidade de produzir lipídeos em um cultivo. Os cultivos que receberam células de microalgas coletadas em ecossistemas de água estagnada e com despejo de esgoto doméstico alcançaram um maior acúmulo de lipídeos se comparado aos cultivos com células de ecossistemas de água corrente ou que recebiam esgoto industrial. O maior conteúdo de lipídeos (26,90%) foi alcançado no cultivo com inóculo coletado na lagoa Nacharam Cheruvu que recebia esgoto doméstico. Nesse cultivo, as espécies identificadas são conhecidas pela sua capacidade de acúmulo de lipídeos, como: *Scenedesmus dimorphus*, *Scenedesmus quadricanda*, *Chlorella vulgaris*, *Euglena gracilis* e *Spirogyra* sp (MOHAN. *et al.*, 2011).

Devi, Subhash e Mohan (2012) realizaram cultivos mistos em escala laboratorial de microalgas, utilizando como inóculo células obtidas após lavagens de

amostras coletadas em um lago da cidade de Hyderabad na Índia. Foram encontrados os seguintes gêneros e espécies: *Scenedesmus* sp., *Centric* sp., *Pinnate diatoms*, *Pediastrum boryanum*, *Cyclotella bodanica*, *Cosmarium* sp., *Chlorella vulgaris*, *Oedogonium* sp. e *Nageliella* sp. Nove condições foram testadas, alterando-se os nutrientes utilizados (N, P, C e K) na suplementação do esgoto doméstico que foi utilizado como meio de cultivo (DEVI; SUBHASH; MOHAN, 2012).

Ao final da fase de crescimento, a suplementação de fósforo (500 mg  $\text{Na}_2\text{PO}_4\cdot\text{L}^{-1}$ ) e de nitrogênio mais fósforo (250 mg  $\text{NaNO}_3\cdot\text{L}^{-1}$  + 250 mg  $\text{Na}_2\text{PO}_4\cdot\text{L}^{-1}$ ) originou as maiores produções de biomassa, 1640  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  e 1690  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente. Em todas as condições, o conteúdo de lipídeos neutros foi maior ao final da fase de privação se comparado ao conteúdo no final da fase de crescimento. Porém, as melhores condições para o acúmulo de lipídeos foram diferentes das melhores condições para produção de biomassa. As suplementações com carbono (500 mg glicose. $\text{L}^{-1}$ ) e com nitrogênio (500 mg  $\text{NaNO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ ) resultaram em um maior conteúdo de lipídeos ao final da fase de privação, 28,2% e 20,3%, respectivamente. O conteúdo lipídico foi dependente não somente da condição de suplementação, mas também da distribuição de espécies, uma vez que, ao longo dos cultivos, essa distribuição variou de acordo com a condição de suplementação aplicada, a qual foi um agente de seleção de espécies. Mesmo com as variações, determinou-se que gênero *Scenedesmus* foi o dominante nos cultivos testados (DEVI; SUBHASH; MOHAN, 2012).

Wahlen, Willis e Seefeldt (2011) utilizaram uma mistura de microalgas coletada de uma lagoa de tratamento de efluentes como biomassa para a produção de biodiesel. Apesar do baixo conteúdo de triacilglicerídeos encontrado na biomassa (<1% do peso seco), 10% do peso seco da amostra pôde ser convertido em metil ésteres de ácidos graxos, indicando que houve reação com ácidos graxos presentes em outras moléculas, como os fosfolipídeos de membrana. Embora 10% seja um rendimento baixo se comparado ao obtido com algumas espécies isoladas de

microalgas, o custo de produção dessa biomassa foi significativamente menor se comparado ao custo inerente a qualquer cultivo unialgal (WAHLEN; WILLIS; SEEFELDT, 2011).

Os valores de carbono orgânico, de sais inorgânicos, de oxigênio dissolvido e de pH do efluente alteram o metabolismo das microalgas e sua simbiose com outras populações, como a de bactérias. Por exemplo, o aumento da concentração de sais inorgânicos no efluente utilizado como meio de cultivo causa um impacto negativo no acúmulo de lipídeos pelas microalgas. Portanto, pode ocorrer baixa reprodutibilidade na quantidade de lipídeos extraídos da biomassa coletada em lagoas de tratamento de efluentes, a fim de produzir o chamado biodiesel de aproveitamento (MOHAN. *et al.*, 2011).

## 2.5 CONTEÚDO DE LIPÍDEOS NA BIOMASSA DE MICROALGAS

### 2.5.1 Composição lipídica da microalga

A maioria dos lipídeos das microalgas contém ácidos graxos que possuem de 12 a 22 carbonos, podendo ser saturados e insaturados. Os lipídeos da célula incluem lipídeos neutros utilizados como reserva de energia, como os acilgliceróis, e lipídeos polares formadores de membranas celulares, como fosfolipídeos e glicolipídeos (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

A produção de acilgliceróis é tão desejada pois o método de conversão em biodiesel mais utilizado em escala industrial (transesterificação por catálise alcalina) foi desenhado para esse tipo de lipídeo, não sendo tão eficaz na transformação de lipídeos polares e de ácidos graxos livres. Além disso, geralmente os ácidos graxos dos acilgliceróis possuem um grau de insaturação menor se comparado aos ácidos

graxos dos lipídeos polares, originando biodiesel com maior estabilidade de oxidação (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

O conteúdo total e o perfil de lipídeos variam de forma considerável com a mudança de vários fatores, como a espécie de microalga, o estágio do ciclo de vida e as condições do cultivo.

### 2.5.2 A variação entre as espécies

Algumas espécies podem ser induzidas a acumular grandes quantidades de lipídeos em sua biomassa, porém não há consenso na literatura em relação ao conteúdo de lipídeos totais que pode ser alcançado. Conteúdos de 2 a 77% de lipídeos totais em base seca têm sido relatados (DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2011) (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

Não existe a espécie certa para a produção de lipídeos, mas as espécies dos grupos diatomáceas e algas verdes (clorófitas) apresentam o maior potencial (DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2011). No grupo das clorófitas destacam-se os gêneros *Tetraselmis*, *Dunaliella*, *Chlorococcum*, *Scenedesmus* e *Chlorella*, e as espécies *Neochloris oleoabundans* e *Botryococcus braunii*. No grupo das diatomáceas destacam-se os gêneros *Amphora*, *Amphiprora*, *Cylindrotheca* e *Navicula*, e as espécies *Nitzschia dissipata*, *Phaeodactylum tricornutum* e *Chaetoceros muelleri* (COPLIN, 2012).

### 2.5.3 A variação entre estágios do ciclo de vida

O conteúdo e o perfil lipídico também são afetados pelo estágio do ciclo de vida. O aumento da biomassa na fase de crescimento é seguido pela fase estacionária, momento em que o estresse causado pela privação de fatores de crescimento, como nutrientes, CO<sub>2</sub> e luz, aumenta a síntese e o acúmulo de lipídeos neutros como os triacilgliceróis. Além disso, as microalgas em fase estacionária possuem um conteúdo de lipídeos polares menor, se comparado ao conteúdo da fase de crescimento. Portanto, a fase estacionária é mais adequada para a colheita da biomassa visando à produção de biodiesel (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012) (DEVI; SUBHASH; MOHAN, 2012).

### 2.5.4 A variação entre condições de cultivo

O conteúdo de lipídeos também é afetado pelas condições de cultivo utilizadas, variando com a composição do meio de cultivo, a temperatura, a incidência luminosa, o fotoperíodo, e o fornecimento de CO<sub>2</sub> (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012) (DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2011).

Em alguns casos, o conteúdo de lipídeos pode aumentar com uma condição de cultivo que cause estresse às células. Para algumas espécies, a privação do fornecimento de nitrogênio durante o cultivo é uma condição de estresse que favorece a via metabólica que gera lipídeos neutros. Porém, o aumento da concentração de lipídeos na biomassa geralmente não representa um aumento na produtividade volumétrica de lipídeos obtida ao final de um cultivo, uma vez que nas condições de privação a velocidade de geração de biomassa pode diminuir (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012) (DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2011).

## 2.6 BIODIESEL DE MICROALGA

O biodiesel é formado por mono alquil ésteres, comumente metil ésteres de ácidos graxos, produzidos majoritariamente por transesterificação de lipídeos de origem animal, vegetal ou microbiana, a fim de obter características próximas as do petrodiesel (DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2011). Esta seção descreve as etapas, os desafios e as promessas da produção do biodiesel de microalgas.

### 2.6.1 Etapas da produção do biodiesel de microalgas

Após a retirada do cultivo de microalgas do fotobiorreator, a biomassa é concentrada em uma etapa de retirada da água, seguindo para um pré-tratamento como a ruptura celular. Em seguida, os lipídeos são extraídos da matriz celular com solvente, separados e convertidos em biodiesel (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012). Essas etapas são descritas mais detalhadamente a seguir (FIGURA 6).

#### 2.6.1.1 Colheita e concentração

Após a colheita, ou seja, retirada do cultivo do fotobiorreator, o material precisa ser concentrado para reduzir os custos das etapas seguintes, uma vez que o cultivo é uma suspensão aquosa diluída de células, contendo de 0,1 a 2 g de biomassa seca por litro. A retirada da água, até que seja alcançada uma concentração entre 10 e 450 g de biomassa seca por litro, é feita por métodos de separação sólido-líquido como centrifugação ou filtração, ou ainda floculação seguida de sedimentação ou flotação. O desenvolvimento de métodos de concentração com maior eficiência energética e, por consequência, mais baratos, é

essencial para estabelecer o biodiesel de microalgas na escala comercial (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

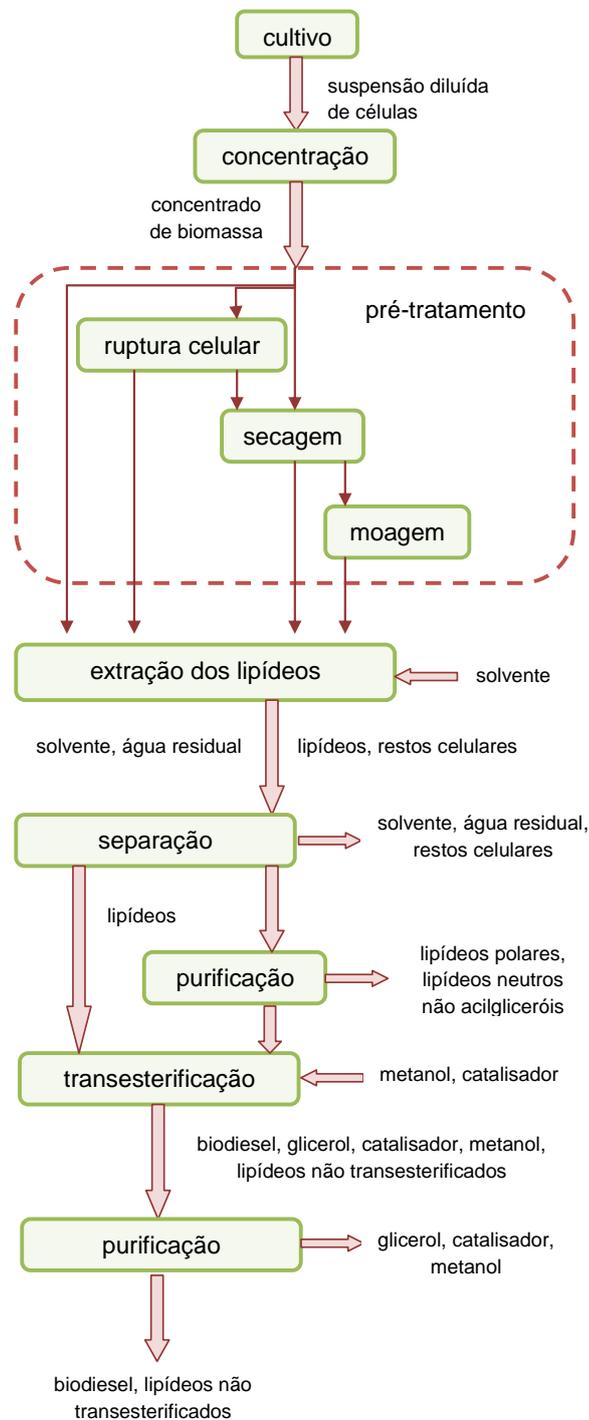


FIGURA 6 – PRODUÇÃO DE BODIESEL DE MICROALGAS

FONTE: adaptado de HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012.

### 2.6.1.2 Pré-tratamento

Para melhorar a eficiência do processo de extração de lipídeos, a biomassa concentrada pode passar por um processo de pré-tratamento, o qual pode buscar os seguintes objetivos: aumentar o grau de ruptura celular, diminuir a água residual na biomassa, e diminuir e uniformizar o tamanho das partículas no caso de biomassa seca (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

No processo de ruptura celular, os lipídeos intracelulares são liberados para o meio externo à célula. Os métodos de ruptura celular podem ser classificados em mecânicos (autoclavação, sonicação, microondas) e não mecânicos (choque osmótico e lise celular ácida, alcalina ou enzimática) (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

A secagem por liofilização possui a vantagem de utilizar condições brandas de operação (temperatura e pressão baixas), porém não é viável em escala comercial. Já a secagem térmica, apesar de muito utilizada, degrada lipídeos termolábeis, evapora lipídeos voláteis e gera biomassa seca com partículas de tamanhos muito variados (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

A moagem é utilizada para uniformizar e diminuir o tamanho das partículas de biomassa seca, facilitando a extração por aumentar a superfície de contato entre biomassa e solvente (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

### 2.6.1.3 Extração dos lipídeos

Após o pré-tratamento, existem três métodos bem conhecidos para a extração dos lipídeos da matriz celular. O primeiro é a extração por prensagem, um processo simples que retira de 70 a 75% do conteúdo de lipídeos da biomassa. O segundo é a extração por solvente, utilizando mais comumente o hexano, o qual

possui afinidade com os lipídeos neutros, como os acilgliceróis (DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2011). Porém, como as células contêm tanto lipídeos polares quanto lipídeos neutros, a extração total dos lipídeos requer uma mistura de solventes orgânicos polares (metanol, etanol, isopropanol, acetona) e apolares (éter de petróleo, clorofórmio, tolueno, xileno, hexano) (VEGA; VOLTOLINA, 2007). O terceiro é a extração por fluido supercrítico, que pode obter quase 100% do conteúdo de lipídeos de forma seletiva, gerando um produto com alta pureza (DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2011).

Visando à produção de biodiesel, busca-se ainda selecionar uma tecnologia de extração de lipídeos que minimize a co-extração de carboidratos e proteínas. Busca-se também uma tecnologia com baixo tempo de operação, baixo custo e boa eficiência quando aplicada em biomassa úmida, uma vez que a retirada de água do cultivo é um processo de alto gasto energético (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

#### 2.6.1.4 Separação e purificação

Após a extração, é obtida uma mistura de solvente, água residual, lipídeos e restos celulares (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

Primeiramente, os restos celulares são retirados por uma separação sólido-líquido como a filtração. Essa biomassa residual pode ser usada na produção de etanol e de suplemento alimentar de alto teor proteico, reduzindo o desperdício e agregando valor ao processo (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012) (DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2011).

Em seguida, o solvente de extração e a água residual são retirados por um método de separação líquido-líquido, como a destilação, a evaporação a vácuo ou a adsorção em fase sólida. No caso em que se utiliza uma mistura de solvente

polar/não-polar para extração, a água residual é retirada por separação bifásica e decantação, seguida da retirada do solvente de extração por evaporação, por exemplo. No caso da extração por fluido supercrítico, a descompressão após a extração evapora o solvente e a água residual, enquanto que os lipídeos permanecem líquidos (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

Quando é realizada a extração total de lipídeos, o material obtido após a separação do solvente e da água não contém apenas acilgliceróis, mas também outros lipídeos neutros, além de lipídeos polares. Para a produção de biodiesel, as frações lipídicas não formadas por acilgliceróis são consideradas contaminantes, e são frequentemente retiradas em uma etapa de purificação antes da transesterificação. Essa purificação pode ser realizada por cromatografia líquida, precipitação ácida ou cristalização com ureia (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

#### 2.6.1.5 Reação de transesterificação

Na reação de transesterificação, a fração lipídica que contém ácidos graxos, como os acilgliceróis, reage com um álcool (metanol, etanol, isopropanol ou butanol), originando alquil ésteres de ácido graxo, o biodiesel, além de glicerol como produto secundário. Comumente utiliza-se metanol, obtendo-se metil ésteres de ácido graxo (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

A transesterificação é catalisada por ácido, como o  $H_2SO_4$ , ou por bases, como NaOH e KOH. A catálise alcalina proporciona maiores velocidades de reação e maior conversão que a catálise ácida no caso de acilgliceróis, possuindo eficácia limitada quando utilizada em outras frações lipídicas, como os lipídeos polares. A conversão obtida na reação de transesterificação é afetada pela razão molar entre acilglicerol, álcool e catalisador, bem como pela temperatura, tempo de reação, conteúdo de ácidos graxos livres e água (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

A formação do biodiesel é favorecida pela utilização de excesso de álcool, que é recolhido e reutilizado após a reação (DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2011). Caso os ácidos graxos livres não tenham sido retirados em um processo de purificação, eles reagem com o catalisador alcalino formando sabão e água, sendo necessária a adição em excesso de catalisador para compensar a perda por saponificação. A água em condições alcalinas reage com acilgliceróis formando ácidos graxos livres e glicerol (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

#### 2.6.1.6 Purificação do biodiesel

Após a transesterificação, obtém-se uma mistura de biodiesel, glicerol, catalisador, álcool em excesso e lipídeos não esterificados, sendo necessária uma etapa de purificação (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

A mistura reacional é deixada em repouso para a formação de duas fases, a superior com biodiesel e lipídeos não esterificados e a inferior com glicerol. A fase superior é separada e lavada repetidamente com água para eliminar o catalisador e o excesso de álcool. O perfil dos alquil ésteres de ácido graxo que compõem o biodiesel pode ser obtido através de análise em cromatografia gasosa (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

#### 2.6.2 Promessas e desafios

Quanto maior a eficiência fotossintética de um organismo, melhor matéria prima para biocombustíveis ele será, e as microalgas têm uma eficiência maior que a das plantas terrestres. O biodiesel de plantas oleaginosas, gordura animal e óleo residual de cozinha pode satisfazer apenas uma pequena parte da demanda por

combustíveis para transporte (DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2011). Dados de produtividade de biomassa em escala laboratorial promoveram as microalgas como a única matéria prima renovável para biodiesel capaz de atender a demanda global por combustíveis de transporte (COPLIN, 2012).

A biomassa de microalgas possui a vantagem sobre a matéria-prima convencional (plantas oleaginosas) de não competir por terras com a produção de alimentos, uma vez que o cultivo pode ser realizado em terras inférteis. Pode também não competir por água, caso utilize água salina, salobra ou efluente na produção. Porém, o cultivo em larga escala demanda grandes quantidades de fertilizantes, fato que pode impactar na produção de alimentos (ALABI; TAMPIER; BIBEAU, 2009).

Muitas pesquisas e investimentos foram realizados, porém as altas produtividades alcançadas em escala laboratorial não foram repetidas em experimentos de longo prazo e em escala industrial. Atualmente, as operações em larga escala alcançam a produção de 40 a 60 toneladas de biomassa seca por hectare por ano, porém projeções sugerem que uma produção de 100 toneladas de biomassa seca por hectare por ano e 30 toneladas de biodiesel por hectare por ano seria alcançável em locais de clima subtropical e tropical (COPLIN, 2012).

Ainda existem obstáculos técnicos e econômicos para que o biodiesel de microalgas alcance uma produção em escala industrial com um mercado bem estabelecido (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012). As microalgas produzem diversos metabólitos que já são explorados comercialmente há mais de uma década nas áreas de suplementos alimentares e corantes, porém a escala de produção de biomassa para biodiesel terá que ser muito maior do que a escala de produção desses produtos (COPLIN, 2012). Baseando-se na estimativa de que é possível produzir 190 litros de biodiesel por tonelada de biomassa seca de microalgas, em 2030 a demanda mundial para essa biomassa pode chegar a 416 milhões de toneladas por ano. Para substituir toda a demanda por diesel e gasolina em 2030,

seria necessária uma produção de biomassa 20 vezes maior (ALABI; TAMPIER; BIBEAU, 2009).

Os maiores desafios ligados à etapa da produção de biomassa (*upstream*) são a escolha de um sistema *outdoor* de cultivo em larga escala adequado e a escolha de uma cepa robusta que possua elevada velocidade de crescimento, ótimo conteúdo de lipídeos neutros e imunidade contra a invasão de microrganismos do ambiente. Não bastando isso, o sucesso do biodiesel de microalgas também depende do desenvolvimento de uma forma de extração de lipídeos das células que seja eficiente não apenas no rendimento, mas também no âmbito econômico (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

A diminuição das reservas de combustíveis fósseis aumentará seu custo e tornará o biodiesel mais atraente para investidores e consumidores, porém existem poucos estudos disponíveis referentes à viabilidade econômica do biodiesel de microalgas. Será necessária a produção de enormes quantidades de biomassa em processos de baixo custo, porém a produção de microalgas requer gastos significativos com água, nitrogênio e energia de fontes fósseis para o funcionamento do sistema (DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2011).

O biodiesel de microalgas poderá só se tornar economicamente viável caso sejam explorados outros co-produtos da biomassa de microalga, utilizando a estratégia da biorrefinaria. Essa biomassa contém quantidades significativas de proteínas que podem ser utilizadas na alimentação e de carboidratos que podem ser fermentados a bioetanol, além de pequenas quantidades de compostos de alto valor e função anti-oxidante e anti-inflamatória como carotenos, clorofilas e ácidos graxos Omega 3. A biorrefinaria necessita da implementação de muitas tecnologias, que, no caso da biomassa de microalgas, ainda estão no início de seu desenvolvimento (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

### 3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O presente estudo está inserido nas investigações realizadas no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPDEAS) da Universidade Federal do Paraná, o qual integra tecnologias de produção de biomassa e biocombustíveis de microalgas, utilização eficiente de energia e tratamento de resíduos, com o objetivo de desenvolver uma unidade autossustentável em energia.

O estudo uniu, pela primeira vez em escala laboratorial no NPDEAS, duas estratégias utilizadas anteriormente na literatura, o uso de cultivos mistos e o uso de aeração enriquecida com CO<sub>2</sub> puro, contribuindo para o desenvolvimento das etapas ligadas pela linha vermelha do fluxograma da unidade autossustentável (FIGURA 7). Nesse segmento da unidade, ocorrerá a produção em larga escala de microalgas, utilizando uma fonte enriquecida de carbono, como atmosfera rica em CO<sub>2</sub> puro ou gases de escape da unidade multigeradora (eletricidade, calor, frio) gerados durante a combustão de biodiesel ou biogás.

O NPDEAS utiliza, como inóculo em seus cultivos, cepas mistas de microalgas coletadas em ambiente aquático natural. Esse inóculo misto pode incluir, além de diferentes espécies de microalgas, vírus, bactérias, fungos, larvas de insetos, protozoários e micro-crustáceos. A comunidade de espécies em um cultivo misto tende a apresentar oscilações, devido à competição entre espécies de microalgas e à dinâmica presa-predador. As mudanças no perfil de espécies do cultivo alteram a qualidade da biomassa e dos lipídeos produzidos e, por consequência, a qualidade do biocombustível derivado dessa produção (COPLIN, 2012).

Diante das possíveis mudanças nas características de um cultivo misto de microalgas, a reprodutibilidade é um dos fatores que deve ser considerado. Porém, nenhum dos estudos sobre o uso de cultivos mistos descritos anteriormente aborda

a reprodução dos experimentos. Nos casos em que ocorre a manutenção em laboratório da amostra coletada, a fim de prover inóculos para os cultivos subsequentes, que é o caso do NPDEAS, podem ocorrer mudanças como o desaparecimento ou a dominância de determinadas espécies ao longo dos sucessivos repiques. Portanto, a manutenção das características da coleta inicial não é garantida, e esse estudo visa avaliar a reprodutibilidade e a repetibilidade dos cultivos mistos de microalgas.

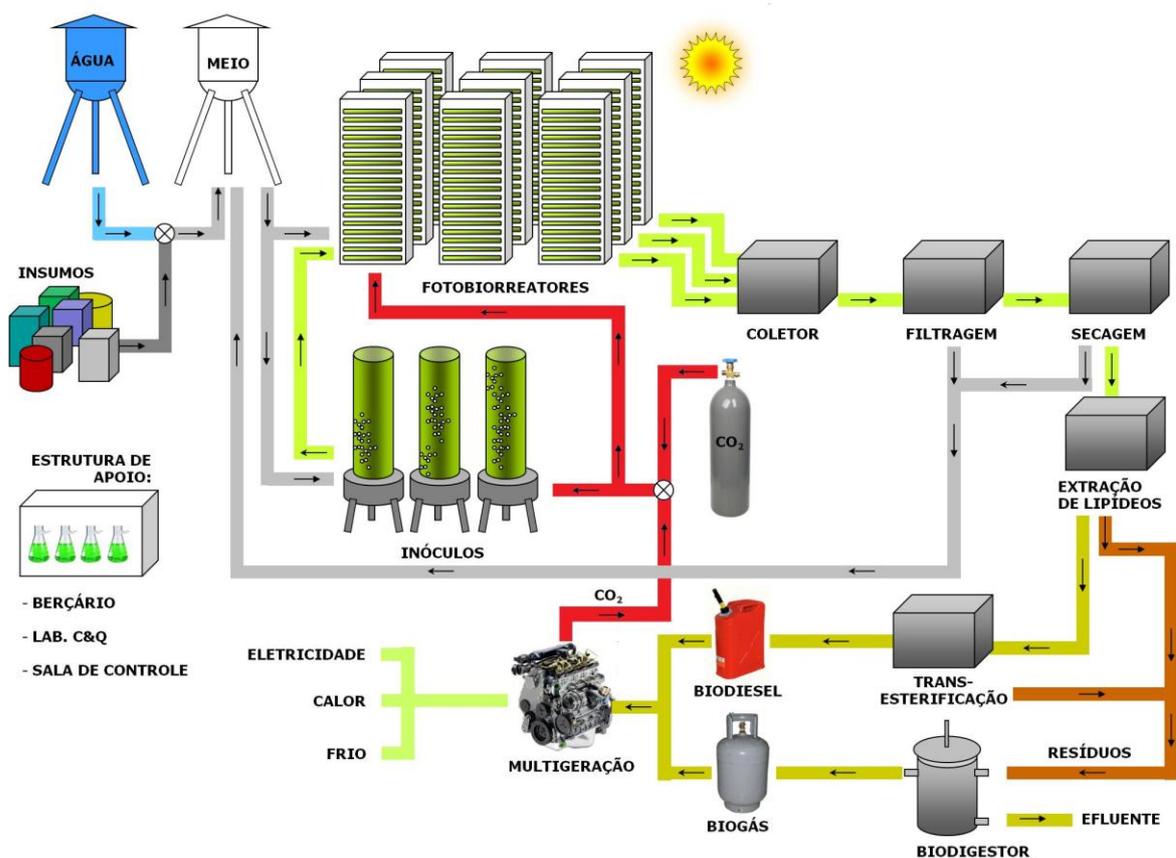


FIGURA 7 – FLUXOGRAMA DA UNIDADE AUTOSSUSTENTÁVEL DO NPDEAS

FONTE: MARIANO, A. B.

### Objetivo Geral:

Avaliar o efeito da aeração enriquecida com CO<sub>2</sub> na produção de biomassa e lipídeos por cultivo misto de microalgas.

### Objetivos Específicos:

- Comparar a produção de biomassa de duas cepas mistas de microalgas utilizadas no NPDEAS;
- Avaliar o efeito da aeração com gases ricos em CO<sub>2</sub> na produção de biomassa mista de microalgas e no seu conteúdo de lipídeos;
- Avaliar a repetibilidade e a reprodutibilidade de cultivos mistos de microalgas com aeração por ar atmosférico e ar enriquecido com CO<sub>2</sub> puro.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MANUTENÇÃO DAS CEPAS E PRODUÇÃO DO INÓCULO

Anteriormente a essa pesquisa de mestrado, células de microalgas foram coletadas em um ecossistema aquático natural, a lagoa do Passeio Público da cidade de Curitiba – PR, e submetidas a sucessivos cultivos em lagoa aberta *outdoor* e em fotobiorreator tubular *outdoor* no NPDEAS. Amostras desses cultivos *outdoor* foram retiradas e mantidas em escala laboratorial por sucessivos cultivos, os quais deram origem a duas cepas mistas de microalgas utilizadas neste trabalho.

As cepas se diferenciavam pela variedade de espécies de microalgas encontradas. A cepa Mix1 continha majoritariamente células de microalgas do gênero *Scenedesmus*, de microalgas ovais de gênero não identificado e de microalgas filamentosas segmentadas também de gênero não identificado. A cepa Mix2 continha majoritariamente células de microalgas do gênero *Scenedesmus* e de microalgas filamentosas segmentadas de gênero não identificado.

As células que serviram de inóculo para os cultivos teste foram cultivadas na sala de cultivo do NPDEAS, em frascos tipo erlenmeyer e em temperatura de aproximadamente 22°C. Os frascos foram dispostos em prateleiras iluminadas por duas lâmpadas fluorescentes tubulares (40W cada; tipo luz do dia), que eram controladas por um temporizador digital para gerar um fotoperíodo de 12 h iluminadas e 12 h não iluminadas. Os frascos receberam aeração contínua com ar atmosférico proveniente da rede de ar comprimido do prédio do NPDEAS. A vazão de aeração foi determinada visualmente a fim de evitar a decantação das células e controlada por válvulas (FIGURA 8).

Os cultivos para a produção de inóculo foram iniciados pela diluição de um cultivo de manutenção da cepa em meio CHU modificado (ANEXO) a fim de

alcançar a densidade óptica a 540 nm ( $DO_{540}$ ) inicial de 0,2. Os inóculos foram cultivados durante 5 a 6 dias, e utilizados nos cultivos teste quando, nesse período, alcançavam uma  $DO_{540}$  maior que 0,8 sem atingir o estado estacionário de desenvolvimento.

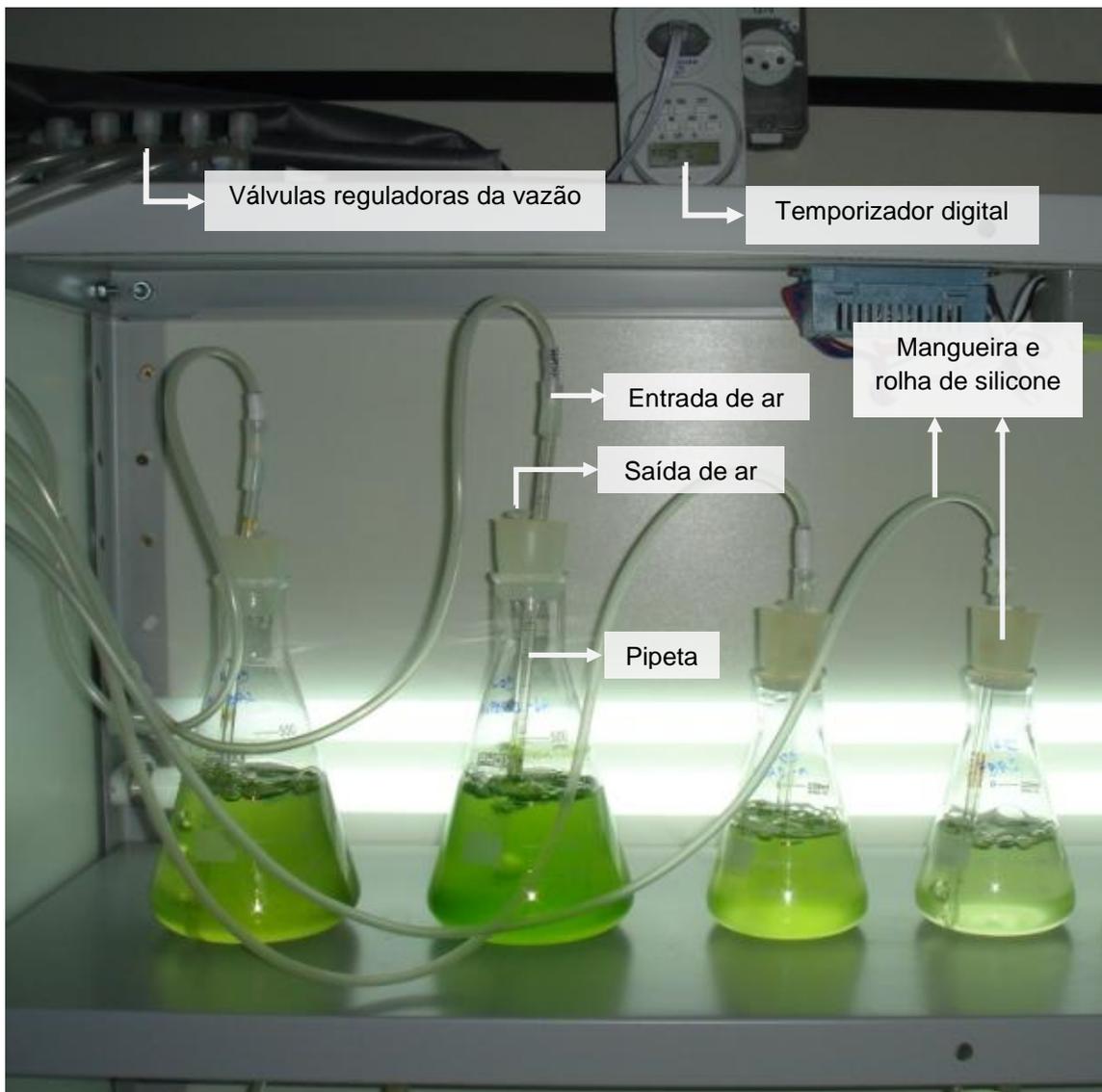


FIGURA 8 – APARATO DE CULTIVO DOS INÓCULOS

FONTE: O autor (2012)

## 4.2 CULTIVOS COM ATMOSFERA PADRÃO

Os cultivos com aeração padrão receberam ar atmosférico, proveniente da rede de ar comprimido do NPDEAS, de forma contínua e borbulhado no fundo dos frascos tipo erlenmeyer (2 L de volume total).

Os cultivos teste com atmosfera padrão foram realizados em triplicata e cada cultivo foi iniciado com um volume de 1,5 L, obtidos pela diluição do inóculo em meio CHU modificado (ANEXO) para alcançar uma  $DO_{540}$  de 0,15. Os cultivos foram realizados na sala de cultivos do NPDEAS, com temperatura controlada em aproximadamente 22°C. Cada triplicata ocupou uma mesma prateleira de cultivo com fotoperíodo de 12 h claro e 12 h escuro proporcionado por duas lâmpadas fluorescentes tubulares (40 W cada; tipo luz do dia) controladas por um temporizador digital.

A vazão de ar atmosférico para cada frasco de cultivo foi de 2,5 L.min<sup>-1</sup> (1,7 vvm considerando volume útil), controlada por válvulas e medida com fluxômetro hospitalar para ar atmosférico (Protec; escala 0-15 L.min<sup>-1</sup>). Os fluxômetros foram instalados entre a válvula de controle e a entrada de ar do frasco, tendo sido calibrados com um bolhometro de vidro de 200 mL acoplado na saída de ar do frasco de cultivo (FIGURA 9). De acordo com a calibração, para obter uma vazão de 2,5 L.min<sup>-1</sup> de ar atmosférico, o fluxômetro deveria marcar 5 L.min<sup>-1</sup>.

## 4.3 CULTIVOS COM ATMOSFERA ENRIQUECIDA COM CO<sub>2</sub>

Os cultivos com aeração enriquecida de CO<sub>2</sub> receberam uma mistura de ar atmosférico e CO<sub>2</sub> a uma concentração de 2 ou 5% (v/v) e vazão de 2,5 L.min<sup>-1</sup> para cada frasco. A aeração enriquecida foi inserida durante 8 horas ininterruptas durante o período iluminado, enquanto que nas outras horas do dia foi inserida aeração

padrão. A aeração foi inserida por borbulhamento no fundo dos frascos tipo erlenmeyer (2 L de volume total).

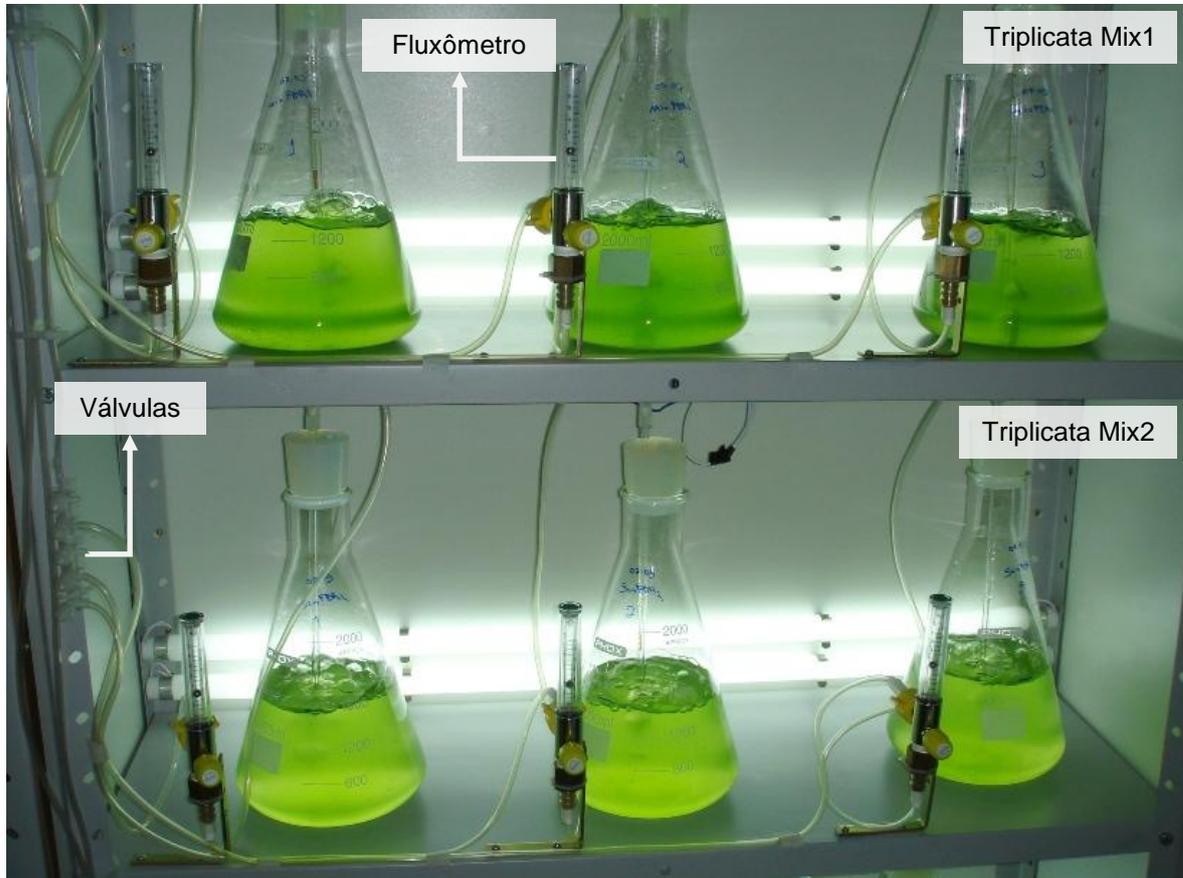


FIGURA 9 – APARATO DE CULTIVO COM ATMOSFERA PADRÃO

FONTE: O autor (2012)

Os cultivos teste com atmosfera enriquecida foram realizados em triplicata e cada cultivo foi iniciado com um volume de 1,5 L, obtidos pela diluição do inóculo em meio CHU modificado (ANEXO) para alcançar uma  $DO_{540}$  de 0,15. Os cultivos foram realizados na sala de cultivos do NPDEAS, com temperatura controlada em aproximadamente 22°C. A triplicata ocupou uma mesma prateleira de cultivo com fotoperíodo de 12 h claro e 12 h escuro proporcionado por duas lâmpadas fluorescentes tubulares (40 W cada; tipo luz do dia) controladas por um temporizador digital.

No sistema de aeração enriquecida, a saída de CO<sub>2</sub> do cilindro (White Martins 25 kg) foi ligada a um rotâmetro (White Martins - Acrílico AFSG; escala 0,2 a 2,5 L.min<sup>-1</sup>), que proporcionou o controle e a medição da vazão de CO<sub>2</sub> total necessária para que os 3 frascos da triplicata recebessem uma atmosfera com concentração de CO<sub>2</sub> de 2 ou 5% (v/v). O rotâmetro foi calibrado com um bolhometro de vidro de 25 mL que permaneceu em linha e ligado na saída de CO<sub>2</sub> no rotâmetro (FIGURA 10).

A vazão total de ar atmosférico (rede de ar comprimido do NPDEAS) necessária para a triplicata foi controlada por uma válvula e uniu-se a vazão total de CO<sub>2</sub> por meio de uma conexão em “Y”. A atmosfera enriquecida seguiu para uma tubulação em formato de serpentina a fim de garantir uma boa mistura dos gases, e em seguida era distribuída por meio de conexões em “T” para os três frascos da triplicata (FIGURA 10).

A vazão para cada frasco foi controlada por uma válvula e medida com um fluxômetro hospitalar (Protec; ar atmosférico; escala 0-15 L.min<sup>-1</sup>) instalados antes da entrada de aeração do cultivo. Cada fluxômetro foi calibrado com um bolhometro de vidro de 200 mL acoplado na saída de ar do frasco de cultivo. De acordo com a calibração, para obter uma vazão de 2,5 L.min<sup>-1</sup> de atmosfera enriquecida, o fluxômetro deveria marcar 5 L.min<sup>-1</sup>. As vazões de saída dos frascos foram canalizadas, unidas por meio de conexões em “T” e direcionadas para fora do prédio do NPDEAS. Para evitar o acúmulo de água nas tubulações de descarte da atmosfera enriquecida, a vazão de saída passava por um frasco com sílica para retirada da umidade (FIGURA 10).

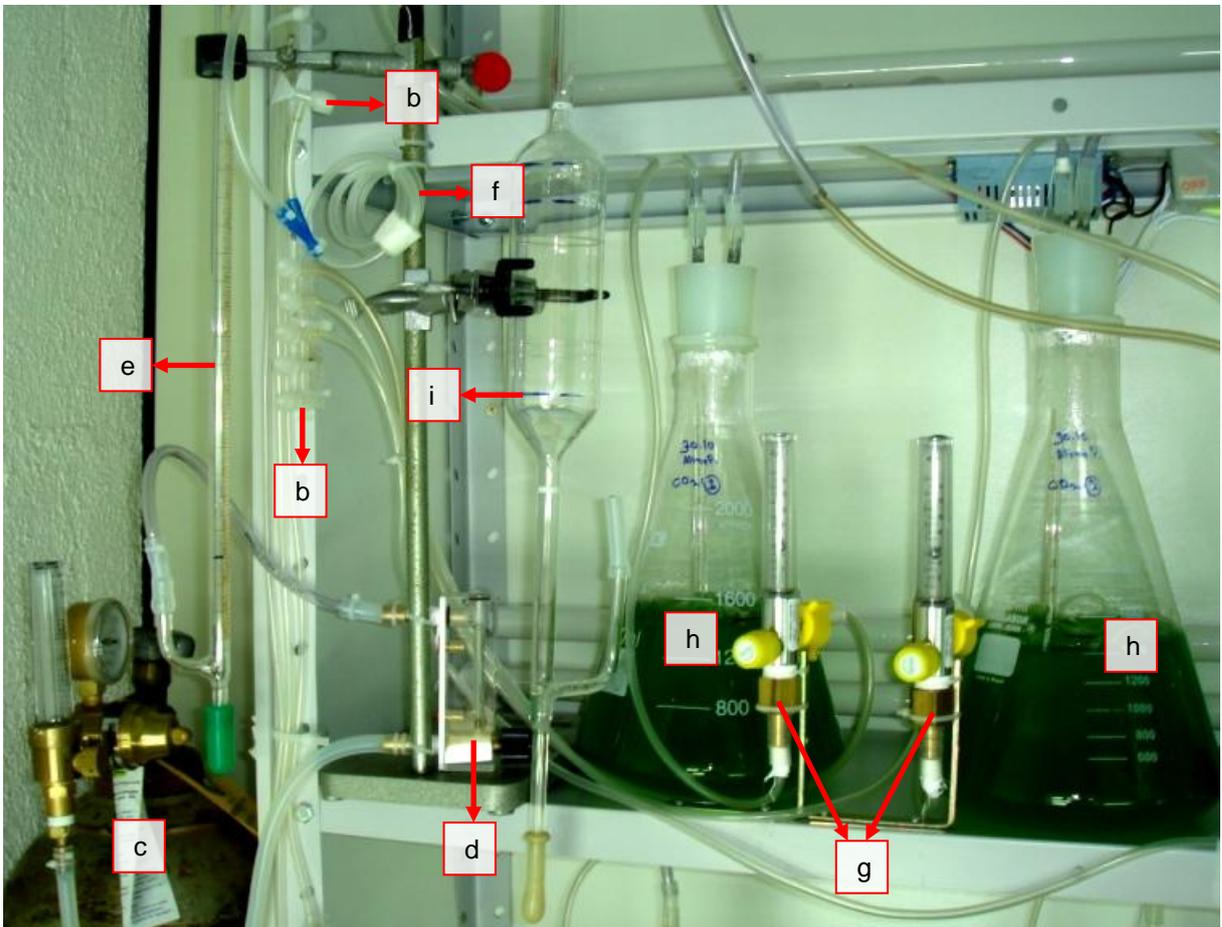
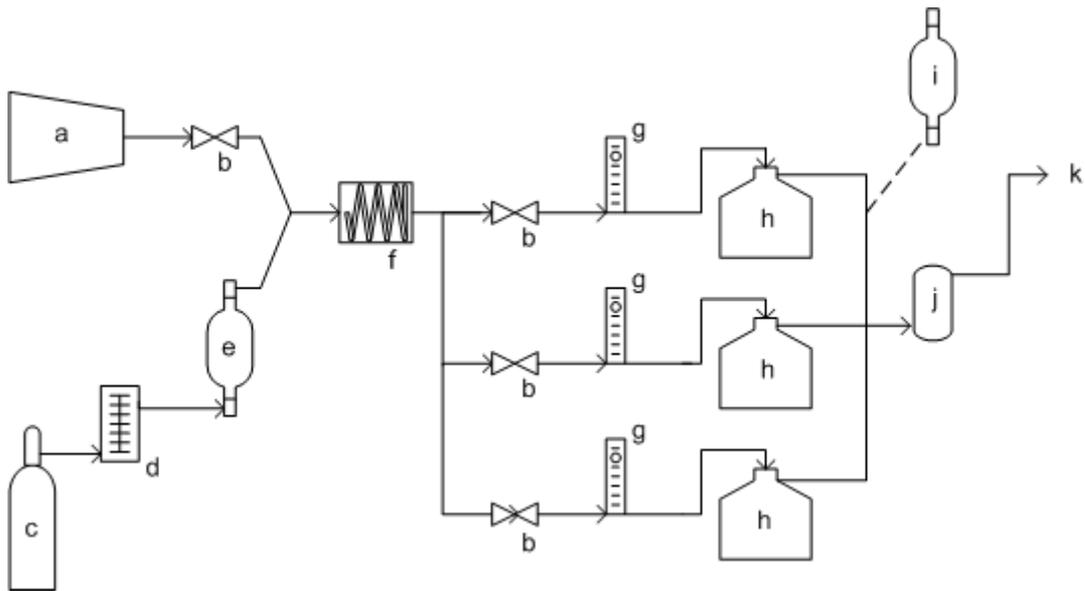


FIGURA 10 – DESENHO ESQUEMÁTICO E FOTOGRAFIA DO APARATO DE CULTIVO COM ATMOSFERA ENRIQUECIDA DE  $\text{CO}_2$

FONTE: O autor (2012)

**LEGENDA:**

- a: rede de ar atmosférico comprimido do NPDEAS;
- b: válvula reguladora de vazão;
- c: cilindro de CO<sub>2</sub>;
- d: rotâmetro 0,2-2,5 L.min<sup>-1</sup>;
- e: bolhometro de 25mL;
- f: tubulação em formato de serpentina;
- g: fluxômetros hospitalares 1-15 L.min<sup>-1</sup>;
- h: frascos de cultivo;
- i: bolhometro de 200mL;
- j: frasco com sílica;
- k: descarte da atmosfera enriquecida.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA

##### 4.4.1 Densidade óptica e pH

A densidade óptica dos cultivos de microalgas é uma estimativa indireta da concentração celular, ou seja, quanto mais células estiverem presentes na amostra, maior será o espalhamento da luz (LOURENÇO, 2006). Ao longo dos cultivos, foram realizadas duas leituras de densidade óptica por dia em cada frasco, uma no início do período iluminado e outra no final do período iluminado. Antes da retirada de cada amostra, o volume perdido de água por evaporação era completado com água destilada utilizando como base uma marcação de nível na parte exterior dos frascos. O cultivo era então homogeneizado e a amostra para a medida da densidade óptica retirada. Antes da marcação de um novo nível de líquido na parte exterior do frasco, era realizada a medida do pH da amostra por meio de um pHmetro de bancada.

A densidade óptica da amostra de cultivo retirada era lida em espectrofotômetro, utilizando o meio de cultivo CHU modificado como branco. Amostras com leitura de densidade óptica acima de 1 eram diluídas com meio CHU modificado. O comprimento de onda utilizado para a realização das medidas foi 540

nm, que está longe dos picos de absorção de luz da clorofila-a e da clorofila-b (LOURENÇO, 2006). Desta forma, a densidade óptica é pouco afetada pelos pigmentos fotossintetizantes, que variam de acordo com as condições e com o tempo de cultivo, e é majoritariamente afetada pela obstrução da passagem de luz pelas células (VEGA; VOLTOLINA, 2007). As leituras de densidade óptica a 540 nm ( $DO_{540}$ ) foram plotadas ao longo do tempo, o que permitiu avaliar as fases de crescimento do cultivo.

#### 4.4.2 Concentração de biomassa seca

A determinação da concentração de biomassa seca em uma amostra de cultivo nada mais é que a análise dos sólidos suspensos totais dessa amostra, a qual foi adaptada do procedimento descrito no *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* de 2005. Para essa determinação, primeiramente, o papel filtro de fibra de vidro era seco em estufa a 105°C, deixado esfriar em dessecador por 30 min e pesado em balança analítica eletrônica.

A retirada de amostra do frasco de cultivo, 50 mL, era realizada após a adição de água destilada até marca de nível, a fim de compensar a água perdida por evaporação, e homogeneização. Cada determinação de biomassa seca era feita em duplicata, portanto, 25 mL da amostra do cultivo eram filtrados a vácuo utilizando o filtro pré-pesado, um frasco Kitasato e um funil de Buchner. Após a filtração da amostra, o papel de filtro com a biomassa era lavado com 30 mL de água destilada, seco em estufa a 105°C por 1 h, resfriado em dessecador por 30 min e pesado em balança analítica eletrônica. O procedimento de secagem do filtro com a amostra era repetido até obter um peso constante. O cálculo para a obtenção da concentração de biomassa seca (X) é descrito pela fórmula a seguir.

$$X \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} = \frac{(P1 - P) 10^6}{V}$$

(3)

onde:

P = massa do papel filtro (g);

P1 = massa do papel filtro com a biomassa filtrada (g);

V = volume da amostra filtrada (mL).

#### 4.4.3 Curva de calibração e velocidade de crescimento

A curva de calibração relaciona, por meio de uma equação linear, a concentração de biomassa seca e a densidade óptica de cultivos, portanto, sabendo-se a densidade óptica de amostras, a partir da curva é possível estimar a concentração de biomassa seca sem realizar uma análise de sólidos suspensos totais. Por motivos descritos na seção Resultados e Discussão, foi realizada uma curva de calibração para cada cultivo.

De acordo com Knie (2004), para montar uma curva de calibração é necessário ter dados de concentração de biomassa seca e  $DO_{540}$  de no mínimo três diluições diferentes de uma mesma suspensão de células de microalgas. Como, neste presente trabalho, as curvas de calibração foram realizadas durante os cultivos e utilizadas apenas no correspondente cultivo (Seção 5), foram retiradas amostras em três momentos de cada cultivo. Em um momento intermediário do cultivo, em torno de 5 dias, foram retiradas amostras de um ou dois frascos da triplicata, enquanto que, no final do cultivo, foram retiradas amostras dos três frascos. No momento inicial do cultivo, as amostras eram muito diluídas, portanto era retirada uma amostra do cultivo inóculo, e o resultado de suas análises era

multiplicado pelo fator de diluição utilizado no momento de montar os cultivos testes a um  $DO_{540}$  inicial de 0,15.

Em cada amostra foi determinada a  $DO_{540}$  e a concentração de biomassa seca como descrito nas seções 4.4.1 e 4.4.2, respectivamente. Os dados para cada cultivo foram plotados em um gráfico de dispersão da concentração de biomassa seca *versus*  $DO_{540}$ , e a curva de calibração foi obtida através de uma regressão linear com interseção na origem do gráfico. Ao final dos cultivos, com a curva de calibração correspondente em mãos, as curvas de crescimento, em função dos valores de  $DO_{540}$  ao longo do tempo, foram transformadas em curvas de concentração de biomassa seca ao longo do tempo.

A partir das curvas de crescimento de cada frasco, é possível visualizar durante qual período o cultivo apresentou uma fase de crescimento aproximadamente linear, e calcular a velocidade de crescimento (VC) na fase linear a partir da equação a seguir.

$$VC = \frac{(n_f - n_i)}{\Delta t} \quad (4)$$

onde:

$n_f$  = concentração de biomassa seca no final da fase de crescimento aproximadamente linear ( $mg.L^{-1}$ );

$n_i$  = concentração de biomassa seca no início da fase de crescimento aproximadamente linear ( $mg.L^{-1}$ );

$\Delta t$  = tempo de duração da fase de crescimento aproximadamente linear (dia).

#### 4.4.4 Diversidade de espécies nos cultivos mistos

Foram realizadas análises em microscopia óptica de amostras dos cultivos mistos com o objetivo de avaliar, qualitativamente, a diversidade e a distribuição de espécies ao longo dos experimentos. Para a análise, uma gota da amostra era colocada em uma lâmina do tipo câmara de Neubauer, coberta por uma lamínula e observada por meio de microscópio óptico em aumento de 400 vezes. As observações foram registradas por fotografia.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS

O conteúdo de lipídeos totais na biomassa seca ao final dos cultivos foi determinado por uma modificação utilizada no NPDEAS do método adaptado de Bligh & Dyer descrito por Vega e Voltolina (2007).

Para obter a biomassa seca, ao final do cultivo, os frascos eram refrigerados a aproximadamente 4°C por no máximo 2 dias, a fim de acelerar a decantação das células. O sobrenadante da decantação foi descartado por meio de um sifão, e a suspensão concentrada de células era centrifugada em ciclos de 5 min a 5000 rpm, a fim de alcançar um volume máximo de 50 mL de concentrado procedente de cada frasco de cultivo. Cada 50 mL obtidos foi transferido para um balão de 250 mL, que, após congelado, seguiu para liofilização a -40°C e 0,1 mbar.

Cada frasco da triplicata dos cultivos teve sua biomassa processada separadamente, dando origem a uma amostra de biomassa liofilizada, na qual o método de extração de lipídeos totais foi aplicado em triplicata. Para cada extração, foram pesados, em um tubo de polipropileno de 12 mL (tubo 1), uma amostra de 50 mg de biomassa liofilizada. Ao tubo 1, foram adicionados 3 mL de uma mistura de clorofórmio:metanol (2:1 v/v) e 10 µL de uma solução de butil hidróxi tolueno (1%

v/v) em metanol. O frasco 1 seguiu para 3 ciclos de 15 min de sonicação em banho de água e gelo, tendo sido agitado com vortex ao final de cada ciclo. Por fim, o frasco foi incubado sob refrigeração (~4°C) por 24 h, ao abrigo da luz.

Após a incubação, o tubo 1 seguiu para mais 3 ciclos de 15 min de sonicação em banho de água e gelo, incluindo agitação com vortex ao final de cada ciclo. Em seguida, o frasco foi centrifugado a 5000 rpm por 10 min a 5°C, e o sobrenadante gerado foi recuperado com uma pipeta de Pasteur de vidro e reservado em um novo tubo de polipropileno de 12 mL (tubo 2). A biomassa sedimentada restante no tubo 1 recebeu 1,5 mL da mistura de clorofórmio:metanol (2:1 v/v), foi homogeneizada em vortex e seguiu novamente para centrifugação a 5000 rpm por 10 min a 5°C. O novo sobrenadante gerado foi transferido para o tubo 2.

Na sequência, o tubo 2 recebeu 2 mL de água destilada e 1 mL de clorofórmio, tendo sido agitado em vortex e centrifugado a 5000 rpm por 10 min a 5°C. A centrifugação originou duas fases, sendo que a inferior contém lipídeos e clorofórmio e foi recuperada com uma pipeta de Pasteur de vidro e transferida para o tubo 3 (frasco de vidro de 10 mL previamente seco e pesado). A fase superior restante no tubo 2 recebeu 1 mL de clorofórmio, foi homogeneizada em vortex e centrifugada a 5000 rpm por 10 min a 5°C. A fase inferior obtida após centrifugação foi novamente recuperada e transferida para o tubo 3, o qual seguiu para a evaporação do clorofórmio em temperatura ambiente, dentro de uma capela de exaustão de gases. Os lipídeos extraídos permaneceram no tubo 3, que foi pesado novamente. O conteúdo de lipídeos totais na biomassa seca (% LT) foi determinado pela equação a seguir.

$$\% \text{ LT} = 100\% \left[ \frac{(\text{PTL} - \text{PTV})}{P} \right]$$

(5)

onde:

PTL = massa do tubo 3 com lipídeos (mg);

PTV = massa do tubo 3 vazio (mg);

P = massa da amostra de biomassa liofilizada (mg).

#### 4.6 ANÁLISE DE DADOS

Na análise dos dados obtidos ao longo da experimentação, foram usadas algumas ferramentas da estatística como o cálculo da média aritmética (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001), que foi aplicado para determinar os valores médios de  $DO_{540}$ , concentração de biomassa seca, velocidade de crescimento ou conteúdo de lipídeos na biomassa, dentre os frascos da triplicata de um cultivo. A equação da média está descrita a seguir:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i$$

(6)

onde:

$x_i$  = i-ésimo valor da amostra;

N = número total de valores na amostra.

A descrição da média pode vir seguida de um intervalo representado pelo erro padrão da média, o qual é descrito por (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001):

$$s_{\text{média}} = \frac{s}{\sqrt{N}}$$

(7)

sendo o erro padrão (s) calculado por:

$$s = \sqrt{\left[ \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \right]}$$

(8)

onde:

$x_i$  = i-ésimo valor da amostra;

N = número total de valores na amostra;

Para calcular o intervalo de confiança (IC) da média, no qual se possui um nível de confiança ou uma probabilidade,  $[(1-\alpha) \times 100]\%$ , de conter o verdadeiro valor da média, utilizou-se a seguinte equação (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001):

$$IC = \bar{x} \pm t_{\frac{\alpha}{2};v} s_{\text{média}}$$

(9)

onde:

v = grau de liberdade = número de valores da amostra – 1;

$t_{\alpha/2;v}$  = distribuição t-Student;

$s_{\text{média}}$  = erro padrão da média.

Para saber se os valores de duas médias (A e B) são significativamente diferentes de acordo com um nível de confiança,  $[(1 - \alpha) \times 100]\%$ , foi calculado o intervalo de confiança da diferença entre as duas médias populacionais ( $\mu_A - \mu_B$ ) descrito a seguir. Caso o intervalo obtido não contenha o valor zero, as médias são significativamente diferentes (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

$$(\mu_A - \mu_B) = (\bar{X}_A - \bar{X}_B) \pm t_{\alpha/2;v} s_e \sqrt{\left(\frac{1}{N_A} + \frac{1}{N_B}\right)}$$

(10)

onde:

N = número total de valores na amostra;

v = grau de liberdade =  $N_A + N_B - 2$ ;

$t_{\alpha/2;v}$  = distribuição t-Student;

$s_e$  = estimativa conjunta do erro padrão de uma observação.

O valor da estimativa conjunta do erro padrão de uma observação,  $s_e$ , é calculado por (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001):

$$s_e = \sqrt{\left[ \frac{(N_A - 1)S_A^2 + (N_B - 1)S_B^2}{(N_A - 1) + (N_B - 1)} \right]}$$

(11)

onde:

s = erro padrão.

A reprodutibilidade dos parâmetros de cultivo, como  $DO_{540}$ , pH, velocidade de crescimento e conteúdo de lipídeos, foi avaliada entre cultivos não simultâneos com mesma condição de aeração. A repetibilidade desses parâmetros foi avaliada entre as replicatas de cultivo.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 AVALIAÇÃO DE DUAS CEPAS MISTAS DE MICROALGAS

Inicialmente foram realizados cultivos com duas cepas mistas de microalgas, com o objetivo de determinar qual delas proporciona uma maior produção de biomassa.

#### 5.1.1 Primeiro experimento

Em um primeiro experimento, os cultivos em triplicata de Mix1 e Mix 2 foram realizados simultaneamente e tiveram duração de 285 horas (~12 dias). Os perfis de  $DO_{540}$  e pH dos cultivos Mix1 e Mix2 foram diferentes (FIGURAS 11, 12, 14 e 15).

No caso de Mix1, um dos frascos apresentou um perfil de  $DO_{540}$  significativamente diferente dos outros dois. A partir de 31 h, houve um rápido aumento de  $DO_{540}$  do frasco 2, que alcançou valores em torno de 2,0 após 175 h e então permaneceu aproximadamente constante. Os frascos 1 e 3 mantiveram um crescimento lento aproximadamente linear e alcançaram valores de  $DO_{540}$  próximos a 0,5 após 285 horas de cultivo (FIGURA 11).

O perfil de pH do frasco 2 também foi diferente dos outros (FIGURA 12). Para os frascos 1 e 3, o pH inicialmente aumentou, estabilizando em valores entre 8,5 e 9,5 a partir de 118 h. Os valores de pH medidos no início do período iluminado sempre foram menores do que os valores medidos ao final do período iluminado. O aumento do pH ao longo desse período é devido, primeiro, à realização da fotossíntese, pois o aparato fotossintético transporta  $OH^-$  para o exterior da célula e  $H^+$  para o interior (LOPES, 2007), segundo, ao consumo do  $CO_2$  dissolvido no meio

e, terceiro, ao consumo de nitrato (ANDERSEN, 2005). A diminuição do pH durante o período não iluminado é devido ao metabolismo respiratório das reservas energéticas da célula, que libera  $\text{CO}_2$  para o meio.

O gráfico da FIGURA 12 também demonstra um comportamento do frasco 2 incoerente com a literatura. A partir de 69 h, os valores de pH do frasco 2 caíram abruptamente, permanecendo em valores entre 5,7 e 6,2 ao longo das próximas 72 h. Após esse período, o pH aumentou rapidamente e manteve-se entre 7,8 e 9,2. O período em que os valores permaneceram próximos a 6 coincide com o período de grande aumento de  $\text{DO}_{540}$  do frasco 2. Caso este aumento fosse devido ao crescimento das microalgas, seria esperado um aumento do pH do meio e não uma queda. A queda poderia ter sido causada por uma contaminação com bactérias, mas contaminantes não foram observados por microscopia óptica em amostras retiradas durante este período.

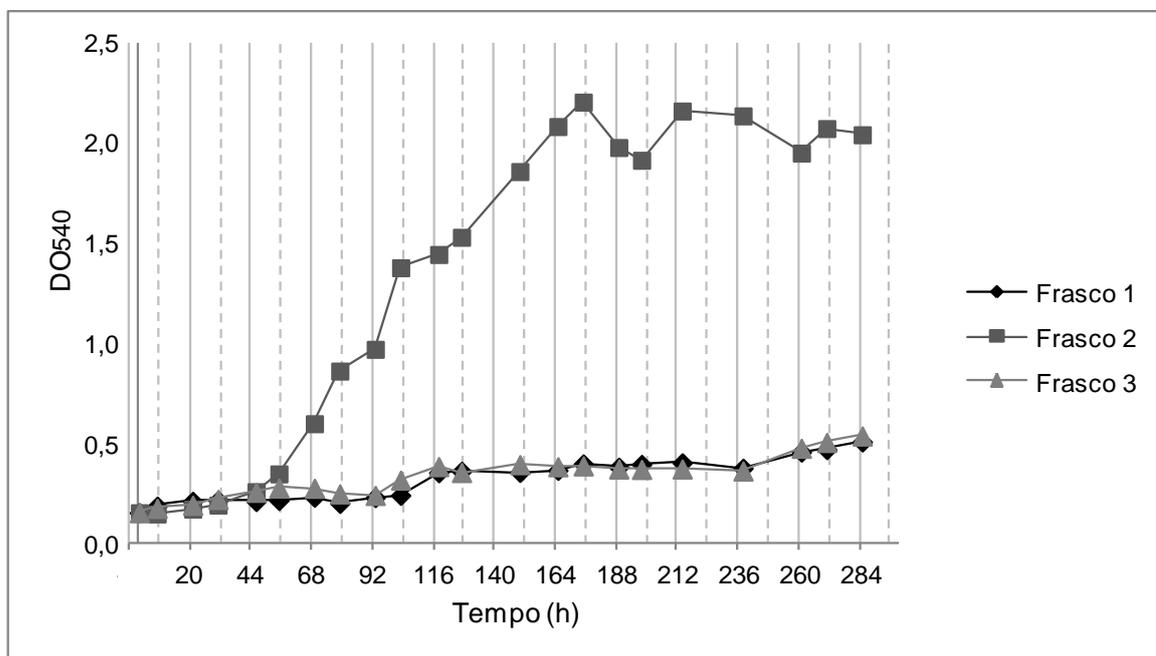


FIGURA 11 – CURVA DE CRESCIMENTO DE MIX1 (1º EXPERIMENTO DA COMPARAÇÃO ENTRE CEPAS)

NOTA: As linhas de grade verticais contínuas indicam o início do período iluminado, enquanto que as linhas de grade verticais tracejadas indicam o término.

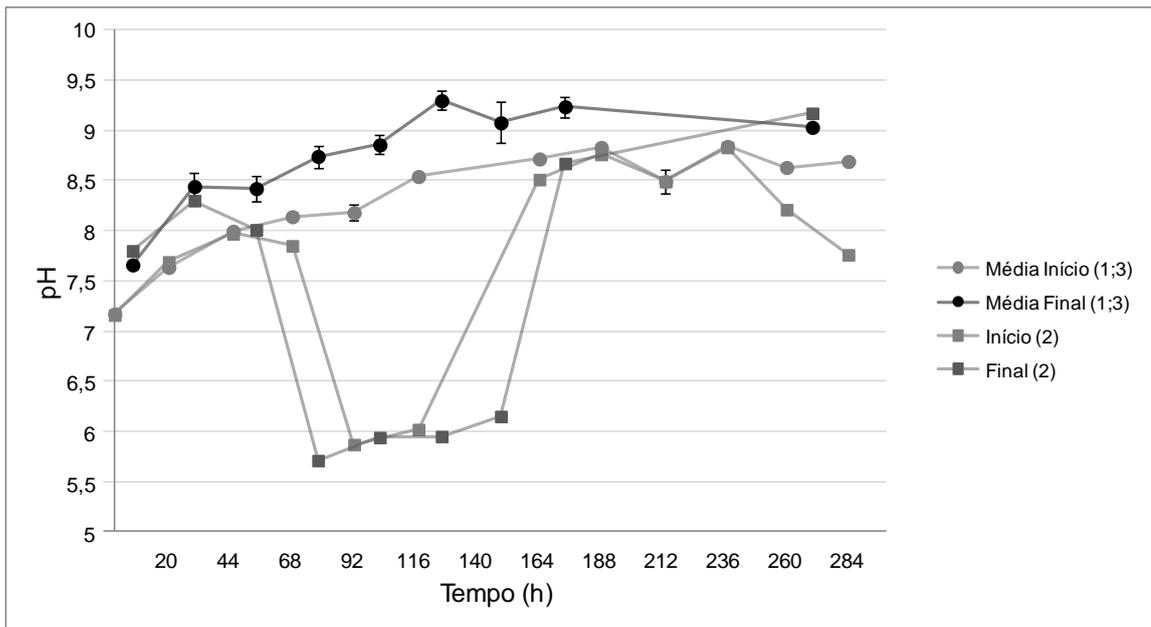


FIGURA 12 - VALORES DE pH AO LONGO DO CULTIVO DE MIX1 (1º EXPERIMENTO DA COMPARAÇÃO ENTRE CEPAS)

Por análise em microscopia óptica, constatou-se que os frascos 1 e 3 continham microalgas de células ovais de gênero não identificado, que apresentavam-se livres ou em aglomerados com microalgas filamentosas segmentadas, também sem gênero identificado (FIGURA 13 - A, B). Os frascos também continham células de microalgas do gênero *Scenedesmus* (FIGURA 13 - B). Os aglomerados eram visíveis a olho nu e decantavam mesmo com a aplicação de uma agitação contínua gerada pela aeração. Estes aglomerados também estavam inicialmente presentes frasco 2, mas quando o comportamento do frasco começou a divergir dos outros, as características microscópicas mudaram. As proporções de aglomerados celulares e de *Scenedesmus* diminuíram, enquanto a proporção de células ovais livres aumentou (FIGURA 13-C).



FIGURA 13 – MICROSCOPIA ÓPTICA (400X) AO FINAL DOS CULTIVOS DE MIX1 (1º EXPERIMENTO DE COMPARAÇÃO DE CEPAS MISTAS)

LEGENDA:

- (A) Aglomerados de microalgas ovais e filamentosas segmentadas nos frascos 1 e 3;
- (B) Células de microalgas do gênero *Scenedesmus* e células livres de microalgas ovais nos frascos 1 e 3;
- (C) Células livres de microalgas ovais após divergência do frasco 2.

Nos cultivos de Mix2, os três frascos apresentaram o mesmo perfil da curva de crescimento (FIGURA 14): uma fase de aumento linear de  $DO_{540}$  até 214 h, seguida de uma queda dos valores de  $DO_{540}$ . As curvas da triplicata ficaram próximas até 127 h de cultivo, a partir de quando divergiram. Ao final da fase linear de crescimento, a  $DO_{540}$  média do cultivo de Mix2 foi de  $1,61 \pm 0,18$ .

Entre 46 e 127 h, a  $DO_{540}$  apresentou um perfil em formato de zigue-zague. O perfil em zigue-zague deve-se às pequenas quedas de concentração de microalgas que ocorrem durante o período não iluminado, fase em que ocorre a respiração aeróbia. Esse perfil somente é observado quando são realizadas mais de uma leitura de densidade óptica durante o dia (KASTÁNEK, F. *et al.*, 2010), o que geralmente não é realizado pelos autores.

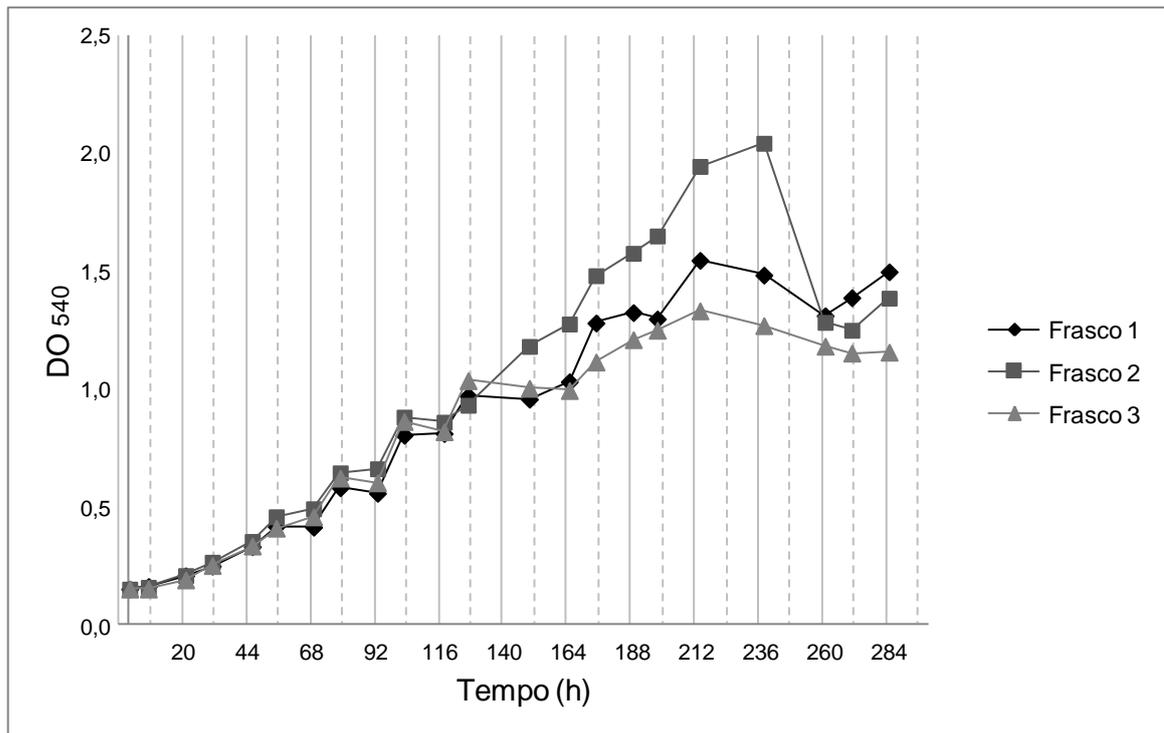


FIGURA 14 – CURVA DE CRESCIMENTO DE MIX2 (1º EXPERIMENTO DA COMPARAÇÃO ENTRE CEPAS)

NOTA: As linhas de grade verticais contínuas indicam o início do período iluminado, enquanto que as linhas de grade verticais tracejadas indicam o término.

Os valores médios de pH da triplicata de Mix2 aumentaram de 7 no início do cultivo até atingir patamares após 118 hora, com valores entre 8,8 e 9,5 no início do período iluminado e entre 10,2 e 10,6 no final do período iluminado (FIGURA 15). Esse comportamento foi coerente com o esperado de um cultivo fotoautotrófico de microalgas: tanto um aumento do pH com o aumento da concentração de células, como valores de pH menores no início do período iluminado e maiores no final do período iluminado. Apesar do erro padrão da média da DO<sub>540</sub> de Mix2 aumentar gradativamente ao longo do cultivo, os valores do erro padrão da média do pH não aumentaram.

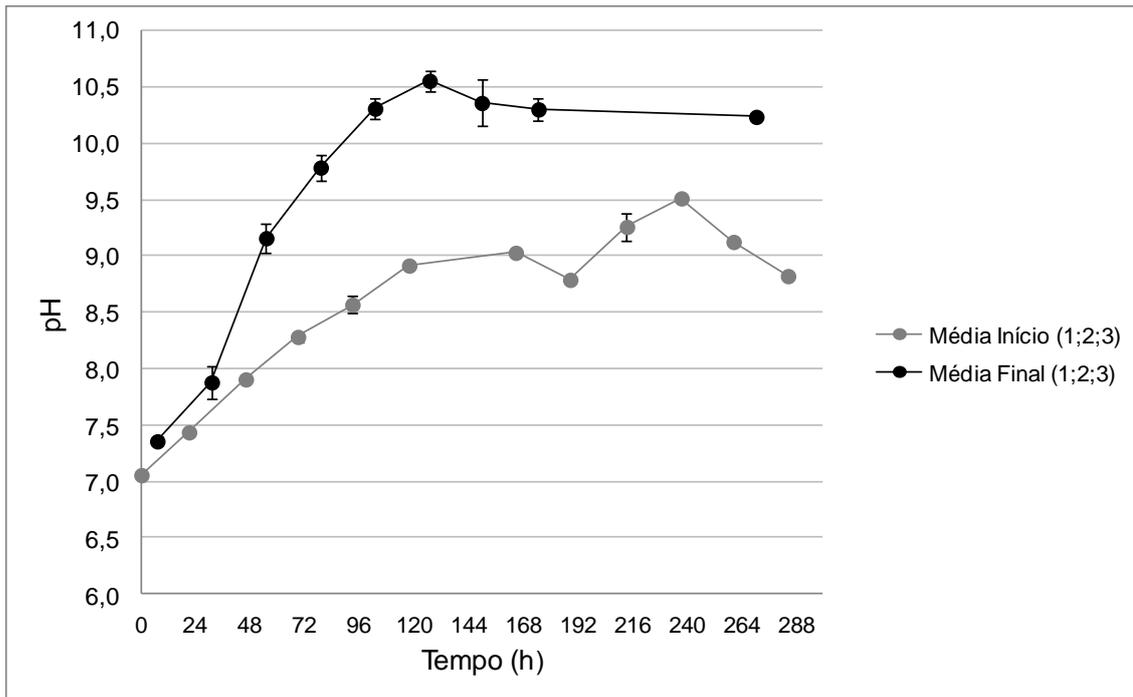


FIGURA 15 - MÉDIA DO pH AO LONGO DO CULTIVO DE MIX2 (1º EXPERIMENTO DA COMPARAÇÃO ENTRE CEPAS)

NOTA: As barras de erro representam o erro padrão da média.

A análise em microscopia óptica mostrou que os três frascos de Mix2 apresentavam a mesma diversidade de microalgas, majoritariamente células do gênero *Scenedesmus* e células filamentosas segmentadas de gênero não identificado (FIGURA 16).

Ao final dos cultivos de Mix1 e Mix2, os valores de biomassa seca (FIGURA 17) são coerentes com os valores de  $DO_{540}$  (FIGURAS 11 e 14). A relação entre  $DO_{540}$  e biomassa seca ( $mg.L^{-1}$ ) é diferente para cada cepa, portanto, em um mesmo gráfico, é possível comparar os perfis de  $DO_{540}$ , mas não é possível concluir sobre as concentrações relativas de biomassa (FIGURA 18). Uma  $DO_{540}$  próxima a 1,4 representou  $772 mg.L^{-1}$  de biomassa seca no cultivo de Mix1 e  $384 mg.L^{-1}$  no cultivo de Mix2. Esta diferença deve-se provavelmente às variações na distribuição de espécies entre cultivos de Mix1 e Mix2.

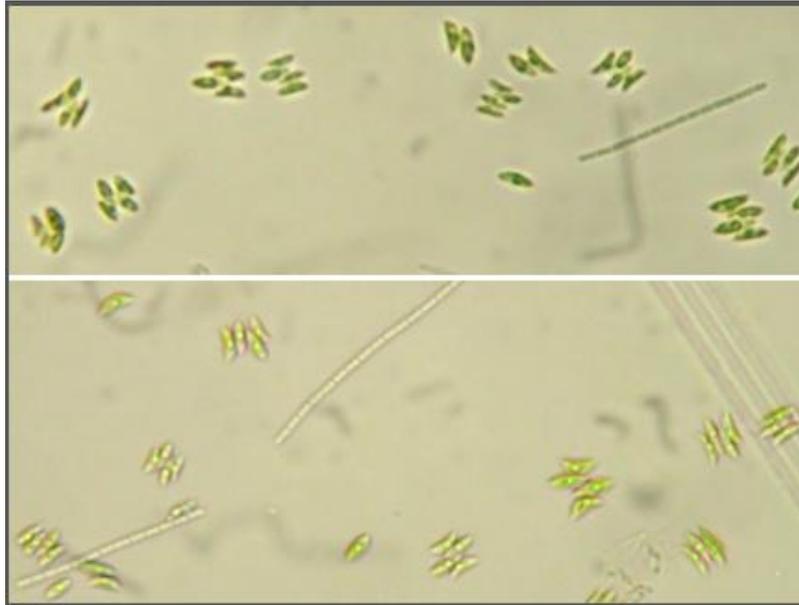


FIGURA 16 - MICROSCOPIA ÓPTICA (400X) DOS CULTIVOS DE MIX2 (1º EXPERIMENTO DA COMPARAÇÃO ENTRE CEPAS)

	Biomassa seca (mg.L <sup>-1</sup> )	
	Mix 1	Mix 2
Frasco 1	241	384
Frasco 2	984	408
Frasco 3	246	349

FIGURA 17 – BIOMASSA SECA AO FINAL DO 1º EXPERIMENTO DA COMPARAÇÃO ENTRE CEPAS

### 5.1.2 Segundo experimento

O segundo experimento teve o objetivo de averiguar se a grande produção de biomassa no cultivo de Mix1 era reprodutível. Para isso, uma amostra do frasco 2 do primeiro experimento foi usada para produzir inóculo para uma nova triplicata de

cultivos Mix1. Também foi testada a reprodutibilidade de Mix2 através da realização de uma nova triplicata de cultivos.

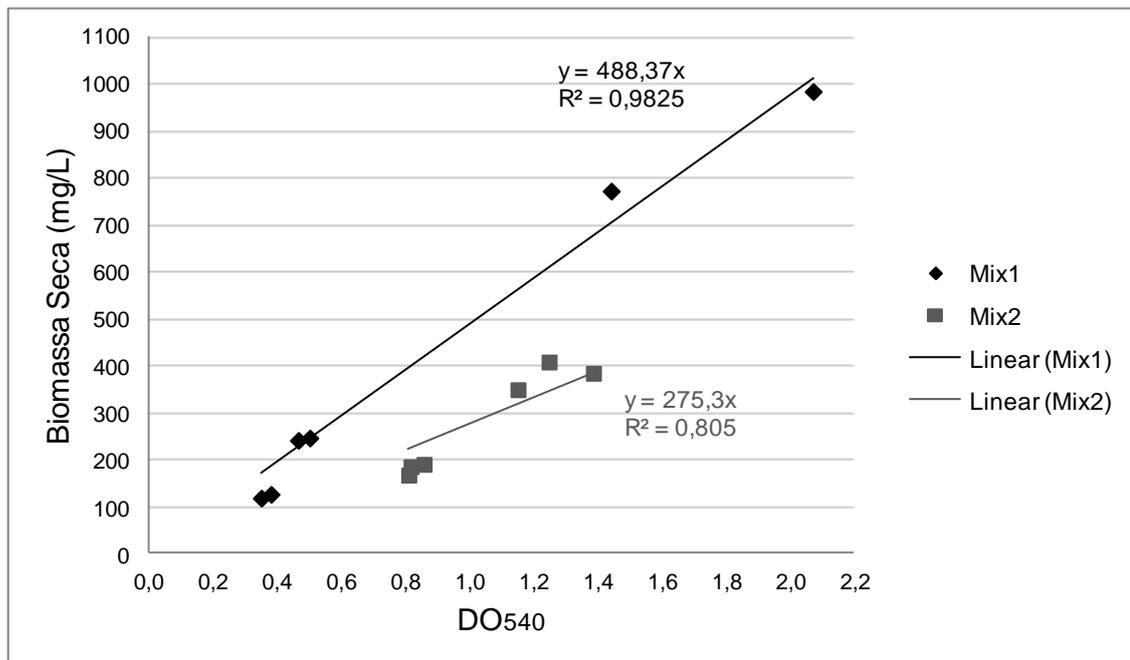


FIGURA 18 – CURVAS DE CALIBRAÇÃO ENTRE BIOMASSA SECA E DO<sub>540</sub> PARA MIX1 E MIX2 (1º EXPERIMENTO DE COMPARAÇÃO ENTRE CEPAS)

NOTA: As amostras foram retiradas em dois momentos do cultivo, no meio e no fim. As linhas de tendência possuem interseção na origem.

O grande aumento de DO<sub>540</sub> obtido no frasco 2 de Mix1 no primeiro experimento não se repetiu na triplicata do segundo experimento. Inicialmente a produção de inóculo de Mix1 teve que ser repetida, pois não foi possível alcançar valores de DO<sub>540</sub> maiores que 0,8 após 6 dias de cultivo. No cultivo teste, a triplicata teve um comportamento semelhante aos frascos 1 e 3 de Mix1 no primeiro experimento, ou seja, um crescimento lento e linear que alcançou um valor de DO<sub>540</sub> média de  $0,43 \pm 0,02$  após 137 h (FIGURA 19). Neste tempo, os frascos com Mix1 passaram de uma coloração verde para uma coloração marrom.

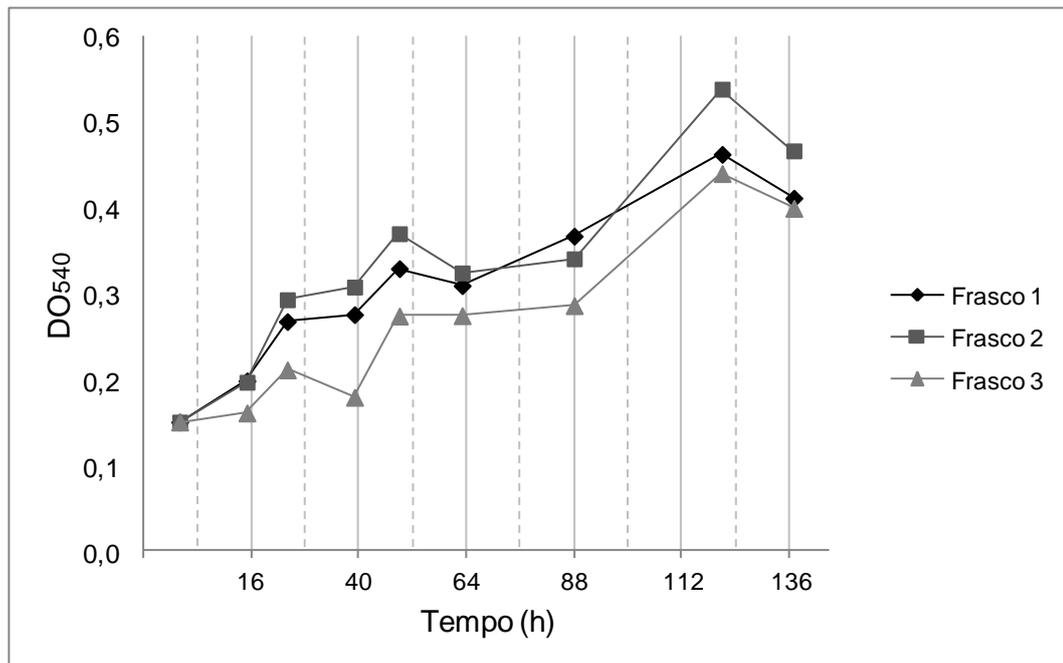


FIGURA 19 - CURVA DE CRESCIMENTO DE MIX1 (2° EXPERIMENTO DA COMPARAÇÃO ENTRE CEPAS)

NOTA: As linhas de grade verticais contínuas indicam o início do período iluminado, enquanto que as linhas de grade verticais tracejadas indicam o término.

A triplicata de cultivos de Mix2 apresentou crescimento linear até 213 h e alcançou máxima DO<sub>540</sub> média de  $2,23 \pm 0,05$  no início da fase estacionária (237ª hora) (FIGURA 20). Os valores de pH aumentaram de 7,5 até atingir patamares, a partir de 121 h, entre 8,9 e 9,4 para medidas no início do período iluminado e entre 9,7 e 10 para medidas no final do período iluminado (FIGURA 20).

Tanto no 1° (Seção 5.1.1) quanto no 2° experimento, os cultivos de Mix2 apresentaram crescimento aproximadamente linear durante 9 dias, e o pH, após atingir um patamar, permaneceu em torno de 9 no início do período iluminado e em torno de 10 no final do período iluminado. Porém, ambas DO<sub>540</sub> e concentração de biomassa seca médias ao final do cultivo de Mix2 foram maiores no 2° experimento,  $2,23 \pm 0,05$  e  $457 \pm 19$  mg.L<sup>-1</sup> respectivamente, se comparadas às do 1° experimento,  $1,35 \pm 0,07$  e  $380 \pm 17$  mg.L<sup>-1</sup> respectivamente.

Essa diferença entre o 1° e o 2° experimento pode ter ocorrido devida à modificação na distribuição de espécies da cepa Mix2. Enquanto no 1° experimento foram encontradas majoritariamente células do gênero *Scenedesmus* e células filamentosas segmentadas de gênero não identificado, no 2° experimento a maioria das células continuavam sendo *Scenedesmus* spp. e filamentosas segmentadas, porém agora também estavam presentes células filamentosas não segmentadas (FIGURA 21).

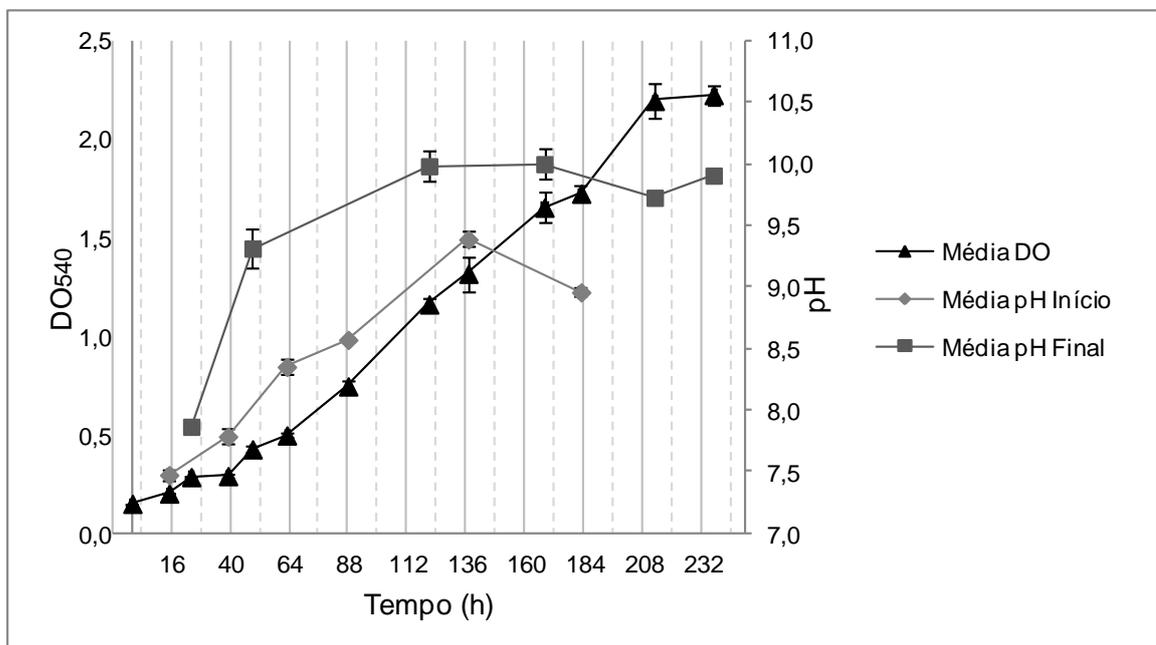


FIGURA 20 – MÉDIAS E ERRO PADRÃO DA MÉDIA PARA DO<sub>540</sub> E pH AO LONGO DO CULTIVO DE MIX2 (2° EXPERIMENTO DA COMPARAÇÃO ENTRE CEPAS)

NOTA: As linhas de grade verticais contínuas indicam o início do período iluminado, enquanto que as linhas de grade verticais tracejadas indicam o término. As barras de erro representam o erro padrão da média.

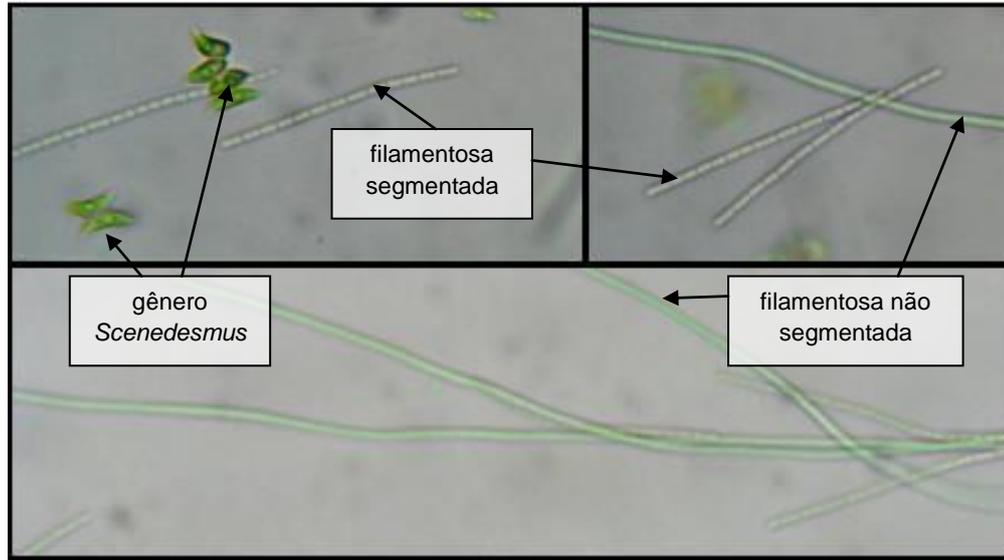


FIGURA 21 - MICROSCOPIA ÓPTICA (400X) DOS CULTIVOS DE MIX2 (2º EXPERIMENTO DE COMPARAÇÃO DE CEPAS)

A relação biomassa seca *versus*  $DO_{540}$  não se manteve do 1º para o 2º experimento, amostras do cultivo de Mix2 com aproximadamente  $380 \text{ mg.L}^{-1}$  apresentaram valores de  $DO_{540}$  em torno de 1,4 no 1º experimento e 1,8 no 2º experimento (FIGURA 22). Esta diferença provavelmente deve-se à mudança na distribuição de espécies que ocorreu no cultivo de Mix2 do 1º experimento para o 2º experimento. Portanto, uma única curva de calibração não é adequada para representar a relação concentração de biomassa seca *versus*  $DO_{540}$  para cultivos de Mix2 não simultâneos.

Optou-se por seguir os experimentos com Mix2, uma vez que a cepa Mix1 apresentou desvantagens, como o grande erro padrão entre as triplicatas (1º experimento), a dificuldade em alcançar valores de  $DO_{540}$  superiores a 0,8 (2º experimento) e a baixa reprodutibilidade dos resultados.

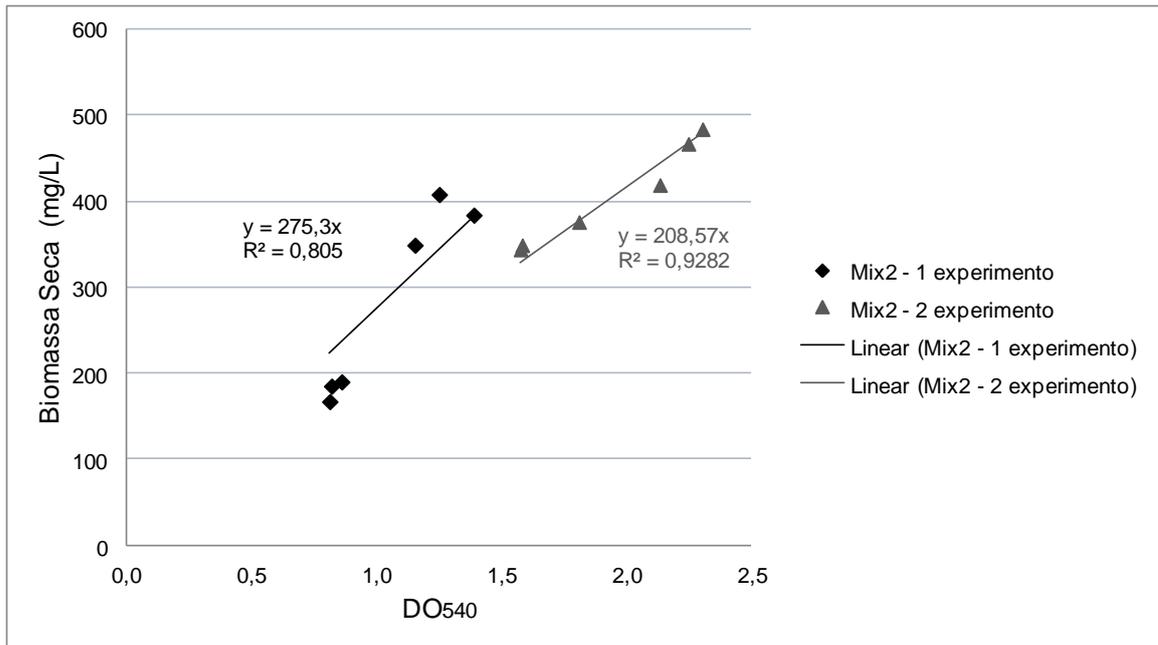


FIGURA 22 - BIOMASSA SECA *versus* DO<sub>540</sub> DOS CULTIVOS DE MIX2 NO 1° E NO 2° EXPERIMENTO

NOTA: As amostras foram retiradas em dois momentos do cultivo, no meio e no fim. As linhas de tendência possuem interseção na origem.

## 5.2 COMPARAÇÃO ENTRE CULTIVOS COM ATMOSFERA PADRÃO E ENRIQUECIDA COM 2% DE CO<sub>2</sub>

Os experimentos realizados nessa etapa tiveram como objetivo avaliar os efeitos que uma aeração enriquecida com 2% de CO<sub>2</sub> no período iluminado ocasiona no perfil de DO<sub>540</sub>, nos valores de pH e na produção de biomassa e lipídeos dos cultivos de Mix2, comparando-os com cultivos com aeração padrão (inserção de ar atmosférico).

A partir das curvas de crescimento dos cultivos de Mix2 em atmosfera padrão, observa-se um grande desvio de comportamento entre os frascos da triplicata (FIGURA 23). O frasco 1 manteve um crescimento aproximadamente linear

ao longo das 200 h de experimento, alcançando uma  $DO_{540}$  máxima nesse período de 0,997. Inicialmente o frasco 2 apresentou um crescimento aproximadamente linear semelhante ao frasco 1, mas entrou em estado estacionário após 152 horas de cultivo, quando atingiu sua  $DO_{540}$  máxima de 0,797. O frasco 3 apresentou um crescimento mais lento se comparado aos outros frascos e iniciou o estado estacionário após apenas 72 h de cultivo ( $DO_{540}$  máxima de 0,374), seguido de queda nos valores de  $DO_{540}$  após 128 h.

Ao contrário do que ocorreu no experimento com atmosfera padrão, os três frascos de Mix2 com aeração enriquecida a 2% de  $CO_2$  apresentaram perfis de crescimento muito semelhantes (FIGURA 24). Os cultivos apresentaram um crescimento aproximadamente linear ao longo das 200 h de experimento, alcançando uma  $DO_{540}$  máxima nesse período de  $0,934 \pm 0,029$ .

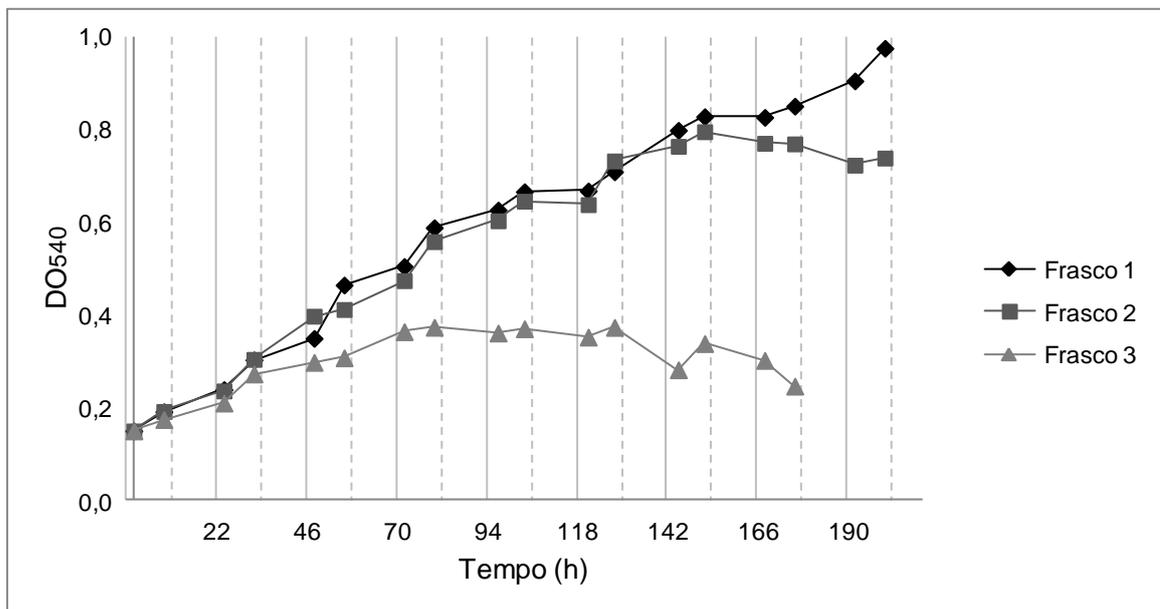


FIGURA 23 – CURVA DE CRESCIMENTO DE MIX2 EM ATMOSFERA PADRÃO

NOTA: As linhas de grade verticais contínuas indicam o início do período iluminado, enquanto que as linhas de grade verticais tracejadas indicam o término.

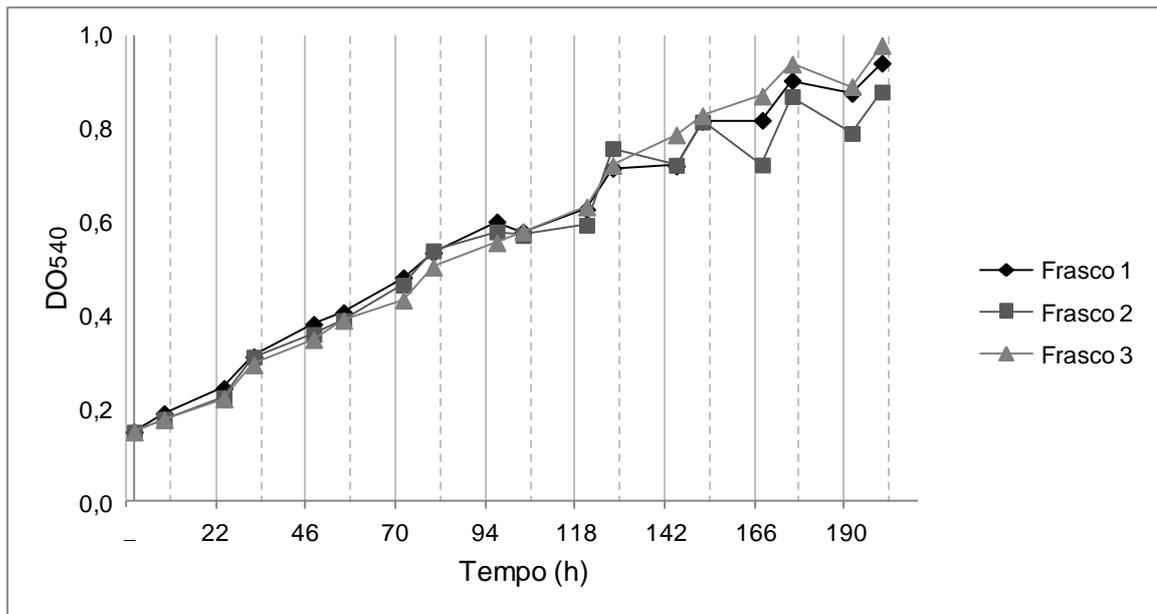


FIGURA 24 – CURVA DE CRESCIMENTO DE MIX2 EM ATMOSFERA ENRIQUECIDA COM 2% DE CO<sub>2</sub> (v/v)

NOTA: As linhas de grade verticais contínuas indicam o início do período iluminado, enquanto que as linhas de grade verticais tracejadas indicam o término.

A partir de 121 h, os valores de pH do frasco 3 com aeração padrão permaneceram constantes e em torno de 8,2, indicando a falta do metabolismo fotossintético e a morte das células de microalgas. Portanto, os dados do frasco 3 foram descartados para o cálculo dos valores médios de pH do cultivo com aeração padrão. Os valores de pH médios para cultivo com aeração padrão seguiram o comportamento esperado para uma condição fotoautotrófica de iluminação periódica (Seção 5.1.1) (FIGURA 25).

Os valores de pH para os cultivos com atmosfera enriquecida também aumentaram com o aumento da concentração celular, atingindo patamares após 97 h de experimento. Estes cultivos alcançaram valores médios de pH, após estabelecido um patamar, entre 8,81 e 8,98 no início do período iluminado e entre 6,96 e 7,12 no final do período iluminado (FIGURA 25). Este comportamento, com valores de pH maiores no início do período iluminado e menores no final do período

iluminado, é o oposto daquele encontrado no experimento de atmosfera padrão, mas é coerente para um cultivo com atmosfera enriquecida de CO<sub>2</sub>. O CO<sub>2</sub> dissolvido reage com a água e produz ácido carbônico, que se dissocia e libera íons H<sup>+</sup>. A inserção de uma atmosfera enriquecida faz com que a velocidade de fornecimento de CO<sub>2</sub> para o meio exceda a velocidade de utilização de CO<sub>2</sub> pelas células, causando o aumento do CO<sub>2</sub> dissolvido e consequente diminuição do pH no meio (ANDERSEN, 2005).

Como demonstrado na seção 5.1.2, uma única curva de calibração não foi adequada para representar a relação concentração de biomassa seca *versus* DO<sub>540</sub> para cultivos de Mix2 não simultâneos (FIGURA 22). Como essa relação depende da distribuição de espécies, que também pode ser modificada por diferentes condições aplicadas a cultivos simultâneos, optou-se por realizar uma curva de calibração para cada condição de aeração. As curvas de crescimento baseadas em DO<sub>540</sub> não devem ser plotadas em um mesmo gráfico a fim de comparar a quantidade de biomassa produzida por cultivos diferentes, pois a relação entre concentração de biomassa seca e DO<sub>540</sub> pode ser diferente. Portanto, para comparar a quantidade de biomassa produzida ao longo do tempo nos cultivos sem e com atmosfera enriquecida (2% CO<sub>2</sub> v/v), as curvas de crescimento em DO<sub>540</sub> foram transformadas para biomassa seca (mg.L<sup>-1</sup>) utilizando a curva de calibração correspondente (FIGURA 26).

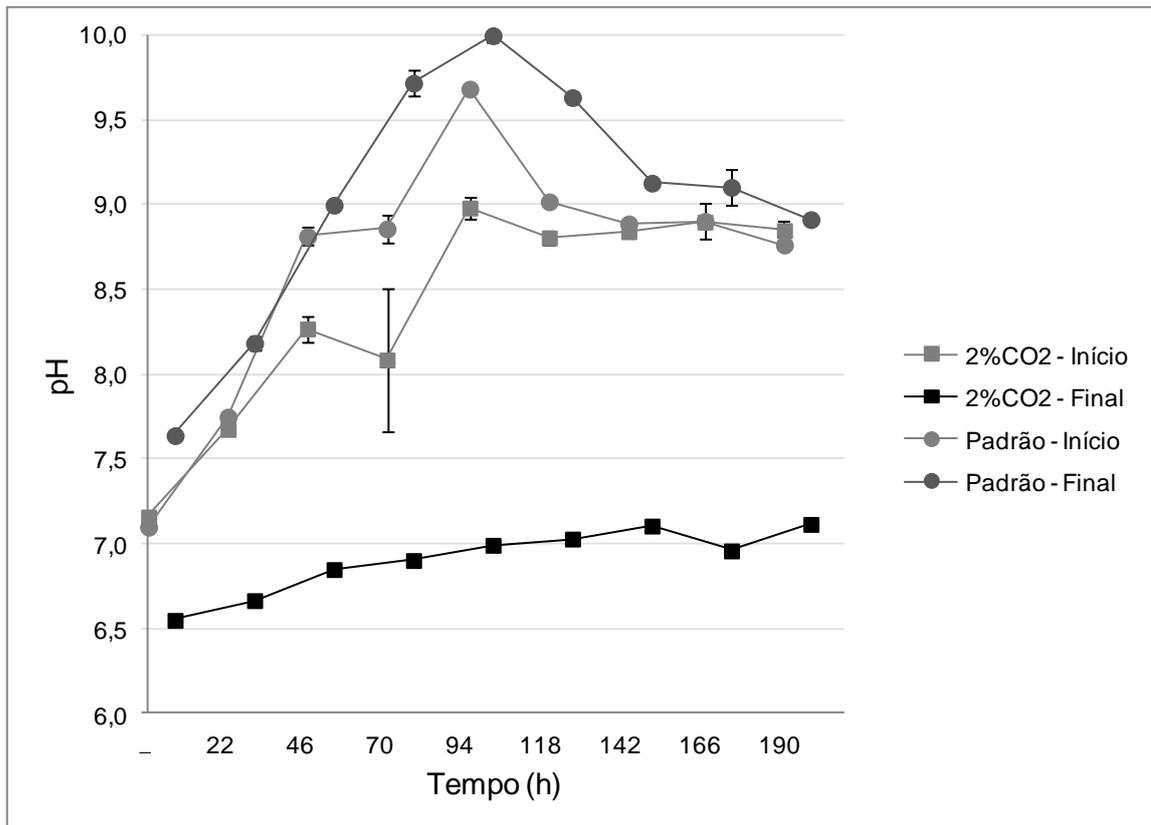


FIGURA 25 – VALORES DE pH AO LONGO DO CULTIVO DA CEPA MIX2 COM E SEM AERAÇÃO ENRIQUECIDA COM CO<sub>2</sub> A 2%(v/v)

NOTA: As barras de erro representam o erro padrão da média.

Apesar da relação linear entre concentração de biomassa seca e DO<sub>540</sub> ter sido semelhante para os cultivos com atmosfera padrão e com atmosfera enriquecida a 2% de CO<sub>2</sub>, cada condição teve sua curva de calibração calculada (FIGURA 26). A relação concentração de biomassa seca *versus* DO<sub>540</sub> se manteve semelhante entre as duas condições de aeração pois, ao contrário do que ocorreu entre o 1° e o 2° experimento de comparação entre cepas, a distribuição de espécies se manteve semelhante nas duas condições: majoritariamente microalgas do gênero *Scenedesmus* e microalgas com células filamentosas segmentadas.

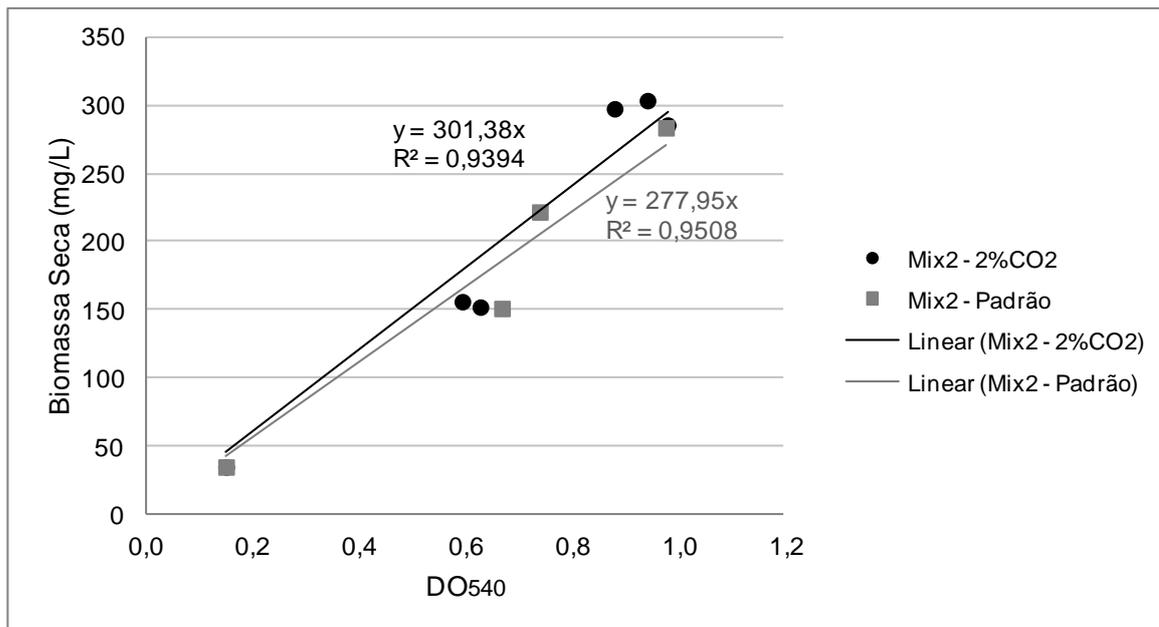


FIGURA 26 - BIOMASSA SECA *versus* DO<sub>540</sub> DOS CULTIVOS DE MIX2 COM E SEM SUPLEMENTAÇÃO DE CO<sub>2</sub> (2% v/v) NA AERAÇÃO

NOTA: As amostras foram retiradas em três momentos do cultivo, no início, no meio e no fim (não foram utilizadas amostras do frasco 3 com atmosfera padrão). As linhas de tendência possuem interseção na origem.

As concentrações médias de biomassa seca dos cultivos com e sem enriquecimento de CO<sub>2</sub> foram semelhantes até 121 h, a partir de quando as médias do cultivo enriquecido assumiram valores maiores (FIGURA 27). As concentrações de biomassa máxima, obtidas em 200 h de cultivo, foram de  $281 \pm 9$  mg.L<sup>-1</sup> para o cultivo com atmosfera enriquecida e de  $239 \pm 33$  mg.L<sup>-1</sup> para o cultivo com atmosfera padrão. A velocidade de crescimento na fase linear foi de 28 mg.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> para os cultivos com aeração enriquecida e 24 mg.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> para os cultivos com aeração padrão. O conteúdo de lipídeos totais na biomassa seca ao final do cultivo alcançou  $15,1 \pm 0,7\%$  para aeração enriquecida e  $15,4 \pm 1,3\%$  para aeração padrão.

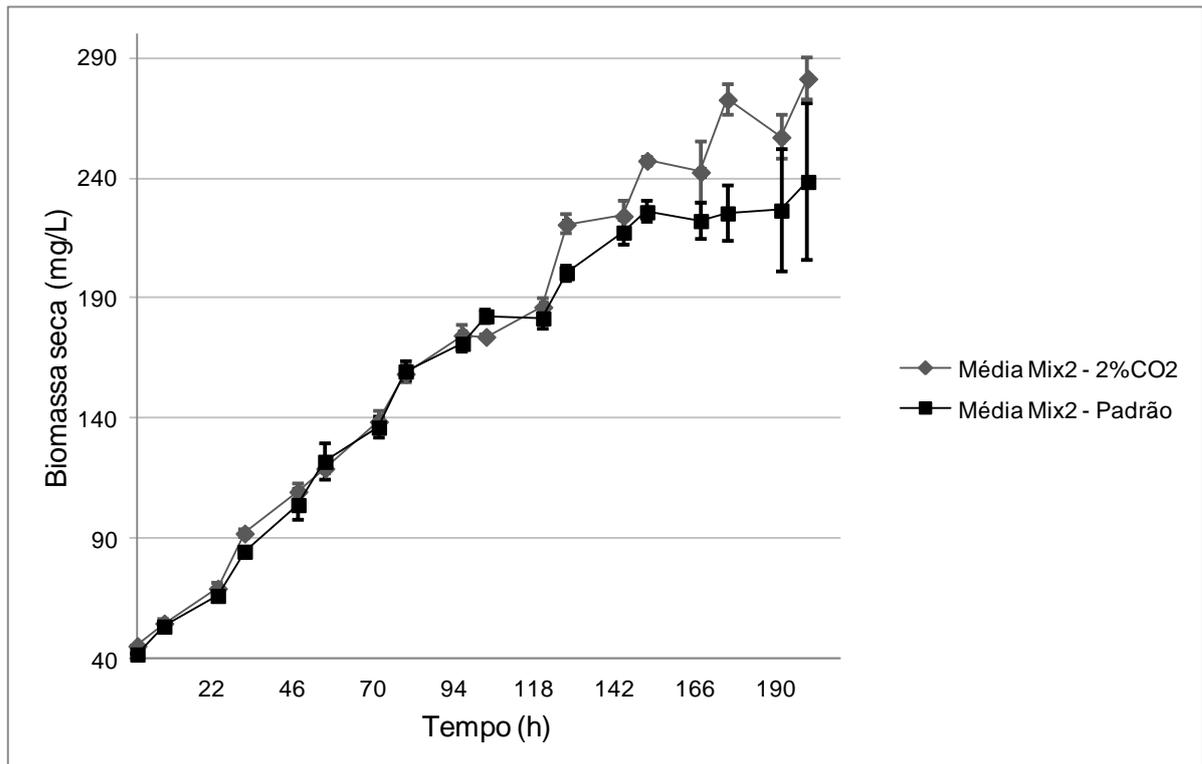


FIGURA 27 – CURVAS DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DE BIOMASSA SECA MÉDIA PARA CULTIVOS DE MIX2 EM ATMOSFERA PADRÃO E ENRIQUECIDA COM 2% DE CO<sub>2</sub> (v/v)

NOTA: As barras de erro representam o erro padrão da média.

No cultivo com aeração enriquecida, não houve frasco descartado por morte prematura das células, além disso, a velocidade de crescimento linear foi ligeiramente maior e os valores de erro padrão da média foram menores do que os encontrados no cultivo sem enriquecimento. Esses fatos demonstram que a aeração enriquecida foi uma condição mais favorável ao crescimento das microalgas, que, provavelmente, deve-se tanto por não deixar o fornecimento de carbono ser um ponto limitante, quanto por controlar o aumento do pH, baixando-o para valores em torno de 7 até o final do período iluminado. De acordo com Silva-Benavides e Torzilho (2012), a correção diária do pH de cultivos para 7 previne a volatilização da amônia e a precipitação do fósforo que ocorrem em pH básico, tornando o nitrogênio e o fósforo mais disponíveis para as células, o que favorece o crescimento. Em

ambientes com pH abaixo de 8, a maior parte da amônia está presente na forma ionizada, prevenindo sua ação tóxica às células. A precipitação do fósforo na forma de sais insolúveis de fosfato ocorre em valores de pH maiores que 8,5 (SILVA-BENAVIDES; TORZILLO, 2012). Nos três cultivos da cepa Mix2 com atmosfera padrão citados anteriormente, o pH do meio alcançou valores superiores a 9 ao final do período iluminado, o que pode ter desfavorecido o crescimento.

### 5.3 COMPARAÇÃO ENTRE CULTIVOS COM ATMOSFERA PADRÃO E ENRIQUECIDA COM 5% DE CO<sub>2</sub>

Os experimentos realizados nessa etapa tiveram como objetivo avaliar os efeitos que uma aeração enriquecida com 5% de CO<sub>2</sub> no período iluminado ocasiona no perfil de DO<sub>540</sub>, nos valores de pH e na produção de biomassa e lipídeos dos cultivos de Mix2, comparando-os com cultivos com aeração padrão.

#### 5.3.1 Primeiro experimento

Os três frascos de cultivo de Mix2 em atmosfera padrão apresentaram curvas de crescimento muito semelhantes, porém houve um aumento muito pequeno da DO<sub>540</sub> dos cultivos. A DO<sub>540</sub> alcançou um patamar após apenas 48 h, com valores médios próximos a 0,4. Os valores de pH aumentaram de 7, no início do cultivo, para valores em torno de 8 após 72 h, a partir de quando não ocorreu variação periódica do pH em função do fotoperíodo. A ausência da periodicidade do pH dos cultivos indica a falta do metabolismo fotossintético, e, por consequência, a morte das células de microalgas.

A morte prematura das células de um cultivo é chamada *crash* ou colapso do cultivo, e pode ocorrer em consequência de contaminações com bactérias, fungos, vírus, zooplâncton ou insetos. Em várias partes do mundo foram relatadas contaminações de cultivos de *Scenedesmus* spp. pelo zooplâncton *Aphalidium* spp., o qual causa grande floculação das células (COPLIN, 2012). A floculação ocorreu nos três frascos de cultivo de Mix2 em atmosfera padrão, porém, a partir da análise em microscopia óptica, foi possível identificar apenas restos celulares de microalgas, ou seja, não foram observadas células de zooplâncton.

O mesmo inóculo utilizado nos cultivos com atmosfera padrão foi utilizado nos cultivos com atmosfera enriquecida a 5% de CO<sub>2</sub> (v/v). O inóculo continha majoritariamente células de microalgas do gênero *Scenedesmus* e células de microalgas filamentosas segmentadas de gênero não identificado. Esta diversidade de espécies permaneceu ao longo do cultivo com atmosfera enriquecida. O perfil de crescimento foi semelhante entre os frascos da triplicata, que apresentaram uma fase de crescimento aproximadamente linear até 151 h, seguida de uma fase estacionária (FIGURA 28). A DO<sub>540</sub> máxima, alcançada no período de cultivo, foi de 1,21±0,08.

Os valores de pH do cultivo com atmosfera enriquecida aumentaram com o aumento da concentração celular, atingindo patamares após 144 h (FIGURA 28). Os valores de pH foram maiores no início do período iluminado e menores no final do período iluminado, característica coerente para um cultivo com atmosfera enriquecida de CO<sub>2</sub> durante o período iluminado (Seção 5.2). Durante o cultivo, o pH médio medido no início do período iluminado subiu de 7,04 até alcançar um patamar entre 8,75 e 8,78, enquanto o pH médio medido no final do período iluminado subiu de 6,18 até alcançar um patamar entre 6,43 e 6,56. Como houve um aumento do fornecimento de CO<sub>2</sub> para o cultivo, os valores de pH no cultivo com 5% de CO<sub>2</sub> são menores do que os valores encontrados no cultivo enriquecido com 2% de CO<sub>2</sub> (v/v).

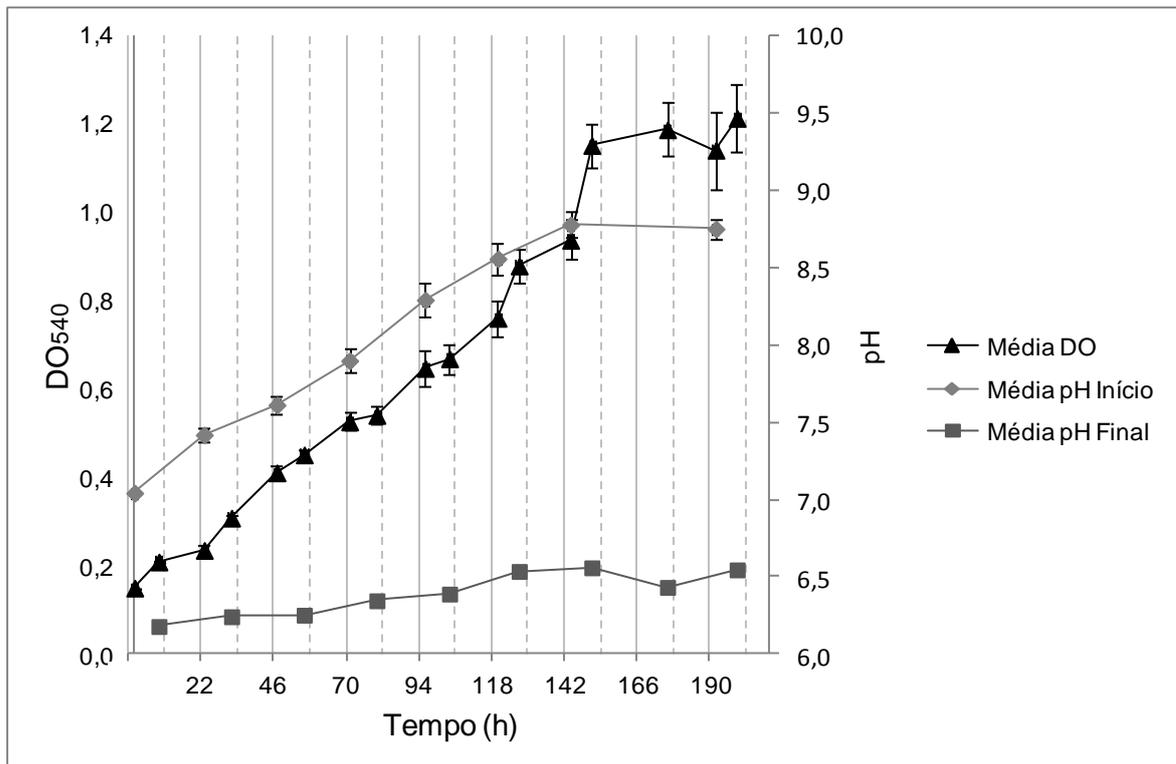


FIGURA 28 - VALORES MÉDIOS DE DO<sub>540</sub> E pH AO LONGO DO CULTIVO DE MIX2 COM ATMOSFERA A 5% (v/v) DE CO<sub>2</sub> (1° EXPERIMENTO)

NOTA: As linhas de grade verticais contínuas indicam o início do período iluminado, enquanto que as linhas de grade verticais tracejadas indicam o término. As barras de erro representam o erro padrão da média.

Para comparar a quantidade de biomassa produzida ao longo do tempo nos cultivos com atmosfera enriquecida a 2% (v/v) (Seção 5.2) e a 5% (v/v), as curvas de crescimento em DO<sub>540</sub> foram transformadas para biomassa seca utilizando a curva de calibração correspondente (FIGURA 29). As concentrações médias de biomassa seca foram maiores no cultivo com 2% (v/v), porém, a partir de 145 h de cultivo, os valores se aproximaram das concentrações médias do cultivo com 5% (v/v) e alguns intervalos de erro padrão da média destas duas condições se sobrepuseram (FIGURA 30). Vale ressaltar que todos os frascos iniciaram com uma DO<sub>540</sub> de 0,15, porém, como a relação biomassa seca *versus* DO<sub>540</sub> foi diferente para as duas

condições, os cultivos com 2% (v/v) de CO<sub>2</sub> iniciaram com uma concentração de biomassa seca maior, o que provavelmente favoreceu o cultivo. A concentração de biomassa seca máxima foi de  $281 \pm 9 \text{ mg.L}^{-1}$  no cultivo com 2% (v/v) de CO<sub>2</sub> e de  $247 \pm 15 \text{ mg.L}^{-1}$  no cultivo com 5% (v/v) de CO<sub>2</sub>.

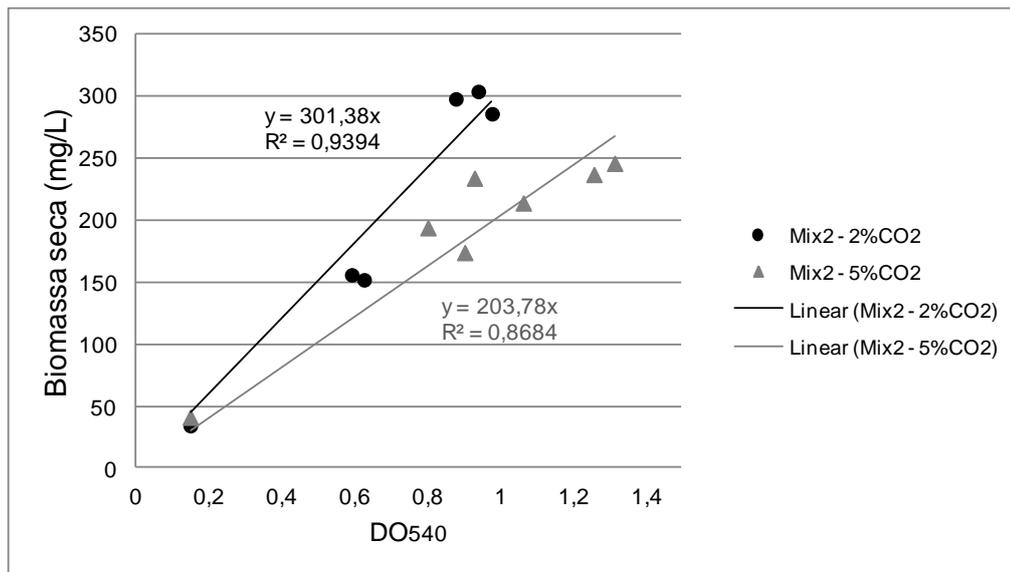


FIGURA 29 - BIOMASSA SECA *versus* DO<sub>540</sub> DOS CULTIVOS DE MIX2 COM SUPLEMENTAÇÃO DE CO<sub>2</sub> A 2% (v/v) E A 5% (v/v) NA AERAÇÃO

NOTA: As amostras foram retiradas em três momentos do cultivo, no início, no meio e no fim. As linhas de tendência possuem interseção na origem.

Apesar das concentrações médias de biomassa seca terem sido maiores no cultivo com 2% (v/v) de CO<sub>2</sub>, a média de sua velocidade de crescimento na fase linear foi menor ( $28 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ) se comparada à velocidade do cultivo com 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> ( $32 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ). O conteúdo de lipídeos totais na biomassa seca alcançou  $15,1 \pm 0,7\%$  para aeração com 2% de CO<sub>2</sub> e  $15,1 \pm 0,1\%$  para aeração com 5% de CO<sub>2</sub>.

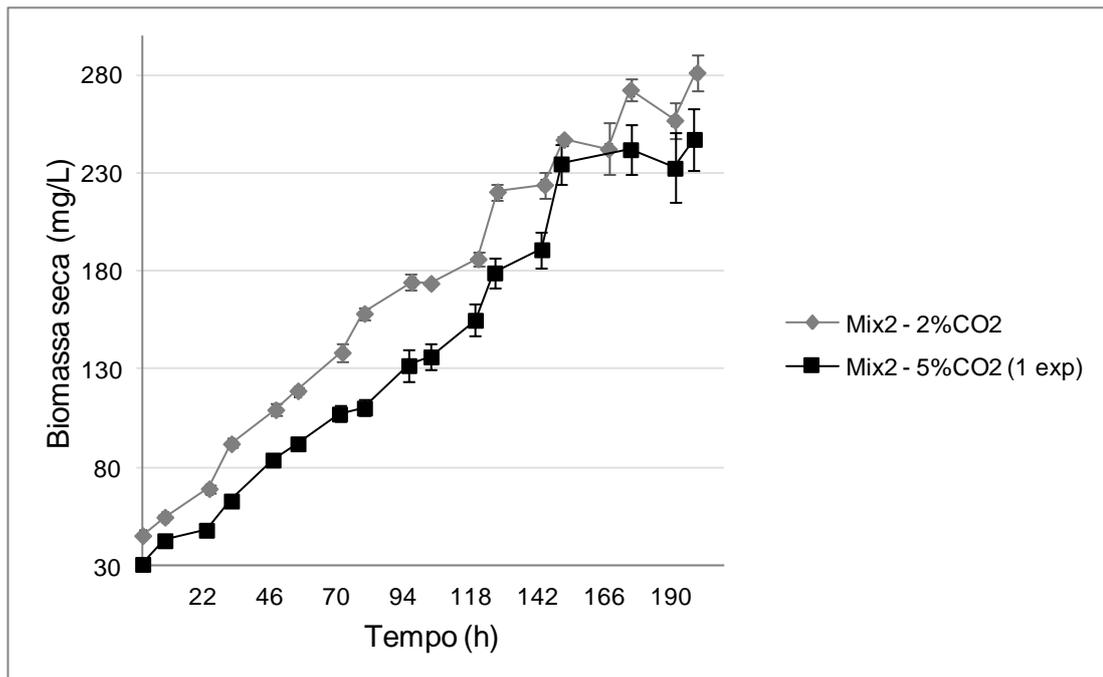


FIGURA 30 - CURVAS DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DE BIOMASSA SECA MÉDIA PARA CULTIVOS DE MIX2 EM ATMOSFERA COM 2% (v/v) E 5% (v/v) DE CO<sub>2</sub>

NOTA: As barras de erro representam o erro padrão da média.

### 5.3.2 Segundo experimento

No segundo experimento, os cultivos com atmosfera padrão e com atmosfera enriquecida com CO<sub>2</sub> a 5% (v/v) apresentaram um aumento aproximadamente linear da DO<sub>540</sub>. Os valores médios de DO<sub>540</sub> foram ligeiramente maiores no cultivo com atmosfera enriquecida, porém, a partir de 127 h de cultivo, os intervalos de erro padrão da média se sobrepuseram em todos os pontos (FIGURA 31). Os valores de erro padrão da média foram aumentando ao longo do cultivo para as duas condições de aeração, porém os desvios foram maiores no cultivo com aeração padrão.

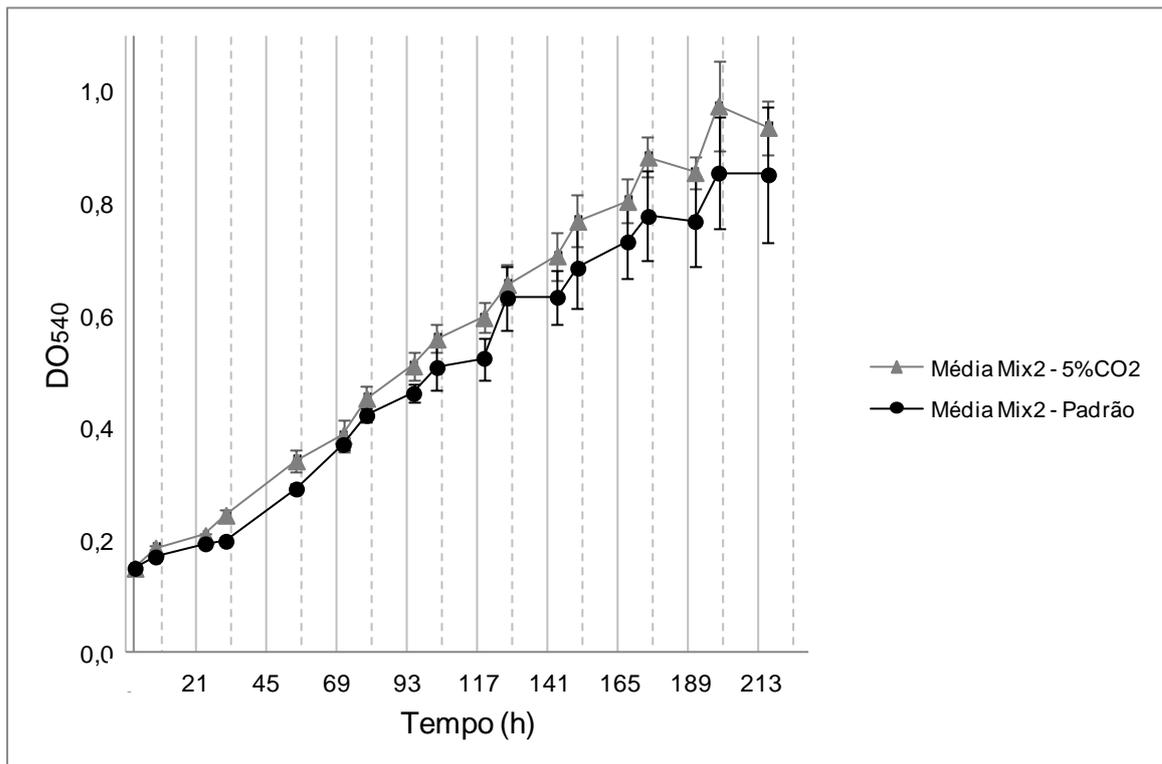


FIGURA 31 – CURVA DE CRESCIMENTO DE CULTIVOS DE MIX2 COM ATMOSFERA PADRÃO E COM ATMOSFERA ENRIQUECIDA COM 5% (v/v) DE CO<sub>2</sub> (2º EXPERIMENTO)

NOTA: As linhas de grade verticais contínuas indicam o início do período iluminado, enquanto que as linhas de grade verticais tracejadas indicam o término. As barras de erro representam o erro padrão da média.

Na condição com aeração padrão, os valores de pH foram menores no início do período iluminado e maiores no final do período iluminado, característica coerente para um cultivo com atmosfera padrão (Seção 5.1) (FIGURA 32). Nessa condição de aeração, o pH médio aumentou com o aumento da concentração celular, atingindo valores, após 127 h, entre 8,37 e 8,83 no início do período iluminado e entre 8,93 e 9,23 no final do período iluminado. Na condição com atmosfera enriquecida, os valores de pH foram maiores no início do período iluminado e menores no final do período iluminado, que é um padrão coerente para cultivos com atmosfera enriquecida de CO<sub>2</sub> (Seção 5.2) (FIGURA 32). Ao longo do

cultivo, o pH médio no início do período iluminado subiu de 7,09 no início do cultivo para valores entre 8,43 e 8,75 após 120 h, enquanto o pH médio no final do período iluminado subiu de 6,19 no início do cultivo para valores entre 6,44 e 6,73 após 120 h. Os valores de pH encontrados no segundo experimento com atmosfera enriquecida a 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> são muito semelhantes aos encontrados no primeiro experimento dessa mesma condição (Seção 5.3.1).

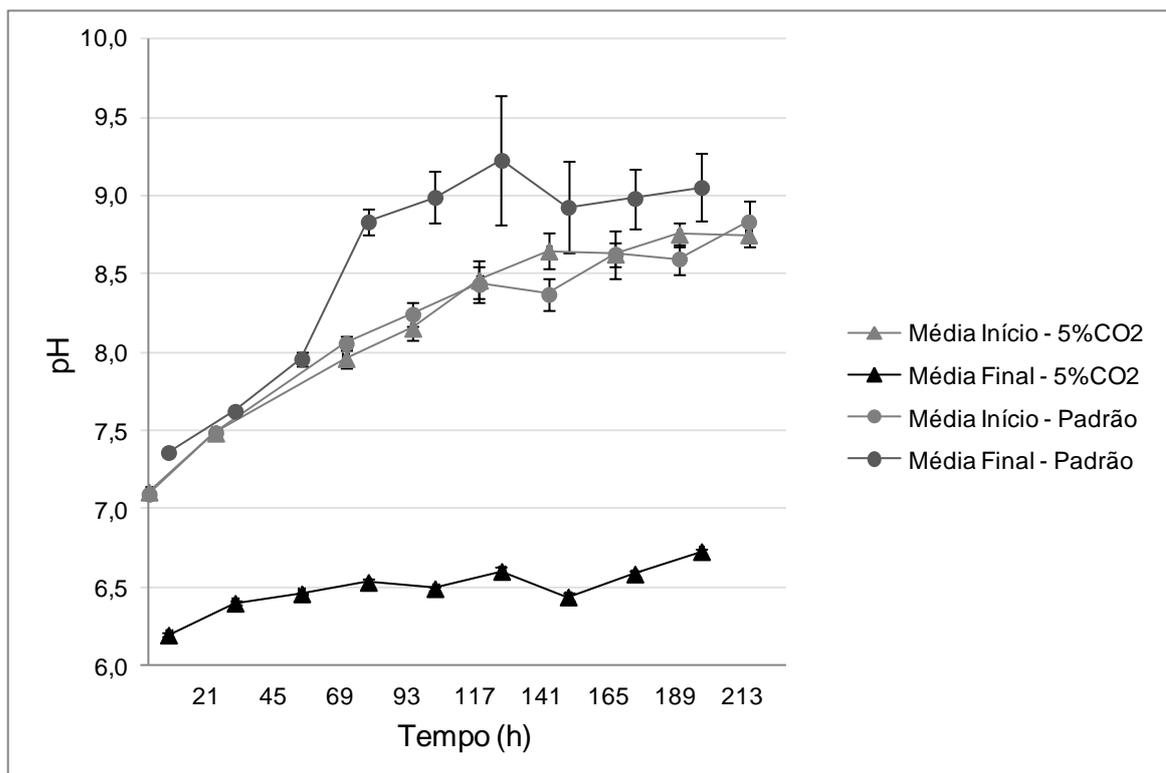


FIGURA 32 – VALORES DE pH AO LONGO DO CULTIVO DE MIX2 COM E SEM AERAÇÃO ENRIQUECIDA COM CO<sub>2</sub> A 5% (v/v)

NOTA: As barras de erro representam o erro padrão da média.

Para comparar a quantidade de biomassa produzida ao longo do tempo nos cultivos com e sem atmosfera enriquecida a 5% (v/v) de CO<sub>2</sub>, as curvas de crescimento em DO<sub>540</sub> foram transformadas para biomassa seca utilizando a curva de calibração correspondente (FIGURA 33). As concentrações médias de biomassa

seca foram sempre maiores na condição com atmosfera enriquecida (FIGURA 34). A máxima concentração de biomassa seca no período de cultivo e a velocidade de crescimento na fase linear foram de  $185 \pm 15 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $17 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ , respectivamente, no cultivo com atmosfera enriquecida e de  $133 \pm 19 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $12 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ , respectivamente, no cultivo com atmosfera padrão. O conteúdo de lipídeos totais na biomassa seca alcançou  $15,1 \pm 0,2\%$  para aeração padrão e  $11,9 \pm 0,2\%$  para aeração com 5% de  $\text{CO}_2$ .

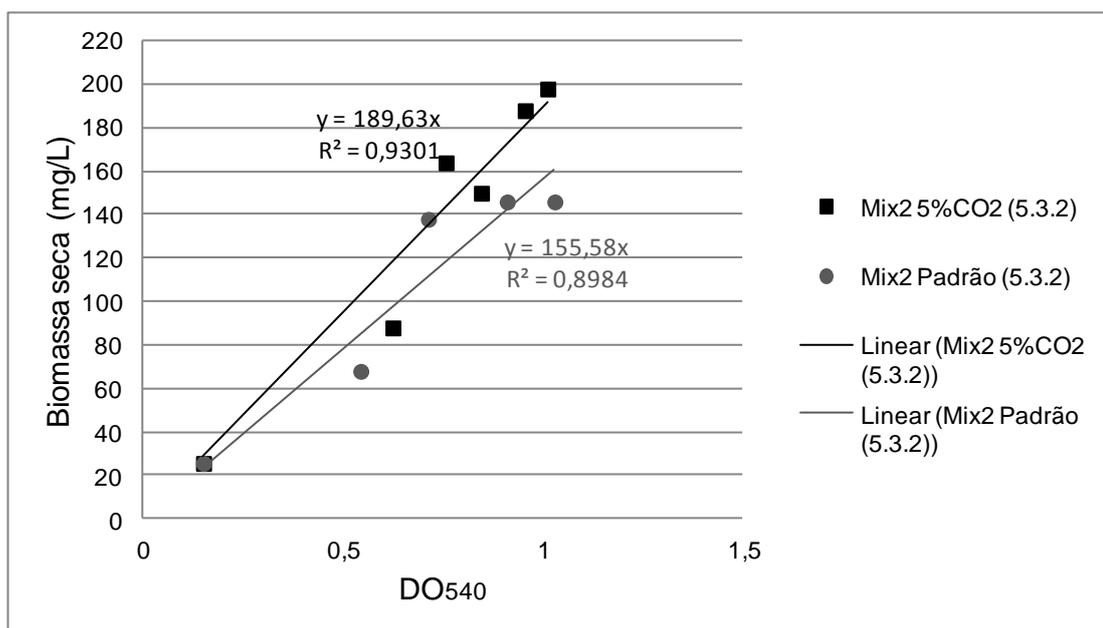


FIGURA 33 - BIOMASSA SECA *versus* DO<sub>540</sub> DOS CULTIVOS DE MIX2 COM E SEM SUPLEMENTAÇÃO DE  $\text{CO}_2$  A 5% (v/v) NA AERAÇÃO

NOTA: As amostras foram retiradas em três momentos do cultivo, no início, no meio e no fim. As linhas de tendência possuem interseção na origem.

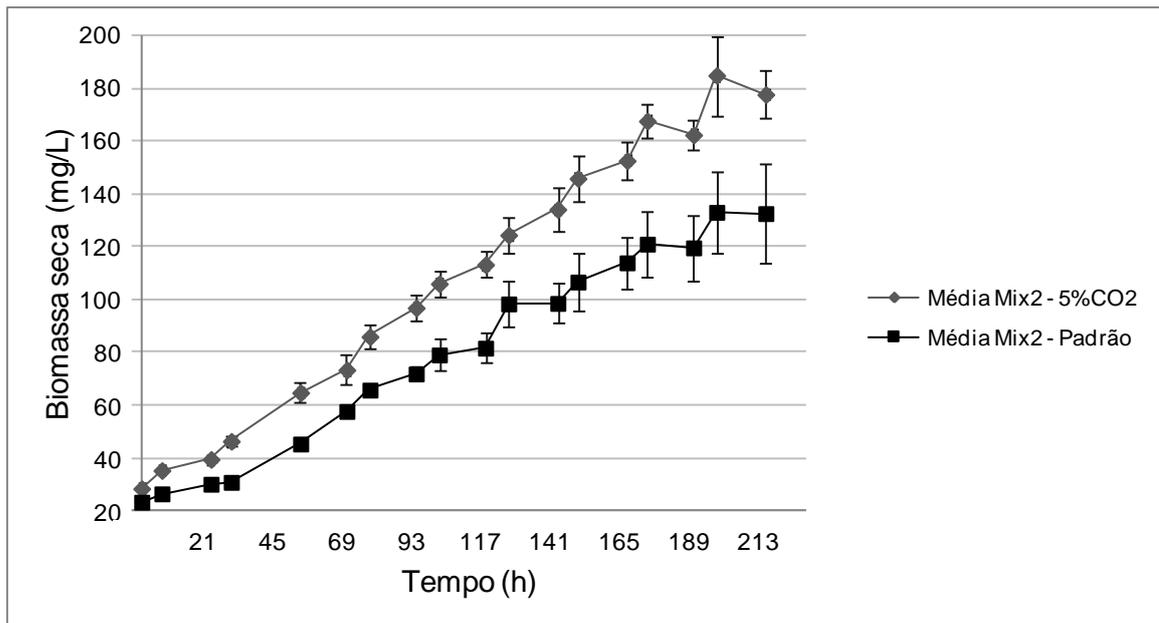


FIGURA 34 - CURVAS DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DE BIOMASSA SECA MÉDIA PARA CULTIVOS DE MIX2 COM ATMOSFERA PADRÃO E COM ATMOSFERA ENRIQUECIDA A 5% (v/v) DE CO<sub>2</sub>

NOTA: As barras de erro representam o erro padrão da média.

#### 5.4 AVALIAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE E DA REPETIBILIDADE

Para avaliar o efeito do enriquecimento da aeração com CO<sub>2</sub> sobre a produção de biomassa de Mix2, comparou-se as velocidades de crescimento na fase linear dos cultivos que continham majoritariamente microalgas do gênero *Scenedesmus* e microalgas filamentosas segmentadas de gênero não identificado (FIGURA 35).

Não foi possível avaliar com clareza se a velocidade de crescimento na fase linear foi reprodutível entre os cultivos com atmosfera padrão apresentados nas Seções 5.2 e 5.3.2, pois, apesar do valor médio de velocidade de crescimento ter sido diferente entre os dois cultivos, o intervalo de 90% de confiança da velocidade

do cultivo da Seção 5.2 supera o valor da propriedade e se sobrepõe ao intervalo do cultivo da Seção 5.3.2 (FIGURA 35). O alto valor do intervalo de confiança do cultivo com atmosfera padrão da Seção 5.2 faz com que não seja possível distinguir diferenças em relação aos outros cultivos, e deve-se à diminuição do grau de liberdade pela exclusão de um dos frascos da triplicata na análise de dados por falta de crescimento microbiano.

A comparação entre o cultivo com 2% (v/v) de CO<sub>2</sub> na atmosfera (Seção 5.2) e seu cultivo simultâneo em atmosfera padrão (Seção 5.2) foi dificultada pelo alto valor do intervalo de confiança da velocidade de crescimento do cultivo com atmosfera padrão, como descrito anteriormente. Porém, a média da velocidade de crescimento na fase linear do cultivo com 2% (v/v) de CO<sub>2</sub> na atmosfera (Seção 5.2), 28 mg.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>, foi significativamente superior ( $\alpha=0,01$ ) àquela alcançada pelo cultivo com atmosfera padrão da Seção 5.3.2, 12 mg.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> (FIGURA 35). A reprodutibilidade desse resultado não pôde ser avaliada, pois não há dados de um segundo cultivo com atmosfera a 2% (v/v) de CO<sub>2</sub>.

No 1º experimento realizado com atmosfera a 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> (Seção 5.3.1), a velocidade de crescimento média na fase linear (32 mg.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>) superou significativamente ( $\alpha=0,01$ ) a encontrada no cultivo com atmosfera padrão da Seção 5.3.2 (12 mg.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>), porém não se diferencia significativamente ( $\alpha=0,01$ ) da velocidade de crescimento média do cultivo com atmosfera a 2% (v/v) de CO<sub>2</sub> (28 mg.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>) (FIGURA 35). Entretanto, a velocidade de crescimento média do 2º experimento (Seção 5.3.2) com atmosfera a 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> (17 mg.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>) não se diferencia significativamente ( $\alpha=0,01$ ) da encontrada no seu cultivo simultâneo com atmosfera padrão (12 mg.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>), e foi significativamente menor ( $\alpha=0,01$ ) que a encontrada no cultivo com 2% (v/v) de CO<sub>2</sub> (28 mg.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>). A falta de reprodutibilidade nos cultivos com atmosfera a 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> impediu que se concluísse sobre o efeito desse enriquecimento sobre a velocidade de crescimento.

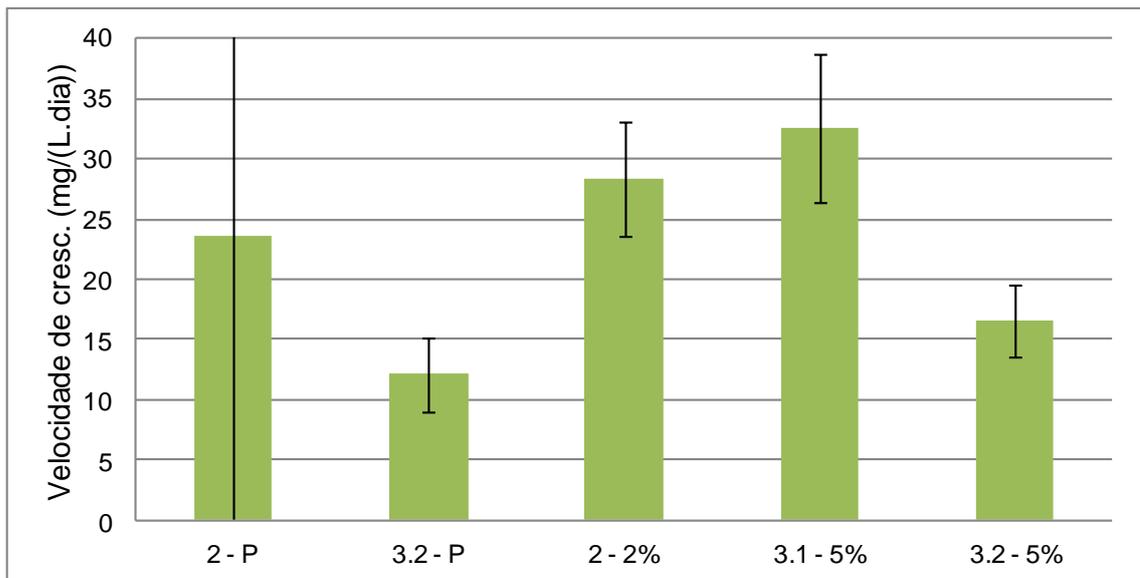


FIGURA 35 – VELOCIDADE DE CRESCIMENTO MÉDIA DE MIX2 NA FASE LINEAR E SEU INTERVALO DE CONFIANÇA DE 90%

LEGENDA:

P: atmosfera padrão;

2%: atmosfera com 2%(v/v) de CO<sub>2</sub>;

5%: atmosfera com 5%(v/v) de CO<sub>2</sub>;

2: Seção 5.2;

3.1: Seção 5.3.1;

3.2: Seção 5.3.2.

Para avaliar o efeito do enriquecimento da aeração com CO<sub>2</sub> sobre a produção de lipídeos de microalgas, comparou-se o conteúdo de lipídeos totais na biomassa seca obtida no final dos cultivos que continham majoritariamente microalgas do gênero *Scenedesmus* e microalgas filamentosas segmentadas de gênero não identificado (FIGURA 36). A exclusão de um dos frascos da triplicata originou o alto valor do intervalo de confiança do conteúdo de lipídeos totais no cultivo com atmosfera padrão da Seção 5.2, dificultando sua comparação com outros cultivos.

Para os cultivos em atmosfera padrão (Seção 5.3.2) e em atmosfera com 2% e 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> (Seções 5.2 e 5.3.1, respectivamente), o conteúdo de lipídeos

totais na biomassa final não apresentou diferença significativa ( $\alpha=0,01$ ) e se manteve em torno de 15%. A reprodutibilidade do resultado com enriquecimento da atmosfera com CO<sub>2</sub> a 2% (v/v) não foi avaliada, uma vez que não foi realizado um segundo cultivo com essa condição de aeração. A avaliação dos cultivos em atmosfera com 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> demonstrou a falta de reprodutibilidade do conteúdo de lipídeos totais nessa condição. Enquanto o 1º experimento (Seção 5.3.1) alcançou um conteúdo médio de lipídeos de 15,1%, o 2º experimento (Seção 5.3.2) alcançou uma média significativamente menor ( $\alpha=0,01$ ) de apenas 11,9% (FIGURA 36).

Apesar de a literatura afirmar que o conteúdo de lipídeos totais na biomassa seca de microalgas pode chegar a mais de 50% ao se manipular as condições de cultivo (U.S. DOE, 2010), a grande maioria dos pesquisadores relata em seus cultivos conteúdos de lipídeos bem abaixo de 50%. Prabakaran e Ravindran (2011) e Lee *et al.* (2010) obtiveram, em seus cultivos de microalgas do gênero *Scenedesmus*, um conteúdo de lipídeos totais de 10% da biomassa seca. Mohan *et al.* (2011) obtiveram um conteúdo de 27% de lipídeos totais na biomassa seca de um cultivo que recebeu como inóculo uma cepa mista de microalgas, que foi coletada em ambiente aquático natural e continha células dos gêneros *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Euglena* e *Spirogyra*. Wahlen, Willis e Seefeldt (2011) obtiveram 14% de lipídeos totais na biomassa seca de um cultivo misto de microalgas em uma lagoa de tratamento de efluentes municipais. É difícil explicar as diferenças nas produções de lipídeos em diferentes estudos, pois o conteúdo de lipídeos é afetado pelas condições de cultivo utilizadas, como a composição do meio de cultivo, a temperatura, a incidência luminosa, o fotoperíodo, e o fornecimento de CO<sub>2</sub> (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012) (DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2011). Porém, em termos gerais, é possível dizer que os resultados alcançados nos cultivos de Mix2 assemelham-se ao encontrados na literatura.

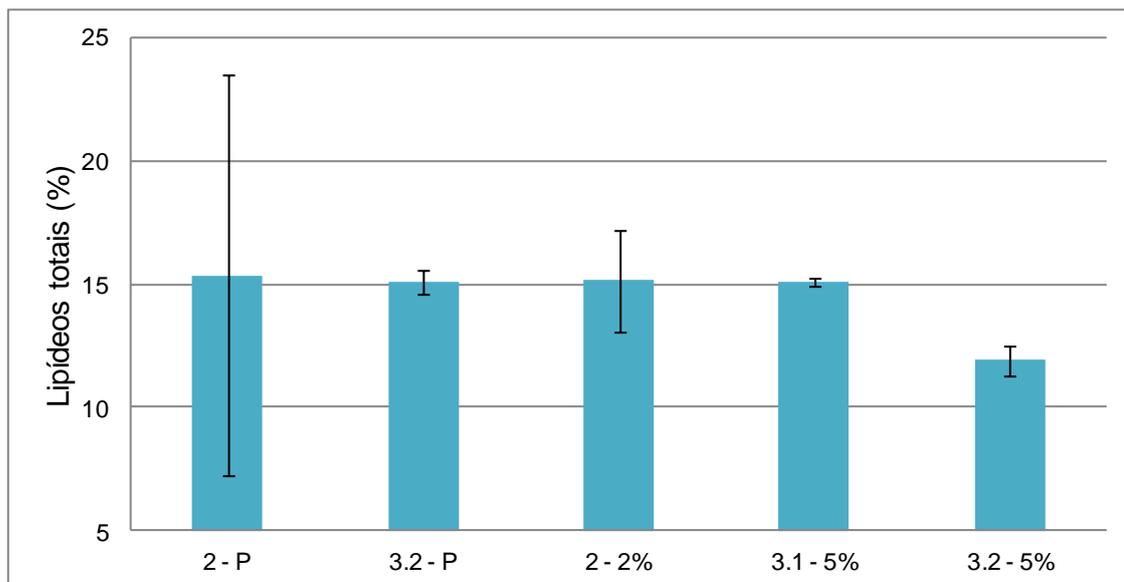


FIGURA 36 – CONTEÚDO DE LIPÍDEOS TOTAIS NA BIOMASSA SECA DE MIX2 E SEU ERRO PADRÃO COM INTERVALO DE CONFIANÇA DE 90%

LEGENDA:

P: atmosfera padrão;

2%: atmosfera com 2%(v/v) de CO<sub>2</sub>;

5%: atmosfera com 5%(v/v) de CO<sub>2</sub>;

2: Seção 5.2;

3.1: Seção 5.3.1;

3.2: Seção 5.3.2;

Para avaliar o efeito do enriquecimento de CO<sub>2</sub> na repetibilidade do aumento da DO<sub>540</sub>, foi calculada a média entre os valores de erro padrão da DO<sub>540</sub> de cada ponto no tempo dos cultivos em atmosfera padrão e dos cultivos em atmosfera enriquecida de CO<sub>2</sub>, que foram descritos nas Seções 5.1, 5.1 e 5.3. A média dos desvios padrão da DO<sub>540</sub> foi maior nos cultivos sem enriquecimento,  $0,055 \pm 0,017$  (IC 99%) se comparada às médias nos cultivos enriquecidos,  $0,025 \pm 0,007$  (IC 99%). Portanto, o enriquecimento da atmosfera com CO<sub>2</sub> aumentou a repetibilidade dos valores de DO<sub>540</sub> ao longo dos cultivos em triplicata (FIGURA 37).

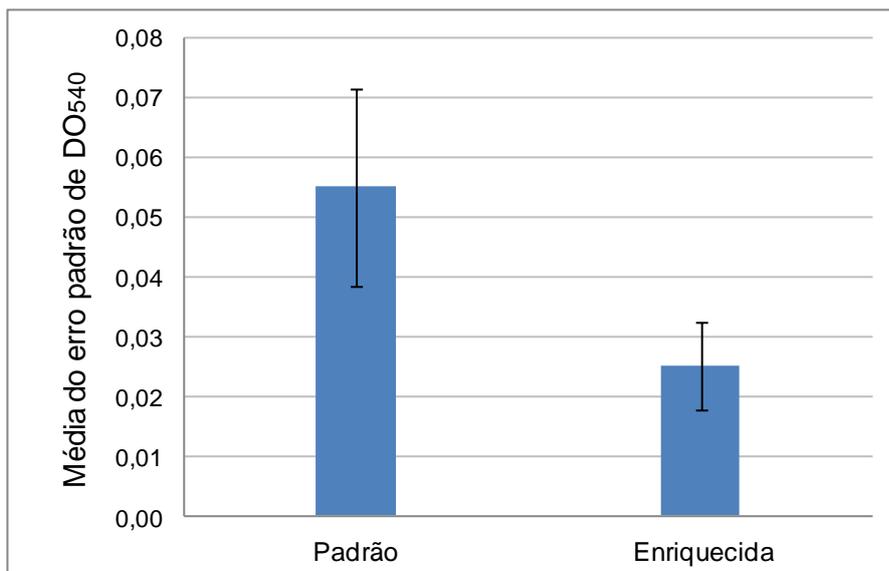


FIGURA 37 – MÉDIAS DOS VALORES DE ERRO PADRÃO DA DO<sub>540</sub> AO LONGO DE CULTIVOS COM ATMOSFERA PADRÃO E ENRIQUECIDA (INTERVALO DE CONFIANÇA DE 99%)

Os frascos de cultivo que sofreram colapso ou *crash* (morte prematura das células) foram descritos nas Seções 5.1 a 5.3, mas não foram incluídos na análise de dados. Dos 15 frascos de cultivo em atmosfera padrão, 4 deles sofreram colapso, e dos 9 frascos de cultivo em atmosfera enriquecida, nenhum sofreu colapso. Em outras palavras, a aeração com uma atmosfera contendo de 2 a 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> favoreceu o crescimento e diminuiu a fração de colapsos de 27% para 0% dos cultivos.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de cultivos mistos para a produção de biodiesel já foi anteriormente sugerido na literatura. Porém, não havia sido avaliada experimentalmente a reprodutibilidade da produção de biomassa e lipídeos em cultivos mistos de microalgas, apesar do conceito estabelecido de que a interação entre diferentes espécies em um cultivo pode causar variação nas populações. No presente trabalho, a manutenção em laboratório de cepas mistas de microalgas, originalmente coletadas em ambiente aquático natural, ocasionou variações na distribuição de espécies ao longo de cultivos simultâneos e não simultâneos. Essas variações foram imprevisíveis e incontroláveis, o que dificulta comparações entre cultivos não simultâneos e, principalmente, diminuiu a reprodutibilidade dos resultados. Por consequência, pode diminuir o interesse de pesquisadores e investidores na ampliação da produção de lipídeos por cultivos mistos para a escala comercial. Esses resultados também demonstram a importância da apresentação de dados de reprodutibilidade nos trabalhos publicados nessa área.

Na literatura, é usual realizar uma curva de calibração (concentração de biomassa seca *versus* DO<sub>540</sub>) para uma cepa unialgal, e aplicá-la em consecutivos cultivos, porém, no presente trabalho, essa prática não se mostrou adequada para cultivos mistos. Variações na distribuição de espécies da cepa mista e mudanças nas condições de cultivo modificaram a relação entre concentração de biomassa seca e DO<sub>540</sub>, sendo necessária a aplicação de uma curva de calibração para cada reprodução e cada condição de cultivo. Portanto, as curvas de crescimento em função de DO<sub>540</sub> para cultivos diferentes não podem ser plotadas juntas a fim de comparar a concentração de biomassa ao longo do tempo, mas apenas para comparar a duração das fases de crescimento.

A inserção de uma atmosfera enriquecida com 2% (v/v) de CO<sub>2</sub> no período iluminado foi uma forma de manter o pH do cultivo dentro de uma faixa de valores conhecida como ótima para o desenvolvimento de microalgas, entre 7 e 9. Esta é a provável razão para o aumento significativo ( $\alpha=0,01$ ) da velocidade de crescimento na fase linear de  $12\pm 6 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  (IC 90%) com aeração padrão para  $28\pm 3 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  (IC 90%) com aeração enriquecida de CO<sub>2</sub> a 2% (v/v). O experimento em atmosfera com 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> demonstrou a falta de reprodutibilidade do cultivo misto, alertando que o resultado alcançado com 2% (v/v) de CO<sub>2</sub> pode não se reproduzir. Enquanto no 1º experimento com atmosfera a 5% (v/v) de CO<sub>2</sub>, a velocidade de crescimento na fase linear,  $32\pm 5 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  (IC 90%), não apresentou diferença significativa ( $\alpha=0,01$ ) em relação à do cultivo com 2% (v/v) de CO<sub>2</sub>, no 2º experimento essa velocidade apresentou um valor significativamente menor ( $\alpha=0,01$ ),  $17\pm 3 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  (IC 90%). Caso tivesse sido utilizado um sistema de controle de pH, poderiam ter sido alcançados valores de velocidade de crescimento maiores, pois a aeração com 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> ocasionou valores de pH abaixo de 7 ao final do período iluminado nos dois experimentos.

Ao avaliar cultivos não simultâneos em atmosfera padrão e em atmosfera com 2 e 5% (v/v) de CO<sub>2</sub>, o aumento do fornecimento de CO<sub>2</sub> não alterou significativamente ( $\alpha=0,01$ ) o conteúdo de lipídeos totais na biomassa seca final, que se manteve em torno de 15%. A repetição do cultivo com 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> demonstrou a falta de reprodutibilidade desse conteúdo, que diminuiu significativamente ( $\alpha=0,01$ ) de  $15,1\pm 0,2\%$  (IC 90%) no 1º experimento para  $11,9\pm 0,6\%$  (IC 90%) no 2º experimento.

Em cada condição de cultivo, o aumento da DO<sub>540</sub> foi avaliado em uma triplicata de frascos. A aplicação de uma atmosfera enriquecida com CO<sub>2</sub> aumentou a repetibilidade dos valores de DO<sub>540</sub>, pois a média dos erros padrão da DO<sub>540</sub> diminuiu de  $0,055\pm 0,017$  (IC 99%) em atmosfera padrão para  $0,025\pm 0,007$  (IC 99%) em atmosfera enriquecida. A suplementação de CO<sub>2</sub> também diminuiu a fração de

frascos de cultivo que sofreram colapso, ou seja, perda do cultivo por morte prematura das células. A fração diminuiu de 27% em atmosfera padrão para 0% dos frascos em atmosfera enriquecida.

Em experimentos futuros, visando o aumento da reprodutibilidade e a diminuição de colapsos em cultivos mistos, deveriam ser testados valores de  $DO_{540}$  iniciais mais altos, ou seja, concentrações celulares iniciais mais altas. Isso porque, o aumento da concentração inicial de células já foi descrito na literatura como estratégia para aumentar a tolerância dos cultivos à determinada condição operacional. Para aumentar a reprodutibilidade dos cultivos mistos, também poderiam ser testados inóculos mistos padronizados, ou seja, inóculos feitos pela mistura de cultivos estoque puros. Nesse caso, o NPDEAS precisaria investir no isolamento das espécies presentes no cultivo misto utilizado atualmente.

O NPDEAS busca alcançar velocidades de crescimento e conteúdos de lipídeos totais na biomassa mais altos, portanto, diversas outras espécies de microalgas devem ser testadas em cultivos puros ou mistos. Nesses cultivos, devem ser alteradas diversas condições, como a concentração de biomassa inicial, a concentração de  $CO_2$  na aeração e o nível de controle automatizado do pH, sistema que ainda não foi implantado no NPDEAS. A utilização de  $CO_2$  puro para o enriquecimento da atmosfera de aeração pode tornar o cultivo inviável economicamente quando em larga escala, portanto, também se deve investir em uma análise de custos do processo de produção de biomassa. Uma alternativa para diminuir os custos do enriquecimento da aeração com  $CO_2$  é a substituição do  $CO_2$  puro comercial por gases de escape. No caso do NPDEAS, o motogerador da unidade autossustentável é uma fonte de gás de escape próxima aos cultivos que deve ser testada.

## REFERÊNCIAS

- ALABI, A. O.; TAMPIER, M.; BIBEAU, E. **Microalgae technologies & processes for biofuel/bioenergy production in british columbia**. [S.l.]: Seed Science, 2009.
- ANDERSEN, R. A. (Ed.). **Algal culturing techniques**. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006.
- BECKER, E. W. **Microalgae: biotechnology and microbiology**. New York: Cambridge University Press, 1994.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae: a review of technologies for production, processing and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S.l.], v. 14, p. 557–577, 2010.
- CHIU, S. *et al.* Microalgal biomass production and on-site bioremediation of carbon dioxide, nitrogen oxide and sulfur dioxide from flue gas using *Chlorella* sp. Cultures. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9135-9142, 2011.
- CHIU, S. *et al.* Reduction of CO<sub>2</sub> by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. **Bioresource Technology**, v.99, p. 3389-3396, 2008.
- COPLIN, L. G. (Ed.). **Sustainable development of algal biofuels in the United States**. Washington: The National Academies Press, 2012.
- DEMIRBAS, A.; DEMIRBAS, M. F. Importance of algae oil as a source of biodiesel. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 163-170, 2011.
- DEVI, M. P.; SUBHASH, G. V.; MOHAN, S. V. Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and starvation phases: effect of nutrient supplementation. **Renewable Energy**, v. 43, p. 276-283, 2012.
- DOUSKOVA, I. *et al.* Simultaneous flue gas bioremediation and reduction of microalgal biomass production costs. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 82, p. 179-185, 2009.
- HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: a review. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 709-732, 2012.

LEE, J. *et al.* Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, p. S75-S77, 2010.

LOURENÇO, S. de O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. [S.l.]: Rima, 2006.

LOPES, E. J. **Sequestro de dióxido de carbono em fotobiorreatores**. 136 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

KAEWKANNETRA, P.; ENMAK, P.; CHIU, T. The effect of CO<sub>2</sub> and salinity on the cultivation of *Scenedesmus obliquus* for biodiesel production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 17, p. 591-597, 2012.

KASTÁNEK, F. *et al.* In-field experimental verification of cultivation of microalgae *Chlorella* sp. using the flue gas from a cogeneration unit as a source of carbon dioxide. **Waste Management & Research**, v. 28, n.11, p. 961-966, 2010.

KNIE, J. L. W. **Testes ecotoxicológicos: Métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: FATMA/GTZ, 2004.

MARIANO, A.B. **Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Auto-Sustentável**: Energia auto-sustentável a partir de biodiesel derivado de microalgas. No prelo.

MOHAN, S. V. *et al.* Potential of mixed microalgae to harness biodiesel from ecological water-bodies with simultaneous treatment. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 1109-1117, 2011.

MORAIS, M. G. de; COSTA, J. A. V. Bioprocessos para remoção de dióxido de carbono e óxido de nitrogênio por microalgas visando a utilização de gases gerados durante a combustão do carvão. **Quim. Nova**, v. 31, n.5, p. 1038-1042, 2008.

NETO, B. de B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Editora da Unicamp, 2001.

OILGAE. **Flat-plate photobioreactor**. Disponível em: <<http://www.oilgae.com/algae/cult/pbr/typ/flp/flp.html>>. Acesso em: 02/04/13.

PRABAKARAN, P.; RAVINDRAN, A. D. A comparative study on effective cell disruption method for lipid extraction from microalgae. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, p. 150–154, 2011.

SILVA-BENAVIDES, A. M.; TORZILLO, G. Nitrogen and phosphorus removal through laboratory batch cultures of microalga *Chlorella vulgaris* and cyanobacterium *Planktothrix isoethrix* grown as monoalgal and as co-cultures. **J Appl Phycol**, v. 24, p. 267-276, 2012.

SINGH, J.; GU, S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S.l.], v. 14, n. 9, p. 2596-2610, dez. 2010.

SMITH, V. H. The ecology of algal biofuel production. **Action Bioscience**, 2011. Disponível em: <<http://www.actionbioscience.org/biotech/smith.html>>. Acesso em: 3/4/2013.

STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. **Total suspended solids dried at 103-105°C** (Method 2540 D). 21. ed. Washington: APHA; AWWA; WEF, 2005. p. 2-58.

U.S. DEPARTMENT OF ENERGY (U.S. DOE). Office of Energy Efficiency and Renewable Energy. Biomass Program. **National algal biofuels technology roadmap**. [S.l.], 2010. Disponível em: <[http://www1.eere.energy.gov/biomass/pdfs/algal\\_biofuels\\_roadmap.pdf](http://www1.eere.energy.gov/biomass/pdfs/algal_biofuels_roadmap.pdf)>. Acesso em: 5/4/2013.

VEGA, B. O. A. (Ed.); VOLTOLINA, D. (Ed.). **Métodos y herramientas analíticas em La evaluación de La biomassa microalgal**. México: CIB, 2007.

WAHLEN, B. D.; WILLIS, R. M.; SEEFELDT, L. C. Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures. **Bioresource Technology**, v.102, p. 2724-2730, 2011.

## ANEXO

### Protocolo para preparo do meio de cultivo CHU modificado

O meio de cultivo é uma solução de nutrientes que garantem o bom desenvolvimento das microalgas. Para cultivo desses microrganismos em escala laboratorial é usado o meio CHU (Knie, J.L.W.,2004), cujo preparo requer a diluição de várias soluções estoque.

Para o preparo das soluções-estoque, os reagentes são pesados em balança analítica utilizando copos de plástico como recipientes, e em seguida transferidos com o auxílio de um funil e água deionizada para um balão volumétrico. Completa-se o volume do balão volumétrico com água deionizada, adiciona-se em seguida um bastão magnético (“peixinho”) para homogeneizar a solução em agitador magnético por 30min ou mais. As soluções são armazenadas em frascos de borossilicato, vidro âmbar ou em outro recipiente adequado, permanecendo em geladeira por até 6 meses. A Tabela 1 descreve as massas de reagente para preparar de 1L de cada solução estoque.

O meio CHU original utiliza o óxido de molibdênio (VI) em sua composição ( $0,71\text{mg.L}^{-1}$  de solução estoque 10), um reagente muito caro e de pequena disponibilidade no mercado. Esse reagente foi substituído pelo molibdato de sódio dihidratado. A massa do novo reagente utilizado foi calculada a fim de manter o número de mols de molibdênio necessários no meio CHU original.

Para o preparo de meio CHU a ser utilizado nos cultivos adiciona-se água destilada para preencher aproximadamente metade de um balão volumétrico de 1 ou 2L. Em seguida, são adicionadas as soluções-estoque na ordem e nos volumes indicados na Tabela 2. Por último, completa-se o volume do balão volumétrico com

água deionizada e adiciona-se um bastão magnético para homogeneização em agitador magnético por 30min ou mais. O meio CHU apresenta pH em torno de 6,8-7,0 e é utilizado sem correção. Caso seja necessário, o pH pode ser ajustado com NaOH 1M OU HCl 1M.

O meio CHU pronto é então transferido com o auxílio de um funil para um frasco de vidro âmbar de 4L ou outro recipiente adequado, armazenando-o em geladeira por até 2 meses.

Tabela 1 – Massas de reagentes para o preparo de 1L de cada uma das soluções-estoque para meio CHU original.

Solução	Reagente	Fórmula	Massa para 1L
1	nitrato de sódio	NaNO <sub>3</sub>	25g
2	cloreto de cálcio di-hidratado	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,5g
3	Sulfato de magnésio hepta-hidratado	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	7,5g
4	Fosfato de potássio dibásico	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,5g
5	Fosfato de potássio monobásico	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17,5g
6	Cloreto de sódio	NaCl	2,5g
7	Titriplex III (EDTA sal dissódico)	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> .2H <sub>2</sub> O	50g
	Hidróxido de potássio	KOH	31g
8	Sulfato ferroso hepta-hidratado	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4,98g
9	Ácido bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11,42g
10	Sulfato de zinco hepta-hidratado	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	88,2mg
	Cloreto de manganês tetra-hidratado	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	14,4mg
	Molibdato de sódio dihidratado	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	11,9mg
	Sulfato de cobre penta-hidratado	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	15,7mg
	Nitrato de cobalto hexa-hidratado	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	4,9mg

Tabela 2 – Volumes de solução-estoque para preparo de 1L de meio CHU.

Solução-estoque	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Volume (ml)	10	10	10	10	10	10	1	1	1	0,1

## REFERÊNCIA

KNIE, J. L. W. **Testes ecotoxicológicos: Métodos, técnicas e aplicações.** Florianópolis: FATMA/GTZ, 2004.