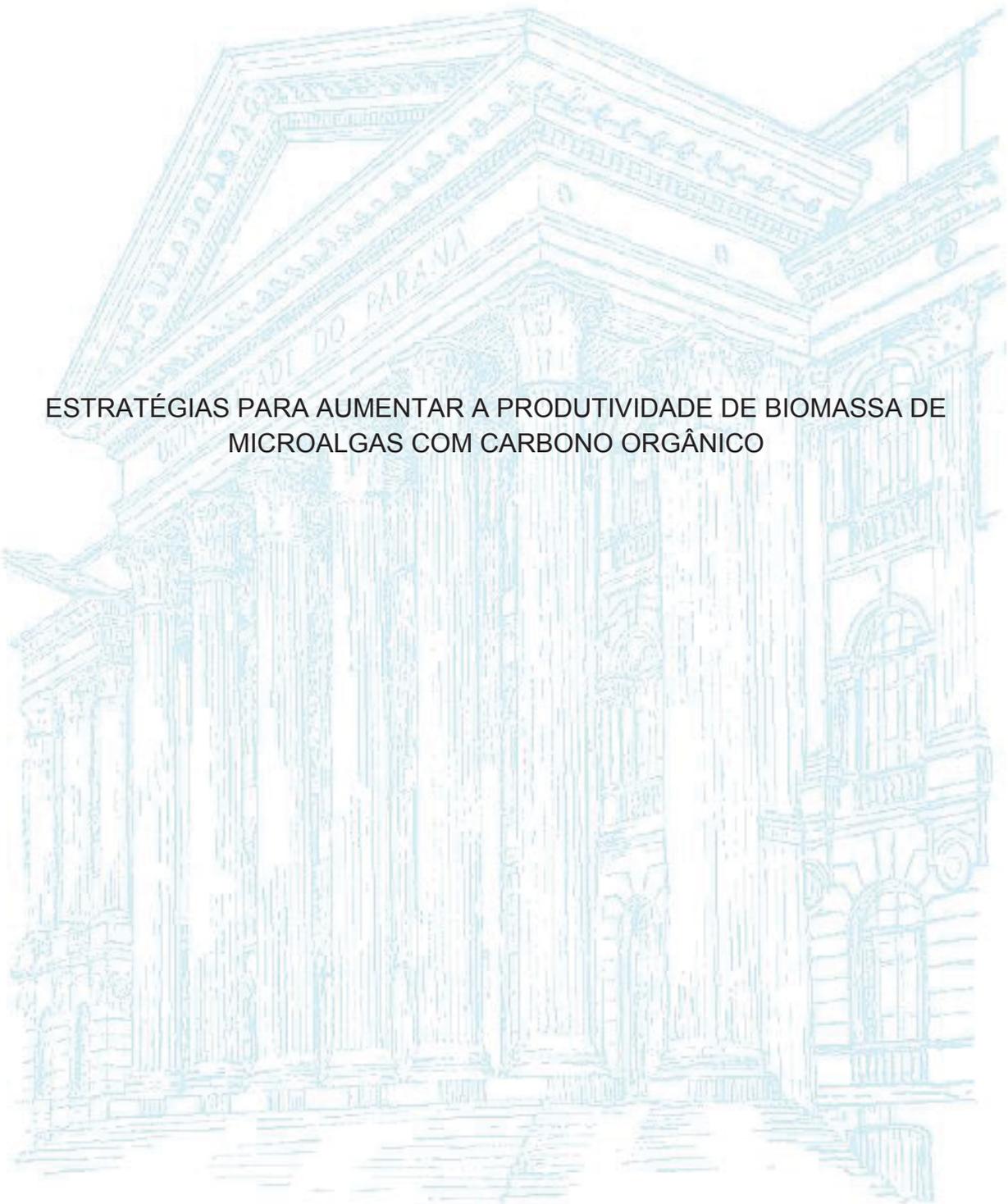


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BEATRIZ SANTOS



ESTRATÉGIAS PARA AUMENTAR A PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA DE
MICROALGAS COM CARBONO ORGÂNICO

CURITIBA

2016

BEATRIZ SANTOS

ESTRATÉGIAS PARA AUMENTAR A PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA DE
MICROALGAS COM CARBONO ORGÂNICO

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia e Ciência dos Materiais, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. André Bellin Mariano

Coorientador: Rafael Bruno Vieira

CURITIBA

2016

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

S237e

Santos, Beatriz

Estratégias para aumentar a produtividade de biomassa de microalgas com carbono orgânico [recurso eletrônico] /Beatriz Santos. – Curitiba, 2016.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, 2016.

Orientador: André Bellin Mariano. Coorientador: Rafael Bruno Vieira.

1. Biomassa. 2. carbono. 3. Algas - Aspectos econômicos. 4. Algas - Cultura e meios de cultura. I. Universidade Federal do Paraná. II. Mariano, André Bellin. III. Vieira, Rafael Bruno. IV. Título.

CDD: 579.8

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 9/1928

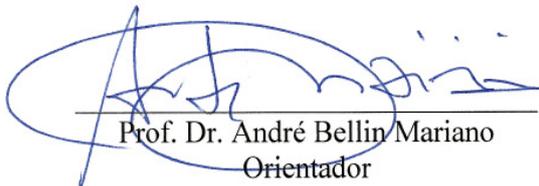


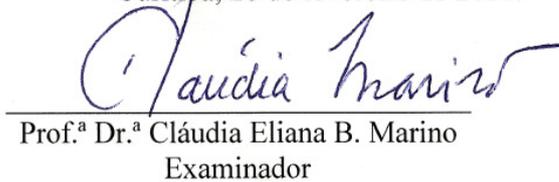
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais- PIPE
Setor de Tecnologia

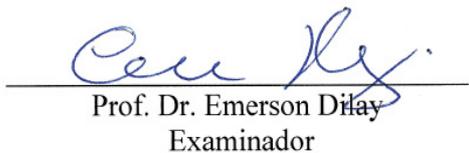
RELATÓRIO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

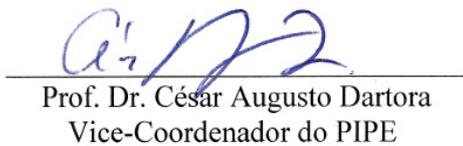
Aos vinte e seis dias do mês de fevereiro de 2016, na Sala de Reuniões do NPDEAS - no Centro Politécnico - UFPR, foi instalada pelo Prof. Dr. César Augusto Dartora, vice-coordenador do PIPE – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, a Banca Examinadora para a trecentésima décima quinta defesa de dissertação de mestrado na área de concentração: Engenharia e Ciência dos Materiais. Estiveram presentes no ato, além do coordenador do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes. A Banca Examinadora, atendendo a determinação do colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências dos Materiais, foi constituída pelos professores doutores: Prof. Dr. André Bellin Mariano (UFPR), Cláudia Eliana B. Marino (UFPR), Emerson Dilay (UP). Às 14:00 horas, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **BEATRIZ SANTOS** a fazer a apresentação da dissertação de mestrado intitulada **“ESTRATÉGIAS PARA AUMENTAR A PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA DE MICROALGAS COM CARBONO ORGÂNICO.”** O referido trabalho teve a co-orientação do Prof. Dr. Rafael Bruno Vieira. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes. Tendo em vista a dissertação e a arguição, a banca decidiu pela Aprovação da candidata, (de acordo com a determinação dos artigos 68 e 69 da resolução 65/09 de 09.11.2009).

Curitiba, 26 de fevereiro de 2016.


Prof. Dr. André Bellin Mariano
Orientador


Prof.ª Dr.ª Cláudia Eliana B. Marino
Examinador


Prof. Dr. Emerson Dilay
Examinador


Prof. Dr. César Augusto Dartora
Vice-Coordenador do PIPE

Ao Diego, meu esposo.

Às minhas irmãs Andréia e Luana e ao meu irmão Eduardo.

Aos meus pais Luiz e Elisabete por todo amor dedicado a mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família pelo constante apoio e por ter me fornecido toda base necessária para que fosse possível a chegada até aqui.

Ao Diego de Oliveira Corrêa por ter ficado ao meu lado em todos os momentos. Agradeço pela confiança, pela amizade, pelas palavras sinceras, pelas horas sem dormir e acima de tudo, pelo amor inigualável.

Ao meu orientador André Bellin Mariano pelos ensinamentos, pela confiança depositada em mim e pelo apoio nos momentos de indecisão.

Ao meu coorientador Rafael Bruno Vieira pelas contribuições na elaboração desse documento e por toda ajuda durante as floculações dos cultivos.

Às dedicadas alunas de Iniciação Científica Cecília Mozzer e Isadora Kaniak por terem sido meus braços direito e esquerdo na manutenção da Sala de Cultivo.

A todos os membros do NPDEAS, agradeço pelo incentivo, pela troca de conhecimentos, pela amizade e pelas ótimas horas de descontração. Amigos que levarei pra sempre em meu coração.

Aos membros da Banca Examinadora, Prof^a Cláudia Eliana Bruno Marino e Prof^o Emerson Dilay pelo aceite ao convite da avaliação dessa dissertação, pela disponibilidade e pelas valiosas correções e sugestões.

Ao Prof^o José Viriato Coelho Vargas pela confiança depositada e pelos preciosos ensinamentos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram com o desenvolvimento desse trabalho.

Muito obrigada a todos!!

RESUMO

A biomassa de microalgas vem ganhando destaque durante a última década, devido às características fisiológicas desses micro-organismos. Tendo em vista a grande diversidade de co-produtos gerados a partir da biomassa de microalgas, é de fundamental importância a busca por estratégias que aumentem a produtividade de biomassa, bem como de lipídeos e demais compostos. Contudo, a alta demanda por água é um problema real em cultivos de microalgas. O presente trabalho teve como objetivo principal o aumento da produtividade de biomassa por meio do desenvolvimento de uma estratégia capaz de integrar diferentes regimes de cultivo, bem como a utilização de fontes de carbono orgânico adicionais. Para tanto, a espécie de microalga *Acutodesmus obliquus* foi cultivada em regime batelada e semicontínuo para comparação de suas produtividades de biomassa. Um sistema que integra o regime semicontínuo com o cultivo heterotrófico foi utilizado a fim de obter maior produtividade de biomassa. Os cultivos heterotróficos utilizaram glicose como fonte de carbono e foram mantidos na ausência de luz em ambiente interno. Para diminuir os impactos ambientais e econômicos, a água recuperada durante a etapa de floculação com quitosana foi reutilizada em cultivos sob regime semicontínuo. Os resultados mostraram que a estratégia de integrar os dois modelos de cultivos (semicontínuo e heterotrófico) rendeu uma produtividade 45 vezes maior do que a encontrada no cultivo em batelada. A produtividade média encontrada no sistema integrado foi de $1,2 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, enquanto que a maior produtividade encontrada no cultivo batelada foi de $0,06 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. A microalga *A. obliquus* obteve altas taxas de crescimento em regime semicontínuo, com uma produtividade máxima de $0,270 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. A produtividade de lipídeos no cultivo integrado ($122 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) foi aproximadamente 1,6 vezes maior que a do cultivo semicontínuo ($77 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) e 12 vezes superior à produtividade do cultivo batelada ($10 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$). Além disso, o reuso do clarificado da floculação com quitosana não influenciou negativamente a produtividade de biomassa e lipídeos. A partir dos resultados obtidos é possível confirmar a capacidade da espécie *A. obliquus* crescer em cultivo semicontínuo e heterotrófico, assim como a viabilidade dessa metodologia no aumento da produtividade de biomassa e lipídeos de microalgas.

Palavras-chave: Microalga. Biomassa. Produtividade. Heterotrofia. Fotobiorreator.

ABSTRACT

The biomass of microalgae has been gaining momentum over the last decade, due to the physiological characteristics of these micro-organisms. Given the wide range of by-products generated from the biomass of microalgae, it is very important to search for strategies that increase the productivity of biomass, as well as lipids and other compounds. In addition, the high demand for water is a real problem in microalgae cultivation. This study aimed to increase biomass productivity through the development of a strategy that integrates different cropping systems, as well as the use of additional organic carbon sources. Therefore, the microalgae *Acutodesmus obliquus* was grown in batch and semi-continuous basis to compare their productivity biomass and a system which includes the semi-continuous system with heterotrophic culture was used to obtain higher productivity of biomass. The heterotrophic cultures using glucose as the carbon source and were kept in the dark indoors. To reduce the environmental and economic impacts, the water recovered during the flocculation step with chitosan was reused for crops under semi-continuous regime. The results show that the strategy of integrating the two types of crops (semi-continuous and heterotrophic) yielded a yield 45 times greater than that found in the cultivation in batch. The yield average was found in the integrated system, $1.2 \text{ g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$, while the larger productivity in batch culture was $0.06 \text{ g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$. The microalgae *A. obliquus* obtained high growth rates in semi-continuous regime with a maximum productivity of $0.270 \text{ g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$. The productivity of lipids in the integrated culture ($122 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$) was approximately 1.6 times greater than that of semi-continuous culture ($77 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$) and 12 times higher the productivity of batch cultivation ($10 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$). Furthermore, the reuse of clarified flocculation with chitosan does not adversely affect the productivity of biomass and lipids. From the results it is possible to confirm the ability of the species *A. obliquus* growing in semi and heterotrophic cultivation, as well as the feasibility of this method in increasing the productivity of biomass and microalgae lipid.

Key words: Microalgae. Biomass. Productivity. Heterotrophy. Photobioreactor.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 2.1 – CULTIVO ABERTO MODELO TANQUE DE CORRIDA..... | 27 |
| FIGURA 2.2 – MODELOS DE FOTOBIOREACTORES..... | 28 |
| FIGURA 2.3 – FASES DE CRESCIMENTO EM CULTIVO BATELADA | 29 |
| FIGURA 2.4 – CULTIVO SEMICONTINUO..... | 31 |
| FIGURA 2.5 – CULTIVO CONTÍNUO | 33 |
| FIGURA 2.6 – PROCESSO DA FOTOSSÍNTESE EM CÉLULAS MICROALGAIS...35 | |
| FIGURA 2.7 – EFEITO DA INTENSIDADE LUMINOSA NO CRESCIMENTO CELULAR EM CULTIVOS AUTOTRÓFICOS | 35 |
| FIGURA 2.8 – METABOLISMOS AUTOTRÓFICO, HETEROTRÓFICO E MIXOTRÓFICO | 39 |
| FIGURA 3.1 – FLUXOGRAMA DAS ESTRATÉGIAS DE TRABALHO | 53 |
| FIGURA 4.1 – FLUXOGRAMA DAS ETAPAS EXPERIMENTAIS | 54 |
| FIGURA 4.2 – FOTOBIOREATOR UTILIZADO EM ESCALA LABORATORIAL.... | 56 |
| FIGURA 4.3 –FOTOBIOREATOR <i>AIRLIFT</i> | 57 |
| FIGURA 4.4 – <i>Acutodesmus obliquus</i> | 58 |
| FIGURA 4.5 – CULTIVOS EM BATELADA E SEMICONTÍNUO..... | 63 |
| FIGURA 4.6 – SISTEMA INTEGRADO SEMICONTÍNUO E HETEROTRÓFICO..... | 67 |
| FIGURA 4.7 –CULTIVO SEMICONTÍNUO COM REUSO DO CLARIFICADO | 69 |
| FIGURA 5.1 – NÚMERO DE CÉLULAS DOS CULTIVOS EM REGIME BATELADA E SEMICONTÍNUO REALIZADOS NA SALA DE CULTIVO | 72 |
| FIGURA 5.2 – BIOMASSA SECA DOS CULTIVOS EM REGIME BATELADA E SEMICONTÍNUO REALIZADOS NA SALA DE CULTIVO | 74 |
| FIGURA 5.3 – NÚMERO DE CÉLULAS DOS CULTIVOS EM REGIME BATELADA E SEMICONTÍNUO REALIZADO EM AMBIENTE EXTERNO | 76 |
| FIGURA 5.4 – BIOMASSA SECA DOS CULTIVOS EM REGIME BATELADA E SEMICONTÍNUO REALIZADOS EM AMBIENTE EXTERNO | 79 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 5.5 – PRODUTIVIDADES DOS CULTIVOS BATELADA, SEMICONTÍNUO E SISTEMA INTEGRADO | 83 |
| FIGURA 5.6 – CONCENTRAÇÃO CELULAR E BIOMASSA DO CULTIVO SEMICONTÍNUO COM REUSO DO MEIO..... | 84 |
| FIGURA 5.7 – PRODUTIVIDADE DE LIPÍDEOS DE DIFERENTES CULTIVOS..... | 87 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 2.1 – ÁCIDOS GRAXOS DE MICROALGAS E POTENCIAL APLICAÇÃO | 25 |
| TABELA 2.2 – PERFIL DE AMINOÁCIDOS ENCONTRADO NA ESPÉCIE <i>Scenedesmus obliquus</i> | 24 |
| TABELA 2.3 – COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA MICROALGA <i>Chorella vulgaris</i> CULTIVADA EM MEIO HETEROTRÓFICO COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO | 37 |
| TABELA 2.4. PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA EM CULTIVOS AUTOTRÓFICO, HETEROTRÓFICO E MIXOTRÓFICO EM DIFERENTES ESPÉCIES DE MICROALGAS | 41 |
| TABELA 2.5 – MACRONUTRIENTES E FUNÇÕES BIOLÓGICAS | 45 |
| TABELA 2.6 – DOSAGENS DE QUITOSANA NECESSÁRIOS PARA FLOCULAR CULTIVOS DE <i>Scenedesmus</i> sp. COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BIOMASSA | 48 |
| TABELA 4.1 – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO CHU | 59 |
| TABELA 4.2 – EXPERIMENTOS REALIZADOS COM ADIÇÃO DE CARBONO ORGÂNICO | 67 |
| TABELA 5.1 – TAXAS DE CRESCIMENTO DOS CULTIVOS EM REGIME BATELADA E SEMICONTÍNUO REALIZADOS EM AMBIENTE INTERNO | 73 |
| TABELA 5.2 – PRODUTIVIDADES DE BIOMASSA DOS CULTIVOS EM REGIME BATELADA E SEMICONTÍNUO REALIZADOS NA SALA DE CULTIVO | 75 |
| TABELA 5.3 – TAXA DE CRESCIMENTO (r) DOS CULTIVOS EM REGIME BATELADA E SEMICONTÍNUO EM FOTOBIOREACTORES AIRLIFT | 77 |
| TABELA 5.4 – PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA DOS CULTIVOS EM REGIME BATELADA E SEMICONTÍNUO REALIZADOS EM AMBIENTE EXTERNO | 80 |
| TABELA 5.5 – PRODUTIVIDADES NO SISTEMA INTEGRADO COM DIFERENTES FORMAS DE ADIÇÃO DE GLUCOSE | 82 |

| | |
|---|----|
| TABELA 5.6 – TAXA DE CRESCIMENTO E PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA EM CULTIVO SOB REGIME SEMICONTÍNUO COM REUSO DO SOBRENADANTE CLARIFICADO | 85 |
| TABELA 5.7 – TEOR DE LIPÍDEOS TOTAIS DE DIFERENTES CULTIVOS | 86 |

LISTA DE SIGLAS

ATP – Adenosina Trifosfato

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

FBR – Fotobiorreator

Fru – Frutose

Gli – Glicerol

Glu – Glucose

NPDEAS – Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável

NPDP – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NPPAH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato - reduzida

PS II – Fotossistema II

PVC – Policloreto de vinil

Sac – Sacarose

LISTA DE SIMBOLOS

BS – biomassa seca ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$);

BS_i – biomassa seca no dia zero de cultivo ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$);

BS_f – biomassa seca no último dia de cultivo ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$);

CO_2 – Dióxido de carbono

H_2O – Água

M_1 – massa do microfiltro vazio (g);

M_2 – massa do microfiltro com biomassa de microalga (g);

N – concentração celular ($\text{células}\cdot\text{mL}^{-1}$);

N_0 – concentração celular inicial ($\text{células}\cdot\text{mL}^{-1}$);

N_{max} – concentração celular máxima ($\text{células}\cdot\text{mL}^{-1}$);

O_2 – Gás oxigênio

P – produtividade ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$);

t – tempo de cultivo (dias)

t_{BS_i} e t_{BS_f} – tempo decorridos em dias entre a BS_i e a BS_f .

V – alíquota filtrada (L).

r - velocidade específica de crescimento (dia^{-1});

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 18 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 20 |
| 2.1 MICROALGAS | 20 |
| 2.1.1 Gênero <i>Scenedesmus</i> | 21 |
| 2.1.2 Aplicações biotecnológicas | 22 |
| 2.1.2.1 Pigmentos | 22 |
| 2.1.2.2 Carboidratos | 23 |
| 2.1.2.3 Proteínas | 24 |
| 2.1.2.4 Lipídeos | 24 |
| 2.1.2.5 Biocombustíveis | 25 |
| 2.2 CULTIVOS DE MICROALGA | 26 |
| 2.2.1 Sistemas de cultivos de microalgas | 26 |
| 2.2.1.1 Sistemas abertos | 26 |
| 2.2.1.2 Sistemas fechados | 27 |
| 2.2.2 Regimes de cultivos de microalgas | 29 |
| 2.2.2.1 Regime batelada | 29 |
| 2.2.2.2 Regime semicontínuo | 31 |
| 2.2.2.3 Regime contínuo | 32 |
| 2.2.3 Cultivos de microalga frente à fonte de carbono | 34 |
| 2.2.3.1 Cultivo autotrófico | 34 |
| 2.2.3.2 Cultivo heterotrófico | 36 |
| 2.2.3.3 Cultivo mixotrófico | 38 |
| 2.2.4 Produção de biomassa em diferentes condições de cultivos | 40 |
| 2.2.5 Fatores que influenciam a produção de biomassa | 43 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.2.5.1 | Influência da luminosidade | 43 |
| 2.2.5.2 | Efeito da temperatura no cultivo de microalga | 44 |
| 2.2.5.3 | Necessidades nutricionais..... | 44 |
| 2.2.5.4 | Efeito do pH..... | 45 |
| 2.2.6 | Recuperação da biomassa | 46 |
| 2.2.6.1 | Recuperação da biomassa por floculação com quitosana | 47 |
| 2.2.6.2 | Reaproveitamento do clarificado | 48 |
| 3 | JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS | 51 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL | 51 |
| 3.1.1 | Objetivos específicos..... | 52 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 54 |
| 4.1 | INFRAESTRUTURA PARA REALIZAÇÃO DOS CULTIVOS..... | 55 |
| 4.1.1 | Fotobiorreator – Erlenmeyer..... | 55 |
| 4.1.2 | Fotobiorreator – <i>airlift</i> | 56 |
| 4.1.3 | Material biológico | 57 |
| 4.1.4 | Meio de cultivo | 58 |
| 4.2 | AVALIAÇÃO DOS CULTIVOS | 59 |
| 4.2.1 | Caracterização da cinética de crescimento | 59 |
| 4.2.2 | Determinação da biomassa seca | 60 |
| 4.2.3 | Produtividade de biomassa | 61 |
| 4.2.4 | Quantificação de lipídeos totais..... | 61 |
| 4.3 | REGIMES DE CULTIVO | 63 |
| 4.3.1 | Regime batelada | 64 |
| 4.3.2 | Regime semicontínuo..... | 64 |
| 4.3.3 | Cultivo integrado semicontínuo e heterotrófico | 66 |
| 4.4 | RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA | 68 |
| 4.4.1 | Floculação com quitosana..... | 68 |

| | |
|--|-----------|
| 4.4.2 Cultivo semicontínuo utilizando o sobrenadante clarificado da floculação | 68 |
| 4.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DAS AMOSTRAS | 69 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 71 |
| 5.1. CULTIVOS EM FOTOBIOREACTORES ERLLENMEYER – BATELADA E SEMICONTÍNUO | 71 |
| 5.2 CULTIVOS EM FOTOBIOREACTORES <i>AIRLIFT</i> – BATELADA E SEMICONTÍNUO | 76 |
| 5.3 CULTIVO EM SISTEMA INTEGRADO SEMICONTÍNUO E HETEROTRÓFICO | 81 |
| 5.4 CULTIVO SEMICONTÍNUO UTILIZANDO MEIO RECICLADO | 83 |
| 5.5 TEOR DE LIPÍDEOS TOTAIS | 86 |
| 6 CONCLUSÃO | 88 |
| 7 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 90 |
| REFERÊNCIAS | 91 |

1 INTRODUÇÃO

Na última década foi registrado expressivo aumento no interesse pela utilização da biomassa de microalgas para produção de biocombustíveis, justificado pelas vantagens que esses micro-organismos apresentam frente aos vegetais atualmente utilizados na produção de biodiesel, como a alta eficiência fotossintética, capacidade de duplicar a sua biomassa em menos de uma semana, e, sobretudo, o alto teor de lipídeos de algumas espécies. Além disso, a possibilidade de integrar produção de biomassa com tratamento de efluentes e emissões as tornam excelentes candidatas no desenvolvimento de novas tecnologias autossustentáveis.

A biomassa de microalga é uma importante fonte de lipídeos, proteínas, e carboidratos, sendo assim, estratégias de cultivos têm sido desenvolvidas por pesquisadores do mundo inteiro com o objetivo de aumentar a produtividade de biomassa e seus componentes. Esse interesse está em conformidade com os objetivos do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPDEAS).

Atualmente o NPDEAS possui cinco fotobiorreatores desenvolvidos para produção de biomassa de microalgas em larga escala com objetivo de demonstrar o princípio de geração de energia distribuída. Conceitualmente, o biodiesel produzido a partir da biomassa de microalgas abastece um sistema gerador de eletricidade responsável por suprir a demanda energética de todo o complexo. Nesse sentido, o NPDEAS está constantemente inovando e buscando estratégias para aumentar a produtividade de biomassa e lipídeos das microalgas.

Assim como os cultivos são realizados no NPDEAS, as microalgas podem ser cultivadas em sistemas abertos ou fechados, sob regime batelada, semicontínuo ou contínuo. Além disso, as microalgas podem crescer utilizando carbono inorgânico, de modo autotrófico ou com adição de carbono orgânico, de modo heterotrófico ou mixotrófico. Esses modelos de cultivos proporcionam diferentes produtividades de biomassa, no entanto, a integração de dois ou mais modelos tem o potencial de superar a produtividade de qualquer modelo individual. Contudo, a

alta demanda por água em cultivos de microalgas é um desafio para a produção sustentável de biomassa.

Nesse sentido, esse estudo se justifica por buscar uma estratégia de cultivo visando o aumento da produtividade de biomassa de microalgas. A estratégia utilizada se resume em integrar dois modelos de cultivo, o regime semicontínuo com o cultivo heterotrófico. E, para diminuir os impactos ambientais e econômicos, foi avaliada a viabilidade do reuso da água recuperada durante a etapa de floculação em cultivos sob regime semicontínuo. Cabe ressaltar que o presente estudo é um dos poucos que manteve cultivos em regime semicontínuo em ambiente externo, devido às mudanças inerentes ao clima.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta seção será apresentada uma revisão bibliográfica dos principais temas abordados nesse trabalho, a fim de esclarecer o leitor sobre os conceitos mais pertinentes da área de pesquisa, bem como realizar um levantamento do estado da arte da produção acadêmica sobre os assuntos trabalhados.

Primeiramente serão apresentados os conceitos básicos sobre a taxonomia e biologia das algas e suas principais aplicações biotecnológicas. Após uma visão geral serão explorados os diferentes modelos de cultivos: os cultivos abertos e fechados, os regimes de cultivos batelada, semicontínuo e contínuo e os cultivos frente à fonte de carbono. A recuperação da biomassa também será abordada, uma vez que é uma etapa crucial em todo processo da produção de biomassa.

2.1 MICROALGAS

O termo alga foi proposto pela primeira vez em 1753 por Lineu, e congregava quatro ordens de criptógamos (briófitas e pteridófitas), 14 gêneros e 214 espécies dos quais somente cinco gêneros e 48 espécies constituem o que hoje entendemos por alga. De fato a criação deste termo foi pouco preciso do ponto de vista taxonômico, sendo ele usado para designar uma enorme variedade de organismos, de tal maneira que atualmente não se aplica um significado preciso ao termo alga. Pode-se generalizar e designar como algas os talófitos e protistas clorofilados (BICUDO e MENEZES, 2005), sendo que algumas cianobactérias estão incluídas nesta definição (TOMASELLI, 2004).

Um dos maiores grupos de algas conhecido é o das algas verdes, que juntamente com as plantas terrestres constituem o sub-reino Viridiplantae. A estrutura vegetativa das algas verdes apresenta uma variedade muito grande de níveis de organização, desde indivíduos unicelulares, com flagelos ou não, até talos morfologicamente complexos (REVIERS, 2006).

As microalgas são organismos fotossintetizantes, sendo assim são produtores primários, possuindo grande importância na cadeia trófica. Além do seu relevante papel ecológico e na área econômica, as microalgas já vem se destacando há alguns anos devido ao seu alto valor nutricional (SPOLAORE *et al.*, 2006), no entanto, atualmente existem numerosas aplicações biotecnológicas. Dentre as algas mais estudadas podem-se citar as dos gêneros *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Spirulina* e *Scenedesmus*.

2.1.1 Gênero *Scenedesmus*

Scenedesmus é o mais comum e cosmopolita dos gêneros de algas verdes. Seus indivíduos são extremamente comuns em qualquer coleta de água que se faça, seja ela oligo, meso ou eutrófica. Além disso, são dos primeiros a colonizar um ambiente (BICUDO; MENEZES, 2005). A característica taxonômica distintiva do grupo é a ocorrência de colônias planas, formadas em geral por 2, 4, 8 ou até 16 células dispostas lateralmente.

As espécies desse gênero têm demonstrado excelente crescimento em águas residuais com taxas de crescimento comparadas às taxas de cultivos em meio sintético (TAHER, 2013; OLIVEIRA, 2013a; SILVA, 2014), além de alta eficiência na remoção de nitrogênio e fósforo (MARTÍNEZ *et al.*, 2000). As espécies do gênero *Scenedesmus* possuem as características desejáveis para combinação eficiente da fixação do CO₂, tratamento de águas residuais e produção de biomassa para extração de lipídeos (TANG *et al.*, 2011).

Recentemente, algumas espécies do gênero *Scenedesmus* foram transferidas para o gênero *Acutodesmus* (HEGEWALD; WOLF, 2003), inclusive a espécie utilizada nesse estudo, *Acutodesmus obliquus* (antigamente denominada *Scenedesmus obliquus*).

2.1.2 Aplicações biotecnológicas

O consumo de microalgas foi amplamente realizado por tribos indígenas durante séculos. Chineses já consumiam espécies de *Nostoc*, *Spirulina* e *Aphanizomenon*, há centenas de anos (JENSEN; GINSBERG; DRAPEAU, 2001). Os primeiros cultivos de microalgas tinham como objetivo compreender a metodologia para cultivo e estiveram ligados a estudos bacteriológicos. No entanto, após 1940, os experimentos com cultivos de microalgas saíram dos estudos básicos e passaram para os estudos relacionados a aplicações biotecnológicas com cultivos em grandes escalas (BOROWITZKA, 1999). Atualmente, dada a importância econômica das diferentes aplicações para a biomassa de microalgas, os estudos estão voltados para o aumento da produtividade de biomassa, lipídeos para produção de biocombustíveis e produtos de valor agregado.

Após 1948 nos Estados Unidos, Alemanha e Japão, as microalgas surgiam como alternativa à suplementação alimentar (BOROWITZKA, 1999), nesse mesmo período, tiveram início as pesquisas acerca de substâncias biologicamente ativas a partir da biomassa de microalgas (BOROWITZKA, 1995).

As microalgas têm potencial para a produção de uma variedade de produtos, como pigmentos (clorofila, carotenóides, ficobilina), compostos bioativos (vários compostos antibacterianos, antifúngico, antiviral, antiprotozoário), proteínas, polissacarídeos (β 1,3-glucana, carragenana, amido, alginatos, celulose), biopolíesteres e lipídeos (poli-insaturados, ácidos graxos e hidrocarbonetos).

2.1.2.1 Pigmentos

Microalgas são uma importante fonte de pigmentos, como a clorofila e os carotenóides. Esses pigmentos são aplicados com sucesso na área alimentar, em cosméticos e na indústria farmacêutica.

O pigmento em maior concentração nas células de microalgas é a clorofila, o principal pigmento responsável por captar os fótons em organismos

fotossintetizantes. A clorofila é um diéster e pode ser saponificado por tratamento alcalino, dando origem à clorofilina, um derivado da clorofila. Esses derivados são importantes corantes utilizados na alimentação, em indústrias têxteis e de papel (MORTENSEN e GEPPEL, 2007). Ademais, estudos indicam que a clorofilina possui ação antitumoral (DIAZ, LI e DASHWOOD, 2003).

Outra classe de pigmentos presente em células de microalgas são os carotenóides. Astaxantina, xantofilas, zeaxantina, cantaxantina, equinenona, e β -caroteno são exemplos de carotenóides. Tais pigmentos exercem um papel importante nas células, pois absorvem o excesso de energia luminosa, evitando que a clorofila sofra foto-oxidação. Os carotenóides são excelentes antioxidantes e servem com precursor da vitamina A. Murthy e colaboradores (2005) trabalharam com a microalga *Dunaliella salina* como matéria prima para produção de carotenóides e avaliaram a atividade biológica desse composto. Os resultados desse estudo mostraram que as atividades dos carotenóides de microalga superam a atividade de carotenóides sintéticos.

2.1.2.2 Carboidratos

Tem aumentado o interesse pela produção de carboidratos pelas microalgas devido à sua potencial aplicação terapêutica. Estudos com o composto β 1,3-glucana têm mostrado que esse composto é um imunoestimulador, antioxidante e redutor do colesterol no sangue e foi encontrado em cepas de *Chlorella* (SPOLAORE, 2006). Além da aplicação nutricional, alguns carboidratos como polissacarídeos sulfatados podem ser aplicados em terapias antiadesivas em infecções bacterianas. Outros carboidratos de interesse são alginatos, celulose ou carragenanas que são utilizados como emulsificantes e estabilizantes em vários produtos alimentícios (KOLLER, MUHR e BRAUNEGG, 2014).

2.1.2.3 Proteínas

A concentração de proteínas varia significativamente entre as espécies de microalgas, chegando de 15 a 71% da sua massa celular. A biomassa de microalga é uma excelente fonte de aminoácidos de alta qualidade, utilizado na suplementação alimentar. A Tabela 2.2 mostra a concentração de aminoácidos na espécie *Scenedesmus obliquus*.

TABELA 2.2 – PERFIL DE AMINOÁCIDOS ENCONTRADO NA ESPÉCIE *Scenedesmus obliquus*

| Aminoácido | (g · 100g ⁻¹ de proteína) |
|--------------|--------------------------------------|
| Isoleucina | 3,6 |
| Leucina | 7,3 |
| Valina | 6 |
| Lisina | 5,6 |
| Fenilalanina | 4,8 |
| Tirosina | 3,2 |
| Metionina | 1,5 |
| Cisteína | 0,6 |
| Triptonafano | 0,3 |
| Treonina | 5,1 |
| Alanina | 9 |
| Arginina | 7,1 |
| Asparato | 8,4 |
| Glutamato | 11 |
| Glicina | 7,1 |
| Histidina | 2,1 |
| Prolina | 3,9 |
| Serina | 3,8 |

FONTE: Adaptado de Becker (2007)

2.1.2.4 Lipídeos

Um dos principais destinos para os lipídeos de microalga tem sido a produção de biodiesel, diversas espécies são apresentadas com alto teor lipídico (CHISTI, 2007). No entanto, as células de microalgas são ricas em ácidos graxos de alto valor agregado. Muitas espécies de microalgas contêm ácidos graxos poli-insaturados, como o ácido eicosapentaenóico (EPA), ácido docosaheptaenóico (DHA), ácido linoléico (GLA) e o ácido araquidônico (AA). Esses ácidos graxos

podem ser comercializados para aplicações farmacêuticas ou terapêuticas. Alguns ácidos graxos livres têm sido estudados como compostos antimicrobianos (MOLINA-CÁRDENAS, SÁNCHEZ-SAAVEDRAS e LIZÁRRAGA-PARTIDA, 2014).

A Tabela 2.1 apresenta os principais ácidos graxos encontrados na biomassa de microalgas e suas aplicações.

TABELA 2.1 – ÁCIDOS GRAXOS DE MICROALGAS E POTENCIAL APLICAÇÃO

| ÁCIDO GRAXO | ESPÉCIES | APLICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS (LIPÍDEOS) | REFERÊNCIAS |
|-------------|--|---|---|
| EPA | <i>Isochrysis galbana</i> , <i>Nannochloropsis oculata</i> , <i>Monodus subterraneus</i> | Coagulação sanguínea; pressão sanguínea; diminui o nível de colesterol no plasma; antitrombose e antiarterosclerose; medicação piscoterapêutica | ZITTELLI <i>et al.</i> , 1999 JUDÉ <i>et al.</i> , 2006 PEET <i>et al.</i> , 2001 |
| DHA | <i>Cryptocodinium cohnii</i> , <i>Pavlova lutheri</i> , <i>Schizochytrium limacinum</i> | Importante para o desenvolvimento do cérebro e do olho em fetos e crianças | KATO, KOLENIC e PARDINI, 2007 PYLE, GARCIA e WEN, 2008 SPOLAORE, CASSAN e DURAN, 2006 |
| ARA | <i>Porphyridium</i> | Anti-inflamatório | ASGHARPOUR, RODGERS e HESTEKIN, 2015 |
| GLA | <i>Arthrospira</i> | Anti-inflamatório e doenças autoimune;; anti-câncer | MENDES <i>et al.</i> , 2005 |

FONTE: Adaptado de Koller, Muhr e Braunegg (2014)

2.1.2.5 Biocombustíveis

Em função do crescente interesse por novas fontes energéticas, o cultivo de microalgas vem ganhando destaque como matéria prima para produção de biocombustíveis diversos, em especial o biodiesel. Durante quase 20 anos, de 1978 a 1996, os Estados Unidos desenvolveram um programa de incentivo ao uso de matérias-primas aquáticas para a produção de biodiesel.

Quimicamente, o biodiesel é um combustível formado por ésteres de ácidos graxos obtidos por transesterificação de triacilglicerídeos ou esterificação de ácidos graxos, na presença de metanol ou etanol em um catalisador básico ou ácido (DABDOUB; BRONZEL; RAMPIN, 2009).

A principal matéria prima utilizada para a produção de biodiesel é o óleo vegetal, como o da soja, do milho e da palma. Entretanto, esses vegetais competem

com a área alimentar provocando aumento dos preços dos alimentos. As microalgas, além não competirem com a alimentação, possuem a vantagem de crescerem em águas residuais. As microalgas podem sintetizar diversos tipos de lipídeos, dependendo das condições de cultivo. Sob condições de crescimento ótimo, os tipos de lipídeos mais abundantes são os ácidos graxos presentes na membrana celular, entretanto, sob estresse há um estímulo para que as células passem a sintetizar triacilglicerídeos. Essas adversidades que levam ao estresse do cultivo podem ser físicas (luz e temperatura) ou químicas (privação de nutrientes, salinidade e pH) (HU *et al*, 2008).

Ainda que a literatura científica aponte o potencial das microalgas em relação à produção de lipídeos e conseqüentemente a geração de biodiesel, o processo de extração do óleo da biomassa ainda se apresenta como um dos maiores desafios para viabilizar a tecnologia de produção de biodiesel de microalgas.

2.2 CULTIVOS DE MICROALGA

2.2.1 Sistemas de cultivos de microalgas

2.2.1.1 Sistemas abertos

Tanques abertos que simulam o habitat natural das microalgas são os mais utilizados devido ao baixo custo de construção e manutenção. Três principais modelos têm sido usados na produção em larga escala, os tanques de corrida, as lagoas circulares e os tanques inclinados (BOROWITZKA, 1999).

O gasto com a construção dos tanques de corrida é relativamente baixo e consiste numa vala rasa escavada no chão revestido com plástico, sendo que a agitação é promovida por longas pás. O nível da água deve estar entre 15 cm e 25 cm, valores inferiores ou superiores podem prejudicar o fluxo e diminuir a turbulência. Nesse sistema, o baixo nível de água requer grandes áreas para cultivo, com cerca de 150 L m⁻², além disso a concentração celular dificilmente ultrapassa 600 mg L⁻¹, facilitando contaminações e aumentando o custo de coleta da biomassa.

Outro problema é a perda excessiva por evaporação, que é agravada em dias quentes e secos (TREDICI, 2004) (FIGURA 2.1).

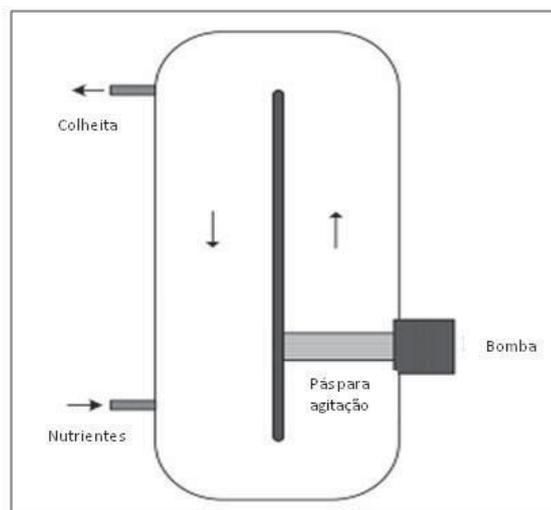


FIGURA 2.1 – CULTIVO ABERTO MODELO TANQUE DE CORRIDA

FONTE: Adaptado de Suali e Sarbatly (2012).

A turbulência em tanques inclinados é criada pela gravidade, de modo que a cultura em suspensão flui de cima para baixo numa superfície inclinada. Nesse sistema, a camada de cultivo pode ser extremamente fina, chegando a uma espessura menor do que um centímetro, contudo, a concentração celular pode ultrapassar 10 g L^{-1} de cultivo. Um dos problemas deste modelo é a alta taxa de evaporação e sedimentação em locais com baixa turbulência (CHEN *et al.*, 2009).

2.2.1.2 Sistemas fechados

Fotobiorreatores são reatores em que organismos fotossintetizantes crescem e realizam suas reações biológicas, de modo que, os sistemas abertos também podem ser classificados como fotobiorreatores, no entanto, o termo fotobiorreator é comumente empregado para designar os sistemas fechados. Podem ser definidos como sistemas de cultura para organismos autotróficos, no qual grande proporção da luz não incide diretamente sobre a superfície da cultura, mas precisam

passar através das paredes transparente do reator para alcançar as células de microalgas. Sendo assim, fotobiorreatores não permitem, ou limitam intensamente a troca direta de gases e contaminações entre o cultivo celular e a atmosfera (TREDICI, 2004).

Em relação aos cultivos abertos, os fotobiorreatores possuem algumas vantagens, dentre as quais é possível destacar o maior controle das condições de cultivo e menor taxa de contaminação, uma vez que não há contato com o meio externo. Além disso, fotobiorreatores ocupam uma área muito menor quando comparados aos sistemas abertos, podendo ser instalado em áreas urbanas ou solos impróprios para a agricultura.

A Figura 2.2 apresenta quatro diferentes fotobiorreatores:

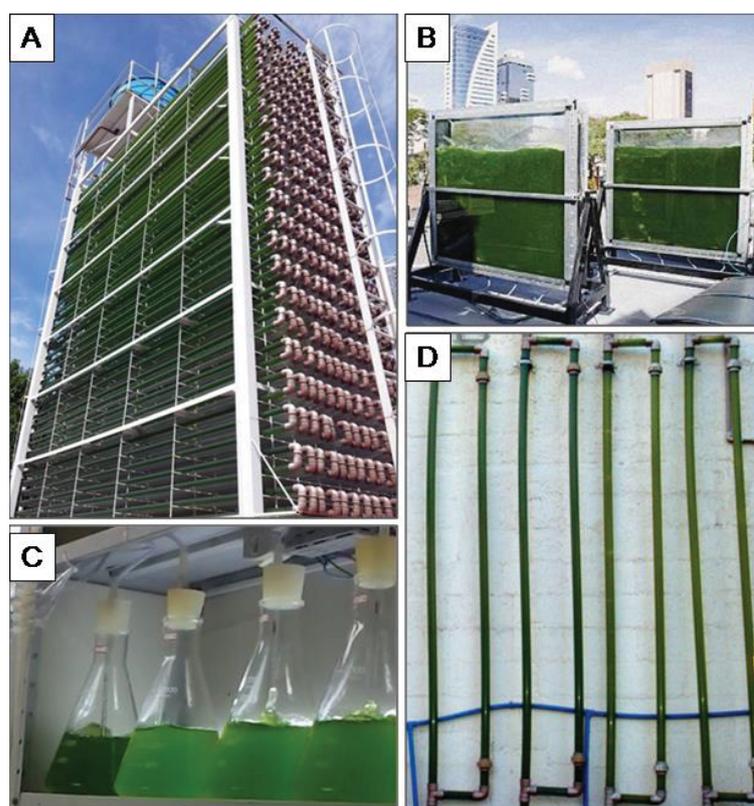


FIGURA 2.2 – MODELOS DE FOTOBIORREATORIOS.

NOTA: a) FBR tubular compacto. B) FBR placa plana. C) Frascos Erlenmeyer. D) FBR do tipo *airlift*.
FONTE: NPDEAS (2016)

A Figura 2.2A e 2.2D ilustram o fotobiorreator tubular compacto com capacidade de 10 m³ e o fotobiorreator *airlift* com capacidade de 11 L,

respectivamente, ambos utilizados pelo NPDEAS para produção de biomassa. A Figura 2.2C ilustra cultivos em escala laboratorial realizados em frascos Erlenmeyers com capacidade de 2 L. Já a Figura 2.2B ilustra um fotobiorreator placa plana instalado em uma churrascaria localizada na cidade de Curitiba com o objetivo de fixar os gases oriundos da queima do carvão.

2.2.2 Regimes de cultivos de microalgas

2.2.2.1 Regime batelada

Em cultivos em batelada não há adição de nutrientes após a inoculação, de modo que o cultivo é encerrado quando não há mais nutrientes ou quando o produto desejado for produzido (COUTTEAU, 1996). O cultivo em batelada é caracterizado pelas cinco fases distintas de crescimento, a fase de adaptação (lag), a fase logarítmica (log), a fase de crescimento linear, a fase estacionária e a fase de declínio (FIGURA 2.3).

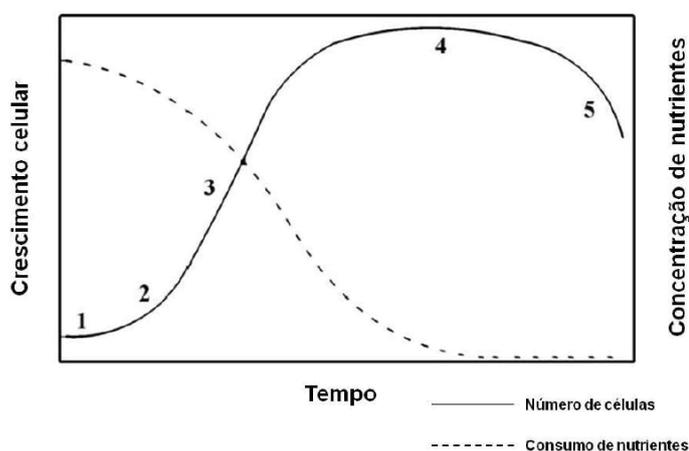


FIGURA 2.3 – FASES DE CRESCIMENTO EM CULTIVO BATELADA

FONTE: Mata; Martins; Caetano (2009).

A fase lag ou de adaptação ocorre quando as células recém inoculadas em meio fresco sofrem defasagem no crescimento. Essa fase é marcada pela

adaptação ao novo meio e pela indução de crescimento, podendo durar poucas horas ou mesmo dias, quanto mais diferentes forem os dois meios (o meio do inoculo e o meio fresco), maior o período de adaptação. Porém, a fase de adaptação pode ser imperceptível, caso as condições do novo cultivo sejam parecidas com as do cultivo anterior.

Na fase logarítmica (log) ou exponencial a taxa de crescimento torna-se maior e dura poucos dias de maneira aproximadamente estável, contudo, os valores podem variar em função das características da espécie e do conjunto de condições de crescimento. A fase exponencial termina quando algum componente passa a ser limitante, verificando uma redução na taxa de crescimento. Nessa fase existe liberação de compostos orgânicos no meio de cultura e as características fisiológicas e bioquímicas das células podem sofrer algumas diferenças em relação às células do início da fase exponencial.

A fase estacionária é o período em que o cultivo alcança rendimento máximo, como maior número de células por mililitro de cultivo. As taxas de crescimentos são estáveis e normalmente baixas quando comparadas às taxas das fases anteriores. A duração da fase estacionária depende da espécie de microalga, mas geralmente é a fase com maior duração. Os compostos excretados ou liberados pela ruptura celular, bem como o autossombreamento atingem seus valores máximos nessa fase. A perda das condições de crescimento culmina com o início da fase de declínio.

A fase de declínio é caracterizada pela morte e lise de muitas células, além de compostos inibidores de crescimento. Poucas células ainda se dividem e muitas se tornam inviáveis, de modo que a taxa de crescimento é negativa. A duração da fase de declínio varia, mas pode ser tão curta quanto a fase exponencial.

Devido às diversas fases do cultivo em batelada não é possível manter alta produtividade por muito tempo, de modo que as maiores produtividades são observadas nos primeiros dias de cultivo, no entanto, dificilmente ultrapassam $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ (MATTOS *et al.* 2015; HENRICHI e IRAZOQUI, 2015; SANTOS *et al.*, 2014). Altas produtividades em cultivos em batelada são encontradas quando há enriquecimento do ar atmosférico com CO_2 ou outra fonte de carbono inorgânico (ZHAO *et al.*, 2015; ZHU *et al.*, 2014). Carboidratos e lipídeos tendem a se acumular

durante a fase estacionária (EMDADI; BERLAND, 1989; REIREZ *et al.*; 1989). Em cultivos comerciais, a colheita da biomassa é realizada antes que a densidade celular atinja seu valor máximo, evitando a fase de declínio (LOURENÇO, 2006).

2.2.2.2 Regime semicontínuo

No regime semicontínuo um volume conhecido da cultura de microalga é removido e substituído periodicamente por meio fresco com o mesmo volume, de modo que as células permaneçam em crescimento exponencial por um longo período (FIGURA 2.4). Nesse regime as células de microalgas apresentam pouca variação na composição química, uma vez que a cultura permanece em condições de crescimento sem fatores limitantes.

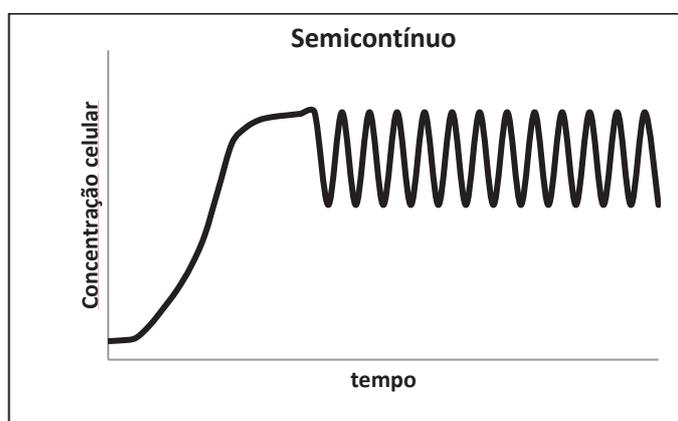


FIGURA 2.4 – CULTIVO SEMICONTINUO

FONTE: A autora (2016).

A taxa de diluição é definida como a razão do volume retirado e a o volume total do cultivo e exerce grande influência na densidade celular. Altas taxas de diluição levam a baixa concentração de biomassa, permitindo maior disponibilidade de luz (CAMACHO *et al.*, 1999). A estratégia do regime semicontínuo é simples e eficiente, pois evita o crescimento lento, observado no início do cultivo e causado pelo autossombreamento (HO *et al.*, 2014).

Cultivos em regime semicontínuo propiciam grandes produtividades de biomassa, Hsieh e Wu (2009) cultivaram a espécie *Chlorella* sp. em regime semicontínuo e conseguiram uma produtividade de biomassa 5 vezes maior em relação ao cultivo em regime batelada.

Altas produtividades de lipídeos também podem ser alcançadas, Han e colaboradores (2013) relataram que cultivos em regime semicontínuos com ajuste do pH e nitrogênio limitado aumentaram em 6 vezes a produtividade de lipídeos da espécie *Chlorella pyrenoidosa* quando comparado ao cultivo em batelada.

Além das altas produtividades, cultivos em regime semicontínuo propiciam maior remoção de nutrientes do meio, como no trabalho realizado por Nuñez e colaboradores (2001) com a espécie *Acutodesmus obliquus* em cultivo sob regime semicontínuo com remoção de $19 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ de amônia. Já Morales-Amaral e colaboradores (2015) conseguiram uma remoção de $39 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ de nitrogênio. A taxa de remoção de CO_2 também é aumentada em regimes semicontínuos (ROSA *et al.*, 2015).

Culturas em ambiente externo possuem as variáveis temperatura e luminosidade que exercem grande influência nas taxas de crescimento de microalgas, de modo que manter cultivos em regime semicontínuo em ambiente externo tem sido pouco realizado (RODOLFI, *et al.*, 2008; HO *et al.*, 2014). Entretanto, Feng e seus colaboradores (2014) cultivaram a espécie *Acutodesmus obliquus* em regime semicontínuo em ambiente interno e externo, alcançando maiores produtividades de biomassa e lipídeos nos cultivos mantidos em ambiente externo. Enquanto que Morales-Amaral e seus colaboradores (2015) realizaram cultivos em ambiente externo e conseguiram uma produtividade de $1,2 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ em tanques inclinados.

2.2.2.3 Regime contínuo

No regime contínuo uma fração da cultura é constantemente retirada e substituída por meio fresco simultaneamente (FIGURA 2.5). Essas saídas e entradas

constantes de cultura e meio fresco mantêm o cultivo sempre com baixa densidade de células, evitando o autossombreamento.

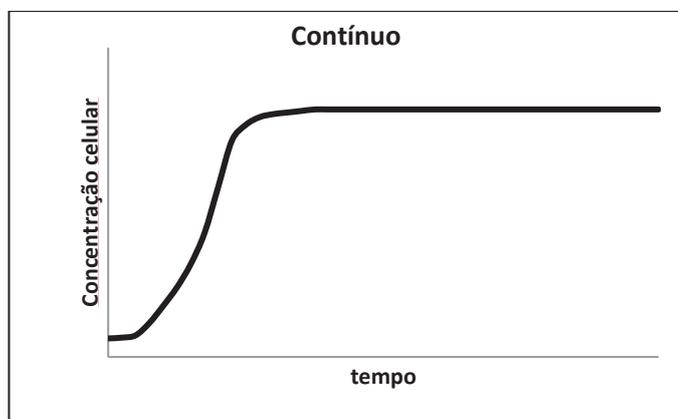


FIGURA 2.5 – REGIME CONTÍNUO

FONTE: A autora (2016).

A produtividade pode ser mantida alta, uma vez que o cultivo está constantemente recebendo meio fresco, de modo que o cultivo não passa por limitações. Assim como o cultivo em regime semicontínuo, os cultivos contínuos são adequados para cultivos em grande escala (HO *et al.*, 2014). Sob condições de estado estacionário nos cultivos em regime contínuo, a concentração da biomassa pode ser controlada ajustando a taxa de diluição, o meio de cultura e irradiância podem ser continuamente mantidos a um nível específico (Tang *et al.*, 2012). No entanto os cultivos contínuos possuem custo elevado, uma vez que é necessário a automação, temperaturas e iluminação constantes (MATA, MARTINS e CAETANO, 2009).

Cultivos contínuos têm obtido sucesso na produção de biomassa de microalgas, lipídeos e carboidratos. Sobczuk e Chist (2009) conseguiram a maior produção de biomassa por litro de cultivo em cultivo contínuo de $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, utilizando a espécie *Choricystis minor*. Tang e colaboradores (2012) alcançaram uma produtividade de $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ de éster metílico de ácido graxo (EMAG), utilizando a espécie *Dunaliella tertiolecta*. Ho e colaboradores (2013) aumentaram a produtividade de carboidratos da microalga *Acutodesmus obliquus* em cultivos contínuo, obtendo $312 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$.

O ambiente pouco estressante causado pelo regime semicontínuo (iluminação e temperatura constantes, sem limitação de nutrientes), pode ter um efeito negativo no acúmulo de lipídeos e carboidratos, tendo em vista que a produção desses compostos tende a serem maiores sob condições de estresse, assim os carboidratos e lipídeos podem não atingir níveis satisfatórios, conseqüentemente, o processo de recuperação da biomassa pode ter seu custo energético aumentado. Além disso, cultivos contínuos realizados em ambiente externo podem ter seu crescimento diminuído à noite, causado pela morte celular (HO *et al.*, 2014).

2.2.3 Cultivos de microalga frente à fonte de carbono

Células de microalgas podem crescer utilizando sob três condições distintas, o autotrófico, o heterotrófico e o mixotrófico. Cada tipo de cultivo será abordado a seguir.

2.2.3.1 Cultivo autotrófico

O crescimento autotrófico (ou fotoautotrófico) tem como fonte de carbono o CO_2 ou HCO_3^- dissolvido na água. Em teoria, o CO_2 necessário nesse metabolismo pode ser obtido de emissões industriais ou motogeradores, por isso, esse modelo de crescimento recebe atenção substancial de pesquisadores (BURKHOLDER; GLIBERT; SKELTON, 2008).

Durante a fotossíntese a energia da luz solar é capturada e armazenada na forma de ATP e NADPH que serão posteriormente utilizados na síntese de carboidratos e outros compostos orgânicos a partir de dióxido de carbono (CO_2) e água (H_2O), liberando gás oxigênio (O_2) (FIGURA 2.6).

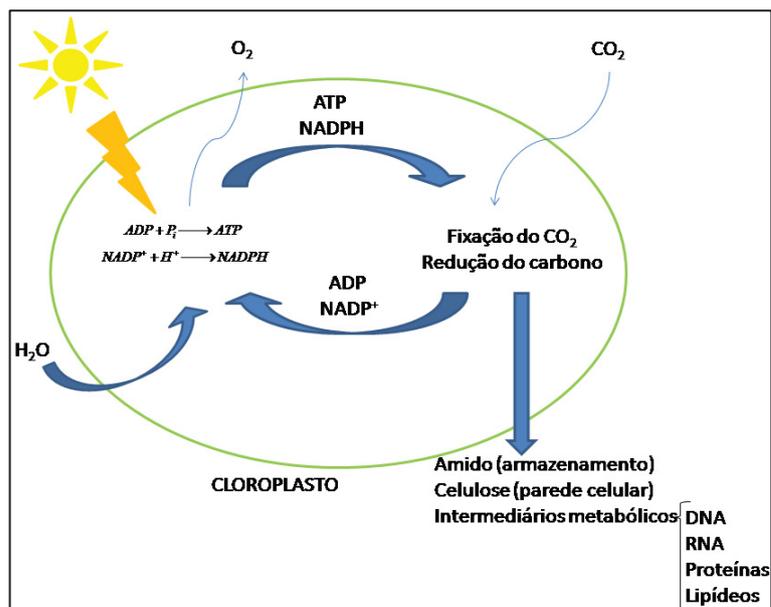


FIGURA 2.6. PROCESSO DA FOTOSSÍNTESE EM CÉLULAS DE MICROALGAS
FONTE: A autora (2016).

Luz e CO_2 possuem nenhum ou pouco custo na produção de biomassa de microalgas em condições autotróficas, aumentando a viabilidade comercial dessa tecnologia, contudo, restrições de engenharia e desenho do fotobiorreator têm limitado o emprego dessa tecnologia em larga escala. O efeito da intensidade luminosa em crescimento autotrófico é mostrado na Figura 2.7.

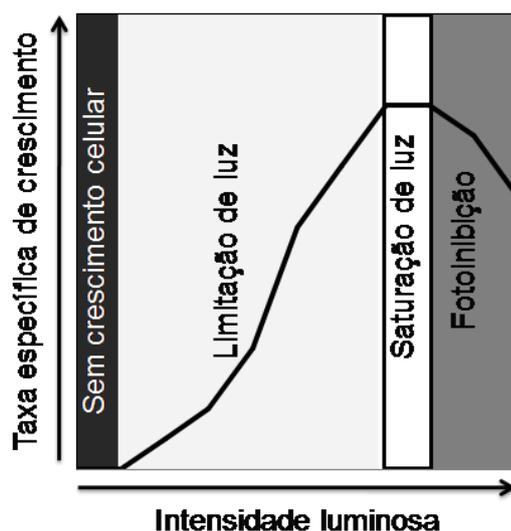


FIGURA 2.7. EFEITO DA INTENSIDADE LUMINOSA NO CRESCIMENTO CELULAR EM CULTIVOS AUTOTRÓFICOS

FONTE: Adaptado de Ogbonna e Tanaka (2000).

Para uma produtividade máxima de biomassa, a faixa de saturação luminosa deve ser homogênea em todo o cultivo. Na prática, entretanto, isso é impossível, principalmente em cultivos em regime batelada que experimenta diferentes concentrações celulares ao longo do cultivo (OGBONNA; TANAKA, 2000).

A iluminação eficiente pode ser um obstáculo na produção de biomassa de microalgas. Assim, além da conformação do fotobiorreator, algumas estratégias de cultivos podem ser empregadas na tentativa de diminuir o impacto negativo que a iluminação pode causar na produção de biomassa, uma delas é manter o cultivo em regime semicontínuo, de modo a controlar a concentração celular por tempo indeterminado. Outra boa estratégia é a utilização do metabolismo heterotrófico da microalga, fornecendo carbono orgânico ao cultivo e mantendo-o na ausência de luz.

2.2.3.2 Cultivo heterotrófico

Embora microalgas sejam organismos fotossintetizantes, sendo algumas delas autótrofas estritas, existem espécies capazes de crescerem na total ausência de luz, desde que haja um substrato orgânico (CHEN e JOHNS, 1996). A oxidação de compostos orgânicos nas microalgas é similar ao de outros organismos heterotróficos, mesmo nas espécies autótrofas obrigatórias que, nesse caso, o carboidrato é endógeno. Impermeabilidade aos compostos orgânicos e a ausência de enzimas essenciais para a completa oxidação do substrato orgânico podem explicar parcialmente as espécies autótrofas estritas (CHEN e CHEN, 2006).

Conforme Chen e Chen (2006) a espécie de microalga deve possuir quatro características para um crescimento heterotrófico: a) facilidade na divisão celular e metabolismo ativo na ausência de luz; b) capacidade para crescer em meios de culturas com carbono orgânico em que a energia necessária para o crescimento seja fornecida pela oxidação de parte do substrato orgânico; c) capacidade de se adaptar rapidamente às mudanças no ambiente; d) capacidade de suportar o estresse hidromecânico de fermentadores.

Microalgas podem assimilar uma grande variedade de carbono orgânico, como glicose, acetato e glicerol (LIANG, SARKANY e CUI, 2009; DEVI, SUBHASH e MOHAN, 2012), frutose, lactose, galactose e manose (LIU *et al.*, 2010) e sacarose (CHENG *et al.*, 2009). Entretanto, o uso de carbono orgânico pode encarecer o processo, de modo que pesquisadores têm estudado diversos resíduos ricos em carbono orgânico para o uso em cultivos heterotróficos. Xu, Miao e Wu (2006) utilizaram pó de milho hidrolisado como fonte de carbono orgânico e conseguiram $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ de biomassa seca e $932 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ de lipídeos. Outros resíduos têm sido testados, como bagaço da cana hidrolisado, resíduo doméstico (DEVI *et al.*, 2012), peixe processado (QUEIROZ *et al.*, 2013) e extrato de dejetos de galinha (LOWREY e YILDIZ, 2014).

Dos diversos substratos orgânicos, a glicose, o acetato e o glicerol são os mais utilizados. A oxidação desses compostos ocorre em diferentes locais dentro da célula, de modo que a síntese de um componente pode ser mais favorecida dependendo da fonte utilizada.

A escolha da fonte de carbono deve ser em função do produto que se deseja obter, uma vez que a composição bioquímica da microalga pode ser influenciada pela fonte de carbono utilizada (LIANG; SARKANY; CUI, 2009). A Tabela 2.3 aborda os resultados obtidos por Liang e seus colaboradores (2009).

TABELA 2.3. COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA MICROALGA *Chorella vulgaris* CULTIVADA EM MEIO HETEROTRÓFICO COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO, INCLUINDO GLUCOSE, ACETATO E GLICEROL

| COMPONENTES DA BIOMASSA (%) | FONTES DE CARBONO | | |
|-----------------------------|-------------------|---------|----------|
| | GLUCOSE | ACETATO | GLICEROL |
| Carboidratos | 44 | 23 | 29 |
| Lipídeos | 21 | 31 | 22 |
| Proteínas | 32 | 42 | 45 |

FONTE: Liang, Sarkany e Cui (2009).

Definitivamente o acetato não é uma fonte ideal quando o objetivo é o ganho de biomassa, mas se a finalidade é a produção de lipídeos, essa pode ser uma fonte de carbono importante. Por outro lado, a glicose está relacionada ao aumento da massa celular com maior produção de carboidratos.

Por não necessitar de luz, é possível manter cultivos heterotróficos com grandes volumes, conseqüentemente, o aumento de escala ocorre com maior facilidade (LI; XU; WU, 2007). Além disso, técnicas e equipamentos elaborados para produção industrial heterotrófica de outros micro-organismos podem ser utilizados para cultivos heterotróficos de microalgas.

Usualmente, cultivos heterotróficos são alimentados com a fonte orgânica apenas uma única vez. Porém, algumas alternativas de alimentação têm sido estudadas, principalmente para evitar a inibição inicial causada pela alta concentração de carbono. A produção de biomassa encontrada em cultivos em regime batelada alimentada, em que a administração do substrato orgânico é realizada mais de uma vez ao longo da duração do cultivo, tem sido maiores em relação ao regime batelada, onde o substrato orgânico é fornecido uma única vez. Espinosa-Gonzalez e seus colaboradores (2014) obtiveram o dobro de biomassa em cultivos sob regime batelada alimentada quando comparado ao cultivo alimentado uma única vez, onde o cultivo em batelada alimentada produziu aproximadamente 10 g L^{-1} .

Cultivos heterotróficos têm sido vistos como uma boa oportunidade de aumentar a produção de carboidratos, proteínas e ácidos graxos, porém alguns compostos de alto valor agregado são produzidos em maiores concentrações apenas na presença de luz. Nesse sentido, cultivo em condição mixotrófica pode ser uma alternativa atraente.

2.2.3.3 Cultivo mixotrófico

Mixotrofia pode ser definido como: Metabolismo que capta energia por meio da catálise de compostos orgânicos externos via respiração e converte energia luminosa em compostos químicos via fotossíntese (CHOJNACKA e MARQUEZ-ROCHA, 2004). Em cultivos mixotróficos o oxigênio liberado na fotossíntese é consumido pela própria célula na rota heterotrófica, diminuindo os danos por fotorrespiração. Da mesma maneira, o CO_2 gerado na respiração mitocondrial é

utilizado pelo processo da fotossíntese. A Figura 2.8 ilustra de forma esquemática o metabolismo mixotrófico.

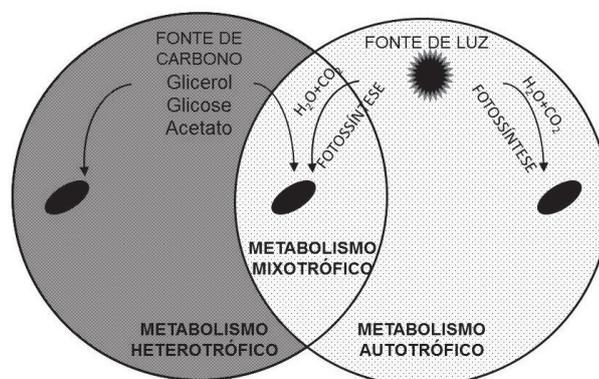


FIGURA 2.8 – METABOLISMO AUTOTRÓFICO, HETEROTRÓFICO E MIXOTRÓFICO

FONTE: Adaptado de Mariano *et al.* (2010).

Cultivos mixotróficos possuem a vantagem de utilizar eficientemente a luz disponível e o carbono orgânico. Esse arranjo resulta em maiores rendimentos de células por unidade de energia de entrada, indicado por Yang e colaboradores (2000), além disso, pigmentos fotossintéticos que tem sua produção diminuída em cultivos heterotróficos, são produzidos em cultivos mixotróficos.

Além dos substratos orgânicos mais utilizados (glicose, acetato e glicerol), resíduos líquidos são amplamente utilizados em cultivos mixotróficos com excelentes resultados, como observado no trabalho de Selesu (2015), que cultivou a espécie *Scenedesmus* sp. em condições mixotróficas com adição de dejetos suíno biodigerido. Os cultivos com adição do efluente suíno alcançaram no último dia de cultivo $1,2 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa seca, já os cultivos em meio sintético, produziram, aproximadamente, $0,6 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa seca. Resíduos em geral deixam o meio turvo, dificultando a penetração do feixe luminoso e diminuindo a taxa de crescimento celular em cultivos autotróficos. Por outro lado, cultivos mixotróficos necessitam de menor intensidade luminosa e o uso dessas fontes alternativas não compromete a produção de biomassa.

2.2.4 Produção de biomassa em diferentes condições de cultivos

A composição celular e as características de crescimento das microalgas variam conforme as condições de cultivo (CHOJNACKA e MARQUEZ-ROCHA, 2004). A Tabela 2.4 compara produtividades de biomassa e produção de lipídeos totais de dois gêneros de microalgas das mais utilizadas, *Chlorella*, *Scenedesmus* e *Acutodesmus*. Embora a produção de biomassa e de lipídeos seja espécie-dependente, a Tabela 2.4 indica que cultivos heterotróficos são, de modo geral, mais produtivos, e de fato, tem sido alvo de muitas pesquisas.

É possível notar que as maiores produtividades de biomassa são observadas na espécie do gênero *Chlorella* (Tabela 2.4). Gao e seus colaboradores (2010) cultivaram a espécie *Chlorella protothecoides* em condições heterotróficas obtendo o melhor resultado para produção de biomassa e lipídeos do cultivo alimentado com sorgo sacarino como fonte de carbono, com uma produtividade de $1,02 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ de biomassa e 52% de lipídeos. O caldo do sorgo sacarino é composto principalmente por sacarose, frutose e glucose, portanto, um excelente substrato para cultivos heterotróficos. Os melhores resultados da microalga *Scenedesmus* também foram obtidos em cultivo heterotrófico. O cultivo foi alimentado com 10% (m/v) de glucose, onde a produtividade de biomassa alcançou $0,56 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e o teor de lipídeos, 43% (REN *et al.*, 2013) (Tabela 2.4).

Por outro lado, a melhor produtividade de biomassa em cultivos de *Chlorella* sob condições autotróficas é observada no trabalho de Pribyl; Cepák e Zachleder (2012). Nesse estudo, os autores cultivaram a espécie *Chlorella sorokiniana* em meio sintético com metade da concentração de nitrato e fosfato e ar enriquecido com 2% de CO_2 , a produtividade de biomassa encontrada foi de $0,410 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e o teor de lipídeos foi de 39% (Tabela 2.2). Esses resultados, apesar de não superarem os valores encontrados em cultivos heterotróficos, são excelentes quando comparados com cultivos autotróficos sem a suplementação de CO_2 ou limitação de nutrientes.

TABELA 2.4. PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA EM CULTIVOS AUTOTRÓFICO, HETEROTRÓFICO E MIXOTRÓFICO EM DIFERENTES ESPÉCIES DE MICROALGAS

| ESPÉCIE | METABOLISMO | FONTE DE CARBONO | PRODUTIVIDADE BIOMASSA (g L ⁻¹ dia ⁻¹) | TEOR DE LÍPIDEOS TOTAIS (%) | REFERÊNCIAS |
|---------------------------------|-------------|---|---|-----------------------------|---|
| <i>Chlorella vulgaris</i> | A | 10 % de CO ₂ | 0,1 | 7 | YOO <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | A | 0,29 % de CO ₂ | 0,28 | 14 | GRIFFTHS; HILLE; HARISSON, 2012 |
| <i>Chlorella</i> sp. | A | Ar atmosférico | 0,13 | 31 | PRAVEENKUMAR <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>Chlorella sorokiniana</i> | A | 2 % de CO ₂ | 0,41 | 39 | PRIBYL; CEPÁK; ZACHLEDER, 2012 |
| <i>Chlorella sorokiniana</i> | A | Ar atmosférico | 0,004 | 5 | ZHENG <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>Acutodesmus obliquus</i> * | A | 2,5 % de CO ₂ | 0,22 | 10 | HO. CHEN; CHANG, 2012 |
| <i>Scenedesmus</i> sp. | A | 0,05 L s ⁻¹ de ar atmosférico | 0,03 | 29 | LEMONS, 2012 |
| <i>Desmodesmus</i> sp. | A | 3% de CO ₃ | 0,08 | 20 | WU <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>Scenedesmus</i> sp. | A | 4 L min ⁻¹ de ar atmosférico | 0,06 | 25 | TAHER, 2013 |
| <i>Scenedesmus</i> sp. | A | 1 L min ⁻¹ de ar atmosférico | 0,07 | 23 | MIYAWAKI, 2014 |
| <i>Scenedesmus</i> sp. | A | 1 L min ⁻¹ de ar atmosférico | 0,05 | 14 | CORRÊA, 2015 |
| | A | 2 L min ⁻¹ de gás de combustão | 0,14 | 15 | |
| <i>Scenedesmus quadricauda</i> | A | Ar atmosférico | 0,09 | 29 | JIANG <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>Chlorella protothecoides</i> | H | 10 g·L ⁻¹ de Glu | 0,74 | 54 | GAO <i>et al.</i> , 2010 |
| | H | 11 g·L ⁻¹ de Sac | 0,24 | 39 | |
| | H | 10 g·L ⁻¹ de Fru | 0,78 | 53 | |
| | H | 10 g L ⁻¹ SCH | 1,02 | 52 | |
| <i>Chlorella protothecoides</i> | H | 15 g·L ⁻¹ de Glu | 0,1 | 31 | WEN <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | H | 10 g·L ⁻¹ de Sac | 0,07 | 33 | RATTANAPOLTEE e KAEWKANNETRA, 2014 |
| <i>Chlorella ellipsoidea</i> | H | 40 g·L ⁻¹ de Glu | 0,04 | 22 | GONZÁLEZ-GARCINUÑO <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>Scenedesmus abundans</i> | H | 40 g·L ⁻¹ de Glu | 0,04 | 7 | |
| <i>Scenedesmus quadricauda</i> | H | 5 g·L ⁻¹ de Glu | 0,45 | 28 | ZHAO <i>et al.</i> 2012 |
| <i>Scenedesmus</i> sp. | H | 10 g·L ⁻¹ de Glu | 0,56 | 43 | REN <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>Acutodesmus obliquus</i> * | H | 40 g·L ⁻¹ de Glu | 0,18 | 12 | GIM <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>Chlorella sorokiniana</i> | M | 0,12 g L ⁻¹ ECFB | 0,03 | 12 | SINGH; REYNOLDS; DAS, 2011 |
| <i>Chlorella minutissima</i> | M | 0,12 g L ⁻¹ ECFB | 0,03 | 8 | |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | M | 20 g·L ⁻¹ de Glu | 0,16 | 20 | GIM <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | M | 10 g·L ⁻¹ de Sac | 0,18 | 25 | RATTANAPOLTEE e KAEWKANNETRA, 2014 |
| <i>Scenedesmus quadricauda</i> | M | 3 g L ⁻¹ de Glu | 0,32 | 31 | ZHAO <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>Scenedesmus</i> sp. | M | 90 mL L ⁻¹ de ARPA | 0,08 | 31 | DI CAPRIO; ALTIMARI; PAGNANELLI, 2015 |
| <i>Acutodesmus obliquus</i> * | M | 20 mL L ⁻¹ de residuo urbano | 0,07 | 18 | JI <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>Acutodesmus obliquus</i> * | M | 4 g L ⁻¹ de Gli | 0,17 | 17 | PATNAIK e MALLICK, 2015 |

FONTE: A autora (2016).

NOTAS: ARPA: Água residual da produção de azeite; ECFB: Efluente da cama de frango biodigerido; Fru: Frutose; Gli: Glicerol; Glu: Glucose; Sac: Sacarose; SCH: Sorgo sacarino hidrolisado.

* *Scenedesmus obliquus*.

Zheng e colaboradores (2016) cultivaram a *Chlorella sorokiana* em meio sintético completo (sem limitar nitrogênio e/ou fósforo) em condições autotróficas sem enriquecimento de CO₂. Seus resultados para produtividade de biomassa e teor de lipídeos foram, respectivamente, 0,004 g L⁻¹ dia⁻¹ e aproximadamente 5%. Cultivos autotróficos sem suplementação de CO₂, ou outra fonte de carbono inorgânico, ou quando há limitação de nutrientes, quase sempre, possuem baixa produtividade de biomassa e lipídeos.

O consumo de CO₂ em cultivos autotróficos e mixotróficos possibilitam o acoplamento da produção de biomassa com tratamento de emissões. Corrêa (2015) cultivou autotroficamente uma espécie de *Scenedesmus* em meio sintético e injeção de gases da combustão de óleo diesel. Além de sugerir um certo grau de tolerância das microalga aos gases presentes na emissão, a produtividade de biomassa chegou a 0,14 g L⁻¹ dia⁻¹, enquanto que no cultivo alimentado com ar atmosférico, esse valor foi de 0,05 g L⁻¹ dia⁻¹. Já o teor de lipídeos sofreu uma pequena alteração, sendo de 15% nos cultivos alimentados com gases de combustão e 14% nos cultivos com ar atmosférico.

Em se tratando de cultivos mixotróficos, espécies de microalga do gênero *Scenedesmus* são mais produtivas em comparação às espécies de *Chlorella* (Tabela 2.2). Zhao e colaboradores (2012) cultivaram a espécie *Scenedesmus quadricauda* em meio sintético com adição de glucose, na presença de luminosidade. Os autores conseguiram uma produtividade de 0,32 g L⁻¹ dia⁻¹ de biomassa e 31% de lipídeos. Meios de culturas com baixa concentração de nitrato favorecem o acúmulo de lipídeos, entretanto, a produtividade de biomassa fica comprometida, pois o nitrato é essencial na divisão celular. No trabalho realizado por Di Caprio, Altamari e Pagnanelli (2015) a microalga *Scenedesmus* sp. foi cultivada em meio sintético com baixa concentração de nitrato e água residual da produção de azeite (ARPA). O teor de lipídeos alcançado foi de 31%, valor dentro da média para essa espécie de microalga, porém, a produtividade de biomassa, 0,08 g L⁻¹ dia⁻¹, ficou próxima aos resultados obtidos em cultivos autotróficos.

Dados da literatura mostram que a melhor estratégia para aumentar a produtividade de biomassa é o cultivo heterotrófico, mas é possível alcançar resultados aceitáveis em cultivos autotróficos e mixotróficos com adição de carbono

inorgânico. Patnaik e Mallick (2015) trabalharam com a microalga *A. obliquus* em culturas autotróficas e conseguiram uma taxa de crescimento de $0,26 \text{ dia}^{-1}$, sem adição de qualquer fonte de carbono orgânico, contudo, ao adicionar 0,3% de acetato, o cultivo alcançou uma taxa de crescimento de $0,45 \text{ dia}^{-1}$.

2.2.5 FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE BIOMASSA

A interação entre fatores físicos, químicos e biológicos influencia diretamente no cultivo de microalgas, podendo promover ou inibir seu crescimento. Os fatores biológicos estão associados ao metabolismo celular e à presença de contaminantes no sistema, enquanto que os fatores físicos e químicos estão relacionados aos efeitos provocados pela luz, temperatura, pH e disponibilidade de fontes de carbono e nutrientes (RAVEN, 1990; RICHMOND, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2006; DERNER, 2006). A seguir serão apresentados os principais fatores que influenciam os cultivos e os efeitos causados sobre o crescimento das microalgas.

2.2.5.1 Influência da luminosidade

A intensidade luminosa está diretamente relacionada à etapa fotoquímica da fotossíntese, quando ocorre a absorção da luz através das moléculas de clorofila, síntese de trifosfato de adenosina (ATP) e a fotólise da água. Em termos gerais, a fotossíntese pode ser definida pelo processo pelo qual a energia luminosa possibilita a síntese de carboidratos e oxigênio a partir de dióxido de carbono e água.

Segundo Lourenço (2006) a iluminação é um dos pilares do cultivo autotrófico de microalgas e requer especial atenção. Derner e seus colaboradores (2006) ressaltam que a quantidade de luz recebida pelas células em cultivo está diretamente relacionada ao carbono que será fixado pelas microalgas e assim influenciará na taxa de crescimento das culturas.

Quando há excesso de luz pode ocorrer o fenômeno de fotoinibição, definido pela alteração e eventual inativação do fotossistema II (PSII), afetando o transporte de elétrons na cadeia de reações de redução NADP⁺ a NADPH. Segundo Taiz e Zeiger (2006), a fotoinibição é um complexo conjunto de processos moleculares, definidos como a inibição da fotossíntese pelo excesso de luz, que pode ser classificado como moderado ou intenso, o que determina se a fotoinibição é dinâmica ou crônica.

2.2.5.2 Efeito da temperatura no cultivo de microalga

Assim como todos os seres vivos as algas apresentam taxa máxima de crescimento relacionada a uma determinada faixa de temperatura, variando de acordo com a espécie e suas adaptações fisiológicas ao meio no qual vive. De maneira geral, abaixo ou acima destes valores ocorre redução na velocidade de crescimento, alterações metabólicas e fisiológicas e/ou morte celular.

A temperatura ideal para os cultivos de microalgas, de modo geral, está entre 20 e 24 °C, embora possa variar em função da espécie utilizada. Para algumas espécies a elevação da temperatura pode diminuir a quantidade de ácidos graxos insaturados e aumentar a quantidade de ácidos graxos saturados (THOMPSON; GUO; RENAUD *et al.*, 2004;). Este fator pode contribuir para a produção de biodiesel de melhor qualidade, elevando o número de cetano e aumentando a estabilidade oxidativa do combustível.

2.2.5.3 Necessidades nutricionais

Apesar de haver muitos elementos químicos presentes nos ambientes aquáticos, sua distribuição não é homogênea. Dessa forma, enquanto alguns componentes ocorrem em elevadas concentrações, outros podem apresentar pouca

disponibilidade. A Tabela 2.5 relaciona os principais macronutrientes dos meios de cultivos para microalgas e suas funções biológicas.

Enquanto nos ambientes naturais a concentração dos nutrientes não é uniforme em função das variáveis ambientais, nos meios de cultivo estes são oferecidos de forma controlada, a fim de fornecer as melhores condições de crescimento das microalgas, sendo que os macronutrientes correspondem a cerca de 80% da massa dos seus componentes.

TABELA 2.5 – MACRONUTRIENTES E FUNÇÕES BIOLÓGICAS

| COMPONENTE | FUNÇÃO BIOLÓGICA |
|-------------------|--|
| Carbono | Componente estrutural de macromoléculas |
| Nitrogênio | Componente estrutural de macromoléculas |
| Fósforo | Realização de processos de troca energética (ATP) |
| Potássio | Regulação osmótica |
| Magnésio | Constituinte da molécula de clorofila |
| Enxofre | Estruturação de proteínas, como cisteína e metionina |
| Ferro | Participação da via de biossíntese da clorofila |

FONTE: Adaptado de Grobelaar (2004).

2.2.5.4 Efeito do pH

O pH afeta diretamente a disponibilidade de vários elementos químicos presentes no meio. Estes podem cristalizar e precipitar dependendo do pH do cultivo. Assim, o pH deve ser mantido próximo à neutralidade para que os componentes do meio possam ser efetivamente absorvidos pelas microalgas (SCHMIDT, 2007; LOURENÇO, 2006).

O crescimento das microalgas envolve o consumo do CO₂ dissolvido no meio, acarretando a elevação do pH (comumente > 10). De maneira inversa, o aumento da concentração de CO₂ solubilizado no meio aquoso pode reduzir o pH (<5) e conseqüentemente inibir o crescimento de algumas espécies de microalgas (PIRES *et al.*, 2012). Apesar de permitirem uma variação discreta no pH dos cultivos, a utilização de soluções tampão pode inviabilizar os custos em sistemas de produção de microalgas em grande escala. Outra maneira de regular as variações

de pH é a aeração dos cultivos, com bombeamento de ar atmosférico (0,03% de CO₂) ou com ar enriquecido de CO₂, em concentração ideal para a espécie utilizada (LOURENÇO, 2006). Em sistemas de cultivo de larga escala o uso de soluções tampão e/ou suplementação de CO₂ pode tornar os custos de produção proibitivos, em função do baixo aproveitamento pelas microalgas.

2.2.6 Recuperação da biomassa

Cultivos de microalgas são relativamente diluídos, de modo que grandes volumes precisam ser manipulados para recuperação da biomassa (GRIMA *et al.*, 2003). A técnica empregada para a recuperação da biomassa de microalgas depende das características das células microalgais, como forma e tamanho, da densidade do cultivo, da aplicação da biomassa e dos custos envolvidos (BRENNAN e OWENDE, 2010). Essencialmente, as principais técnicas utilizadas são a centrifugação, a filtração e a sedimentação, sendo precedidas por uma etapa de floculação.

A recuperação por centrifugação é um método simples que se baseia no tamanho das células e na diferença de densidade entre a biomassa e o meio, podendo ser utilizada por qualquer espécie de microalga (GERERDO *et al.*, 2015). A centrifugação oferece vantagens quando comparadas a outros métodos, pois a biomassa recuperada é livre de floculantes ou de produtos químicos. Apesar de ser rápida, possui grande gasto energético, que deve ser levado em consideração na sua escolha (BOSMA *et al.*, 2003).

A recuperação da biomassa por filtração está baseada na separação sólido-líquido através de uma barreira semipermeável. Essa barreira possui poros menores do que o tamanho das células microalgais que retém as células, mas permite a passagem do líquido. Resultados com a filtragem da espécie *Spirulina platensis* em filtros prensa foram satisfatórios, no entanto, para espécies de microalgas de tamanhos menores, como *Scenedesmus* e *Chlorella*, os resultados não foram satisfatórios. Assim como a centrifugação, a biomassa recuperada por filtração pode

não possuir floculantes ou produtos químicos, no entanto, seu uso é inviável em larga escala, devido ao entupimento das membranas.

A técnica da floculação pode ser aplicada para agregar células e aumentar o tamanho das partículas, facilitando os processos de sedimentação, filtração e centrifugação. Estudos têm mostrado que a floculação em combinação com a sedimentação utilizando biofloculantes pode reduzir os gastos energéticos da centrifugação (LAM *et al.*, 2014). Os agentes floculantes mais utilizados são os sais de metais e polímeros carregados positivamente (HANSEL, RIEFLER, E STUART, 2014). No entanto, compostos como sulfato de alumínio, podem contaminar a biomassa de microalgas (LEE, LEWIS e ASHMAN, 2009) e polímeros carregados positivamente, como as poliácridamidas catiônicas podem decompor em seus substituintes monoméricos que são cancerígenos e neurotóxicos (WEI, CHENG e ZHENG, 2008). Desse modo, esforços têm sido realizados na busca por uma substância química alternativa de baixo custo e alta eficiência energética.

Dos floculantes naturais é possível destacar a quitosana, um polímero catiônico natural de origem animal e fúngica, biodegradável e não tóxica (RIAÑO, MOLINUEVO e GARCÍA GONZÁLEZ, 2012).

2.2.6.1 Recuperação da biomassa por floculação com quitosana

A quitosana é polissacarídeo linear composto por β -(1-4)-ligado D-glucosamina e N-acetil-glucosamina, distribuídos aleatoriamente, obtido da dasacetilação da quitina. A modificação da quitina à quitosana altera suas propriedades, de forma que a quitosana é insolúvel em água, mas solúvel na maioria dos ácidos orgânicos e em alguns ácidos inorgânicos. Devido à grande quantidade de amins primárias em sua cadeia, a quitosana possui diversas aplicabilidades na área biomédica, como carreadores de fármacos ou genes. A quitosana também é muito empregada na área de alimentos, cosméticos e na agricultura e, por ser um polímero de cadeia longa e possuir alta densidade de carga catiônica, a quitosana pode ser empregada como floculante, formando agregados de células densos que precipitam com maior facilidade (DONG; CHEN; LIU, 2014).

A recuperação da biomassa de microalgas por quitosana requer baixas concentrações desse polímero e é aplicável em cultivos das mais variáveis espécies de microalgas. A dosagem ótima de quitosana depende da espécie utilizada. Para as espécies *Tetraselmis chui*, *Thalassiosira pseudonana* e *IsochrYSIS* sp. a melhor concentração é de 40 mg L⁻¹. Por outro lado, uma dose de 150 mg L⁻¹ é necessária para flocular a espécie *Chaetoceros muellari* (HEASMAN *et al.*, 2000). Além disso, a densidade celular e o pH do cultivo podem influenciar na concentração necessária de quitosana. Chen e colaboradores (2013) cultivaram a espécie *Scenedesmus* sp. e avaliaram o efeito da concentração da biomassa na eficiência da floculação. A Tabela 2.6 resume os principais resultados. Ao variarem o pH, a maior eficiência (95%) foi alcançada quando o pH chegou a 9,0, em cultivo com uma concentração de biomassa igual a 0,54 g L⁻¹.

TABELA 2.6 – DOSAGENS DE QUITOSANA NECESSÁRIOS PARA FLOCULAR CULTIVOS DE *Scenedesmus* sp. COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BIOMASSA.

| CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA (g L ⁻¹) | CONCENTRAÇÃO DE FLOCULANTE (g L ⁻¹) | EFICIÊNCIA DA FLOCULAÇÃO (%) |
|---|---|------------------------------|
| 0,23 | 0,03 | 90 |
| 0,41 | 0,06 | 90 |
| 0,53 | 0,08 | > 90 |
| 0,66 | 0,1 | > 90 |

FONTE: Adaptado de Chen e colaboradores (2013)

Adicionar uma etapa de floculação com quitosana, precedendo a da centrifugação, pode representar uma redução significativa no consumo energético durante o processo de recuperação da biomassa. Xu, Purton e Baganz (2013) conseguiram uma redução de 95% no gasto energético ao adicionar uma etapa de floculação com quitosana em cultivos de *Chlorella sorokiniana*.

2.2.6.2 Reaproveitamento do clarificado

Cultivos de microalgas exigem grande volume de água, principalmente cultivos em tanques abertos, devido à alta taxa de evaporação. Todavia, o consumo

pode ser reduzido com a substituição do meio de cultura por águas residuais e/ou reuso do sobrenadante clarificado após a recuperação da biomassa. De acordo com o estudo de Yang e colaboradores (2011), para produzir 1 kg de biodiesel, 3.726 kg de água foram necessários, considerando um cultivo em meio sintético e sem o reuso da água após a recuperação da biomassa. Entretanto, a pegada hídrica foi reduzida em 84% ao reutilizar a água. A substituição do meio de cultura por águas residuais proporcionou uma redução de 90% da pegada hídrica.

Alguns flocculantes alteram o pH do meio de cultura, tornando necessário o seu ajuste para o cultivo posterior, uma etapa que pode encarecer o produção de biomassa. Farid e seus colaboradores (2013) realizaram o reuso do sobrenadante clarificado da floculação com quitosana e nanoquitosana em cultivos de *Nannochloropsis* sp. Apesar de ter sido necessário o ajuste do pH para os cultivos subsequentes, os resultados são animadores, sendo que a produção de biomassa em cultivos com a água reciclada aumentou em 7%.

Wu e seus colaboradores (2015) reutilizaram a água após recuperação da biomassa por floculação em cultivos de *Acutodesmus obliquus* e *Scenedesmus* sp. Foram utilizados cinco agentes flocculantes, incluindo a quitosana, e em todos os casos não houve nenhum impacto negativo na produção de biomassa. Entretanto, os autores realizaram apenas um reuso, não avaliando o possível efeito cumulativo dos agentes flocculantes.

Quitosana possui atividade antimicrobiana (MUZZARELLI *et al.*, 1990), assim, é possível que em certos níveis esse polímero seja tóxico ao cultivo de microalgas. Delrue e seus colaboradores (2015) testaram essa possível toxicidade com adição de quatro diferentes concentrações de quitosana (0,1 mg L⁻¹, 0,5 mg L⁻¹, 1 mg L⁻¹ e 2 mg L⁻¹) em cultivos de *Chlamydomonas reinhardtii* por sete dias. Os resultados mostraram que a quitosana não apresentou toxicidade às células de microalgas dessa espécie até a concentração de 2 mg L⁻¹. Não foi observado grandes variações na produção de biomassa e, com exceção dos cultivos que cresceram com 2 mg L⁻¹ de quitosana, apresentou um pequeno aumento conforme aumentou a concentração do flocculante. Contudo, mais estudos devem ser realizados para confirmar a toxicidade da quitosana em cultivos de microalga em

concentrações acima das estudadas, bem como avaliar os impactos em outras espécies de microalgas.

A grande quantidade de água utilizada em cultivos de microalgas é um dos principais gargalos para que a produção de microalgas em larga escala seja sustentável, economicamente e ambientalmente. Por essa razão, a recuperação da água entra como uma etapa crucial na produção de biomassa.

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Existe um grande interesse na biomassa de microalgas devido aos seus produtos, tais como carboidratos e lipídeos. Esses compostos possuem alto valor agregado, de modo que estratégias de cultivos são desenvolvidas visando o aumento da produção. Dessa maneira, são de fundamental importância a investigação científica e o desenvolvimento de novas metodologias de cultivo de microalgas que viabilizem o aumento da produção de biomassa.

Em relação à espécie *Acutodesmus obliquus* e com base na literatura, é possível destacar alguns pontos que devem ser mais bem explorados, como a resposta celular dessa espécie a cultivos em regime semicontínuo em ambiente externo e a avaliação da interação dos cultivos em condições autotróficas e heterotróficas, bem como a forma de alimentação do substrato orgânico.

Uma etapa importante da produção de biomassa é a sua recuperação, procedimento que possui um grande volume de água residual que tem potencial para ser reutilizada. A literatura aponta diversos estudos nessa temática, mas poucos estudos são desenvolvidos em ambiente externo em cultivos sob regime semicontínuo.

3.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo teve como objetivo principal utilizar uma estratégia de cultivo que possibilitasse o aumento da produtividade de biomassa de microalgas nos fotobiorreatores desenvolvidos pelo NPDEAS, por meio da integração de dois modelos de cultivos: o regime semicontínuo, cultivado sob condições autotróficas, e o cultivo heterotrófico, com adição de carbono orgânico em diferentes concentrações e alimentação.

3.1.1 Objetivos específicos

Para atingir o objetivo geral estabelecido, foram determinados os seguintes objetivos específicos a serem alcançados durante a realização do trabalho:

- Avaliar o aumento da produtividade de biomassa em cultivos realizados com a microalga *Acutodesmus obliquus* em condições autotróficas, nos regimes batelada e semicontínuo, realizados em escala laboratorial;
- Realizar o escalonamento da produção de biomassa por metodologias de cultivo integradas utilizando fotobiorreatores *airlift* em condições ambientais de operação;
- Integrar as metodologias de cultivo em regime semicontínuo realizados em fotobiorreator *airlift* com o cultivo sob condições heterotróficas;
- Determinar a viabilidade do reuso do efluente de floculação e recuperação da biomassa como meio de cultivo, a fim de minimizar as perdas decorrentes do processo e avaliar o aumento da produtividade;
- Determinar a composição da biomassa obtida nas diferentes etapas de produção quanto aos teores de lipídeos totais.

Um fluxograma dos objetivos específicos e as correspondentes estratégias estabelecidas para alcançá-los é apresentado na Figura 3.1.

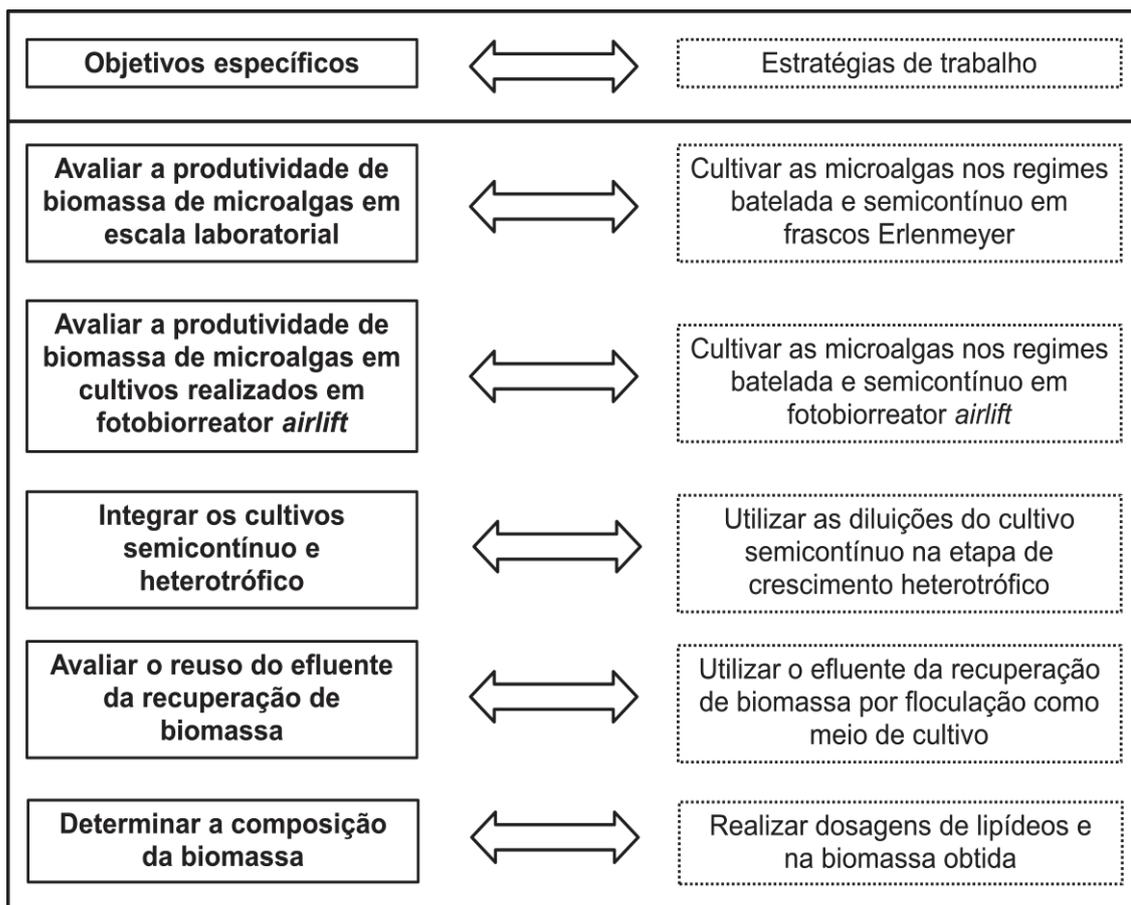


FIGURA 3.1 – FLUXOGRAMA DAS ESTRATÉGIAS DE TRABALHO
 FONTE: A Autora (2016).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia adotada para este trabalho consiste, num primeiro momento, na realização de cultivos em regimes de cultivo diferenciados, batelada e semicontínuo, a fim de comparar a produtividade entre ambos em ambiente climatizado. Ao término dessa etapa a estratégia foi repetida em maior escala utilizando fotobiorreatores *airlift* em ambiente externo, realizando a integração da produção de biomassa em regime semicontínuo sob condições autotróficas com o cultivo em condições heterotróficas. Além do aumento da produtividade em si, foi realizada uma etapa para avaliar a viabilidade do reuso do efluente da recuperação de biomassa por floculação, a fim de identificar o seu efeito na produção de biomassa. A Figura 4.1 ilustra de maneira resumida as etapas experimentais realizadas.

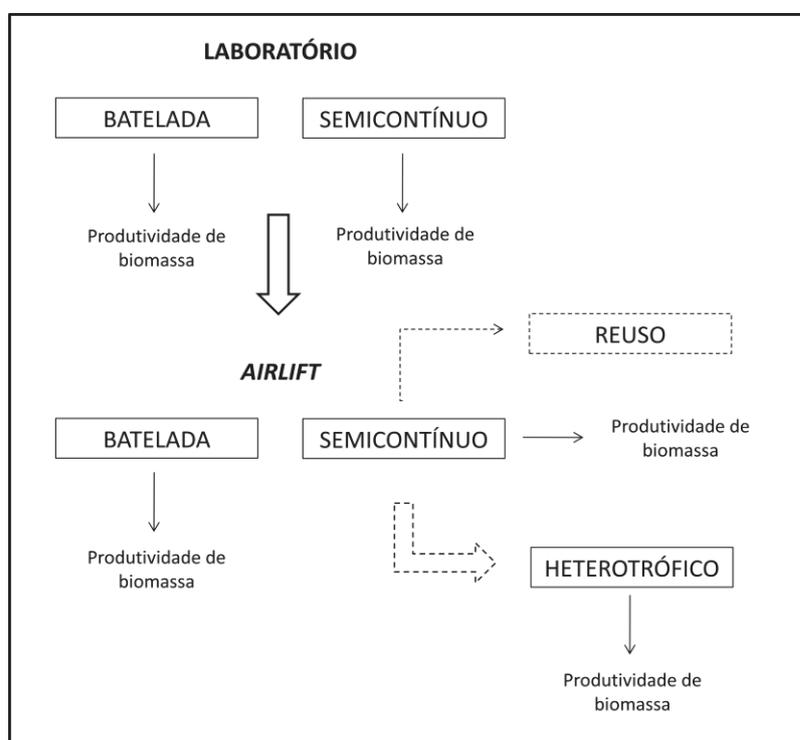


FIGURA 4.1 – FLUXOGRAMA DAS ETAPAS EXPERIMENTAIS
 FONTE: A Autora (2016).

Resumidamente, os experimentos foram realizados em duas etapas distintas, sendo a primeira em ambiente climatizado e condições como luminosidade e temperatura controladas; e a segunda em ambiente externo, sujeita à variações ambientais do período. A seguir serão apresentadas detalhadamente as particularidades do aparato experimental e variações nas metodologias.

4.1 INFRAESTRUTURA PARA REALIZAÇÃO DOS CULTIVOS

Como descrito anteriormente, os cultivos foram realizados em duas etapas distintas, em ambiente climatizado e escala laboratorial e em ambiente externo utilizando fotobiorreatores *airlift*. Nas seções a seguir serão apresentados os materiais utilizados durante os ensaios.

4.1.1 Fotobiorreator – Erlenmeyer

A primeira fase desse estudo foi realizada na sala de cultivo do NPDEAS, com controle de temperatura (22 ± 2 °C) e luminosidade constante. Os fotobiorreatores (FIGURA 4.2) dispostos em prateleiras foram iluminados por duas lâmpadas fluorescentes tubulares de 40 W (2700 lumens) e receberam injeção de ar atmosférico comprimido continuamente na vazão de 1 L min^{-1} .

Os FBRs utilizados foram frascos Erlenmeyers de 2000 mL de volume útil com entrada dos gases por meio de um canal que leva o ar contendo CO_2 até o fundo do FBR. O borbulhamento causado pela injeção de ar proporciona a homogeneização do cultivo, bem como facilita a retirada de O_2 . A saída dos gases ocorre pela porção superior do FBR através de um orifício (FIGURA 4.2).

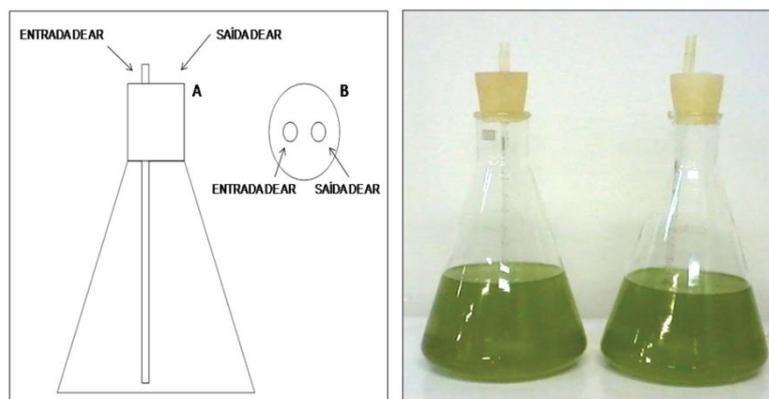


FIGURA 4.2 – FOTOBIORREATOR UTILIZADO EM ESCALA LABORATORIAL. Esquerda: figura ilustrativa do fotobiorreator. A) imagem vista de frente; B) entrada e saída de ar do fotobiorreator vistas de cima. Direita: fotografia do fotobiorreator utilizado em escala laboratorial.
 FONTE: A Autora (2016).

4.1.2 Fotobiorreator – *airlift*

A segunda fase desse estudo foi realizada em ambiente externo para avaliar o regime semicontínuo em condições naturais de temperatura e luminosidade.

O FBR utilizado nessa fase é tubular do tipo *airlift* constituído de tubulações de policloreto de vinil (PVC) transparente, permitindo a passagem da luz solar. Possuem volume operacional aproximado de 11 L e apresentam duas colunas verticais, uma com fluxo de circulação ascendente, proporcionado pela injeção de ar comprimido na porção inferior, e uma coluna de circulação descendente, fechando a circulação no interior do reator.

O modelo de FBR utilizado nesse estudo foi desenvolvido pelo NPDEAS como resultado do trabalho conjunto da equipe de alunos e pesquisadores, e como resultado desse trabalho é possível destacar o depósito da patente denominada “Fotobiorreator tubular para tratamento integrado de efluentes líquidos e emissões” (BR 10 2013 026395 8). A Figura 4.3 apresenta os fotobiorreatores modelo *airlift* utilizados para a realização desse trabalho.

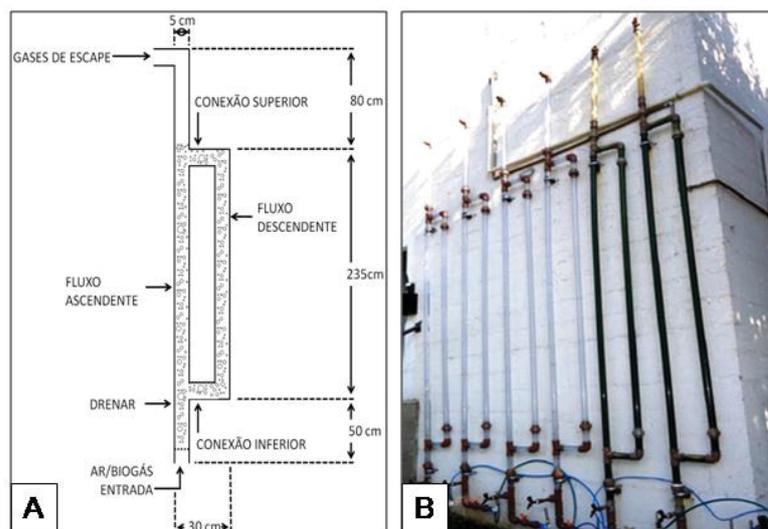


FIGURA 4.3 – FOTOBIORREATOR AIRLIFT. A: figura ilustrativa do fotobiorreator airlift; B: fotografia do fotobiorreator *airlift*
 FONTE: NPDEAS (2016).

4.1.3 MATERIAL BIOLÓGICO

Para realização desse trabalho foi utilizada a microalga *Acutodesmus obliquus* (FIGURA 4.4), que foi isolada pelo NPDEAS da rede diretamente da rede de água do município de Curitiba após a realização de testes de estanqueidade na tubulação PVC dos fotobiorreatores. Inicialmente, as características morfológicas da espécie utilizada permitiram a identificação apenas do gênero ao qual pertence, entretanto, recentemente foi possível determinar a espécie pelo uso de ferramentas moleculares (sequenciamento de DNA).

Estudos anteriores realizados por alunos do NPDEAS indicam a microalga *Acutodesmus obliquus* como uma espécie promissora na produção de biomassa e lipídeos em larga escala, além do alto potencial em tratamentos de emissões e efluentes agroindustriais.

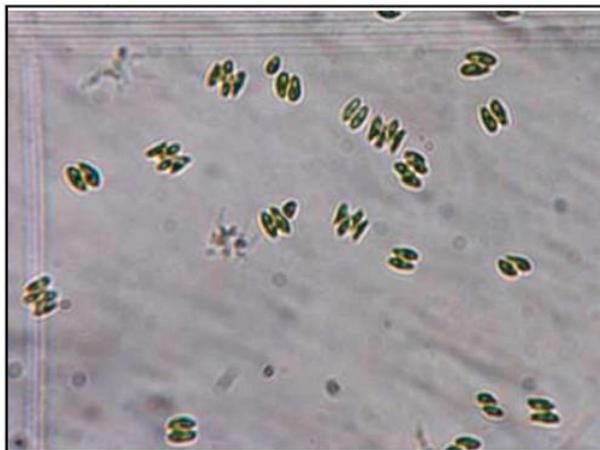


FIGURA 4.4 – *Acutodesmus obliquus*
FONTE: A Autora (2015).

4.1.4 Meio de cultivo

Todos os cultivos realizados nesse trabalho foram mantidos em meio de cultura sintético elaborado por Chu (1942) com uma modificação em um elemento traço, o óxido de molibdênio que foi substituído por molibdato de sódio di-hidratado, sendo que a massa do novo reagente foi calculada para manter o número de mols do molibdênio da composição original (Tabela 4.1).

Os meios de cultura sintéticos são elaborados com macronutrientes, micronutrientes e elementos traços essenciais para o crescimento das microalgas. Dos meios já utilizados pelo grupo, a taxa de crescimento celular utilizando meio CHU foi maior quando comparada às outras taxas de crescimento em outros meios de cultivos. Desse modo, o meio CHU é o meio padrão utilizado na sala de cultivo do NPDEAS.

Todos os reagentes utilizados para compor o meio de cultura apresentam 98% de pureza (P.A.), a fim de garantir maior controle das condições.

TABELA 4.1 – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO CHU

| Componente | Concentração final (g L⁻¹) |
|-------------------------------------|--|
| Nitrato de sódio | 0,25 |
| Cloreto de cálcio di-hidratado | 0,025 |
| Sulfato de magnésio hepta-hidratado | 0,075 |
| Fosfato de potássio dibásico | 0,075 |
| Fosfato de potássio monobásico | 0,175 |
| Cloreto de sódio | 0,025 |
| EDTA | 0,05 |
| Hidróxido de potássio | 0,031 |
| Sulfato ferroso hepta-hidratado | 0,005 |
| Ácido bórico | 0,01142 |
| Sulfato de zinco hepta-hidratado | 8,82x10 ⁻⁵ |
| Cloreto de manganês tetra-hidratado | 1,44x10 ⁻⁵ |
| Molibdato de sódio di-hidratado | 7,1x10 ⁻⁶ |
| Sulfato de cobre penta-hidratado | 1,57x10 ⁻⁵ |
| Nitrato de cobalto hexa-hidratado | 4,9x10 ⁻⁶ |

FONTE: A Autora (2016).

4.2 AVALIAÇÃO DOS CULTIVOS

4.2.1 Caracterização da cinética de crescimento

A metodologia empregada para caracterização da cinética de crescimento foi proposta por Lourenço (2006). A contagem celular foi realizada com auxílio de uma câmara de Neubauer em um microscópio óptico da marca Bioval, utilizando magnificação de 400 X. A concentração celular foi expressa em número de células mL⁻¹ de uma média de três contagens. As contagens foram realizadas diariamente num horário fixo, a fim de padronizar o intervalo de crescimento entre as análises. A partir dos dados de contagem celular foram elaborados gráficos que ilustram a curva de crescimento da microalga.

A fim de melhor descrever o perfil observado, a equação logística de crescimento foi ajustada aos dados de concentração celular por regressão não linear utilizando o programa TK-Solver 5.0, a partir da equação a seguir:

$$N = \frac{N_{\max}}{\left[1 + \left(\frac{N_{\max}}{N_0 - 1} \right) \cdot e^{-\mu t} \right]} \quad (4.1)$$

onde:

N = concentração celular (células·mL⁻¹);

N_0 = concentração celular inicial (células·mL⁻¹);

N_{\max} = concentração celular máxima (células·mL⁻¹);

μ = velocidade específica de crescimento (dia⁻¹);

t = tempo de cultivo (dias)

4.2.2 Determinação da biomassa seca

A determinação da biomassa seca foi realizada em dias alternados, em triplicata utilizando o método gravimétrico. Para a realização dessa metodologia foi utilizada a balança analítica da marca Shimadzu, modelo AUW220D com resolução de 0,0001 g e calibrada pelo Instituto de Pesos e Medidas do Paraná (IPEM – PR) de acordo com a NBR ISSO/IEC 17025, sob o nº 155. Os resultados estão expressos em g L⁻¹. Para tanto, microfiltros de fibra de vidro Macharey-Nagel GF-1, diâmetro de 47 mm e capacidade de retenção de 0,7 µm foram mantidos em estufa a 60 °C até massa constante, assegurando a total retirada de umidade. Depois de aferir as massas dos microfiltros, 10 mL retirados dos cultivos foram filtrados com auxílio de uma bomba à vácuo, os microfiltros foram igualmente submetidos à secagem completa. Novamente, as massas dos microfiltros contendo biomassa foram aferidas. A equação a seguir foi utilizada nos cálculos gravimétricos:

$$BS = \frac{M_2 - M_1}{V} \quad (4.2)$$

onde:

BS = biomassa seca ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$);

M_1 = massa do microfiltro vazio (g);

M_2 = massa do microfiltro com biomassa de microalga (g);

V = alíquota filtrada (L).

4.2.3 Produtividade de biomassa

Uma das maneiras de avaliar o crescimento celular é a partir dos cálculos de produtividade em biomassa dos cultivos, dessa maneira a equação abaixo foi utilizada:

$$P = \frac{BS_f - BS_i}{t} \quad (4.3)$$

onde:

P = produtividade ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$);

BS_i = biomassa seca no dia zero de cultivo ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$);

BS_f = biomassa seca no último dia de cultivo ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$);

t = tempo decorridos em dias entre a BS_i e a BS_f .

4.2.4 Quantificação de lipídeos totais

Para extração de lipídeos totais, foi utilizada uma metodologia de extração a frio proposta por Bligh e Dyer (1959) e adaptada de Soares (2010). Para tanto, foram

utilizados 50 mg de biomassa seca em tubos de polipropileno de 15 mL (tubo 1) e adicionado 3 mL da solução clorofórmio:metanol (2:1) e 10 µL de butil hidróxi tolueno (1% em metanol). Em seguida as amostras foram submetidas a três ciclos de sonicação por 15 minutos cada em um banho de ultrasson (Única Ultra Cleaner 1400, frequência 40 kHz). Ao término da sonicação as amostras foram mantidas a 4° C ao abrigo da luz (para evitar a fotodegradação do material) por 24 horas para favorecer a extração de lipídeos.

Após 24 horas, as amostras foram novamente submetidas a três ciclos de sonicação por 15 minutos cada e centrifugados a 5000 rpm por 5 minutos a 5° C. O sobrenadante com a fase lipídica foi recuperado e reservado em outro tubo de polipropileno de 15 mL (tubo 2). Ao material que ficou no tubo 1, foi adicionado 1,5 mL de clorofórmio:metanol (2:1) para mais uma extração. Novamente o tubo foi centrifugado a 5000 rpm por 5 minutos a 5° C, o sobrenadante recuperado e reservado no tubo 2.

Foi adicionado 2 mL de água destilada e 1 mL de clorofórmio ao tubo 2. As amostras foram agitadas e centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos a 5° C. Em seguida a fase inferior contendo clorofórmio e lipídeos foi recuperada e transferida a um frasco de vidro com massa previamente determinada (tubo 3). A fase aquosa restante no tubo 2 foi lavada com 1 mL de clorofórmio, centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos a 5° C. A fase inferior foi recuperada e transferida ao tubo 3.

O tubo 3 foi deixado numa capela de exaustão onde o clorofórmio da fase clorofórmio:lipídeo foi evaporado. Então a massa do frasco contendo os lipídeos foi determinado e a quantidade de lipídeos foi mensurada a partir da seguinte equação:

$$LT = m_f - m_0 \cdot \frac{100}{m_b} \quad (4.4)$$

onde:

LT = lipídeos totais da amostra seca utilizada (%);

m_0 = massa do frasco de vidro vazio (g);

m_f = massa do frasco de vidro contendo lipídeos (g);

m_b = biomassa seca utilizada na extração de lipídeos.

4.3 REGIMES DE CULTIVO

A fim de comparar a produtividade entre diferentes regimes de cultivos, a microalga utilizada nesse trabalho foi submetida aos regimes semicontínuo e batelada. Os experimentos foram realizados em duas fases: i) a primeira fase consistiu em cultivos em ambiente interno, com controle da temperatura e luminosidade; ii) a segunda fase foi realizada em ambiente externo para avaliar a reprodutibilidade dos resultados obtidos na sala de cultivo, utilizando reatores *airlift* em escala piloto e em ambiente sem controle das condições climáticas.

A Figura 4.5 ilustra de maneira resumida a diferença entre o cultivo batelada e semicontínuo.

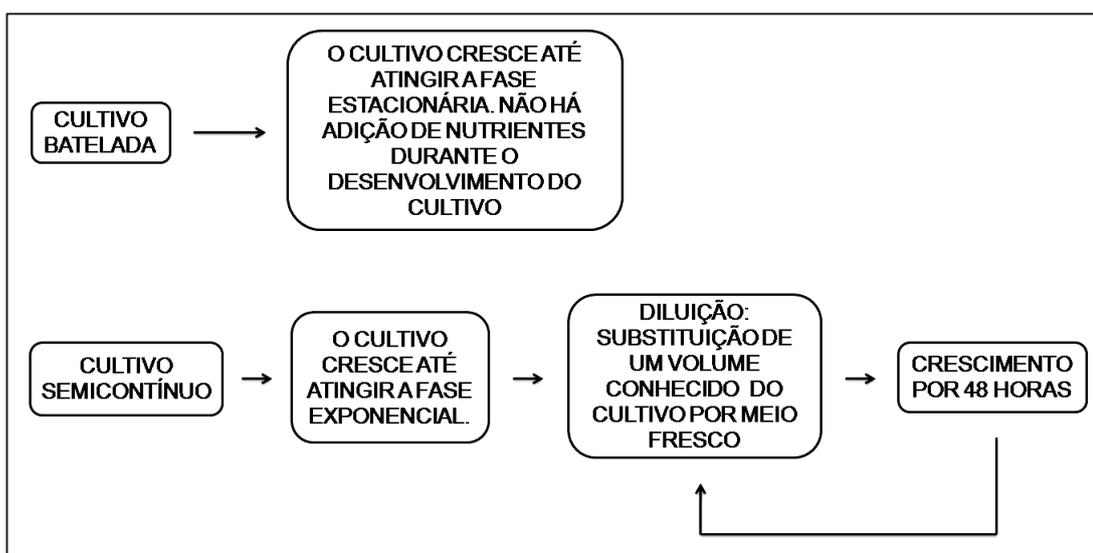


FIGURA 4.5 – CULTIVOS EM BATELADA E SEMICONTÍNUO
 FONTE: A autora (2016)

A seguir serão detalhadas as metodologias adotadas para a realização dos cultivos em regime batelada e semicontínuo.

4.3.1 Regime batelada

Os cultivos realizados em regime batelada em escala laboratorial foram mantidos na sala de cultivo, em frascos Erlenmeyer com volume operacional de 1,8 L, iluminação e temperatura constantes e vazão de ar de 1 L min⁻¹. A duração dos cultivos ocorreu em função das fases dos cultivos em batelada, assim sendo, aos 21 dias, os cultivos estavam na fase estacionária, período em que a taxa de crescimento é muito baixa.

Os cultivos realizados em ambiente externo utilizando fotobiorreator *airlift*, foram mantidos com volume aproximado de 11 L cada com vazão de entrada de ar de 2 L min⁻¹. Uma vez que foram realizados em condições ambientais de temperatura e luminosidade, essas variáveis não foram controladas, sendo realizado seu monitoramento para posterior correlação com os dados de crescimento. Os cultivos foram encerrados aos 23 dias de crescimento, pois já haviam entrado na fase estacionária, fase em que o cultivo possui baixa taxa de crescimento.

4.3.2 Regime semicontínuo

Os cultivos em regime semicontínuo são caracterizados pela retirada de um volume conhecido e substituição por meio novo sem células, processo aqui denominado diluição. As diluições podem ser realizadas a qualquer momento, contudo, normalmente inicia-se após alguns dias de cultivo, quando já se tem grande concentração de biomassa.

Em ambos os experimentos, na sala de cultivo e em *airlift*, as culturas cresceram em batelada até o 11º dia quando se observou o início da fase estacionária. A partir de então, o regime semicontínuo foi mantido até o final das

culturas. Os cultivos em regime semicontínuo tiveram a mesma duração que os cultivos em batelada, 21 dias para os experimentos na sala de cultivo e 23 para os cultivos em *airlift*, de modo a facilitar a comparação entre os regimes. Todos os cultivos (sala de cultivo e *airlift*) iniciaram com a mesma concentração celular, com a finalidade de minimizar as interferências iniciais.

O intervalo de tempo entre as diluições, fixado em 48 horas em todos os experimentos (sala de cultivo e *airlift*), foi determinado levando em consideração a sua aplicabilidade em fotobiorreatores de 10 m³ instalados no NPDEAS. A partir da determinação do intervalo entre as diluições, foram calculadas as taxas de diluições.

Para definir o volume de cultura retirado em cada diluição (taxa de diluição) foram utilizados dois indicadores: i) taxa específica de crescimento que descreve a variação da concentração celular no período de crescimento exponencial (Eq. 4.5); ii) taxa instantânea de crescimento pós diluição, que representa a variação da concentração celular no intervalo de tempo após a diluição do cultivo (4.6).

$$r = \frac{\ln\left(\frac{N_t}{N_0}\right)}{\Delta t} \quad (4.5)$$

$$rD = \frac{\ln\left(\frac{1}{1-D}\right)}{\Delta t} \quad (4.6)$$

onde:

r: taxa específica de crescimento (dia⁻¹);

rD: taxa instantânea de crescimento do cultivo que sofre diluição (dia⁻¹);

ln: logaritmo natural;

N_t: número de células final (·10⁴ células mL⁻¹);

N₀: número de células inicial (·10⁴ células mL⁻¹);

D: taxa de diluição do cultivo (%);

Δt : intervalo de tempo decorrido entre as diluições, em dias.

A taxa de diluição (Eq. 4.7) é calculada para que a taxa de crescimento posterior à diluição seja igual à taxa de crescimento anterior a diluição, de modo que o número de células se recupere dentro do intervalo de tempo estabelecido (48 horas).

$$D = \frac{F}{V} \quad (4.7)$$

onde:

D: taxa de diluição (%);

F: alíquota removida do cultivo (mL dia⁻¹);

V: volume total do cultivo (mL).

4.3.3 Cultivo integrado semicontínuo e heterotrófico

A integração entre o cultivo semicontínuo e o cultivo heterotrófico ocorreu durante a etapa realizada em fotobiorreator *airlift*, porém o crescimento sob metabolismo heterotrófico foi realizado em frascos Erlenmeyer na sala de cultivo em função do pequeno volume utilizado e da infraestrutura necessária. Resumidamente, o volume retirado nas diluições do cultivo semicontínuo foi utilizado para inoculação dos frascos Erlenmeyer com volume de 1,2 L. Além do volume de cultivo em si, em cada experimento foi adicionada glucose como fonte de carbono em concentrações de 70 g L⁻¹. A concentração de glucose escolhida apresentou o melhor resultado em produção de biomassa seca no estudo realizado por Oliveira (2013b). Uma vez que o modo de alimentação do substrato orgânico pode influenciar a produção de biomassa (MORAIS, 2011), foram administradas três alimentações, sendo que o

experimento 1 recebeu 70 g L^{-1} de glucose em uma única etapa no momento da inoculação; o experimento 2 foi alimentado com 14 g L^{-1} a cada 48 horas; por fim, o experimento 3 foi alimentado diariamente com 7 g L^{-1} de glucose (Tabela 4.2). O fotobiorreator utilizado nos cultivos heterotróficos foi adequado para não receber nenhum feixe de luz.

TABELA 4.2 – EXPERIMENTOS REALIZADOS COM ADIÇÃO DE CARBONO ORGÂNICO

| Experimento | Glucose | Duração dos cultivos (dias) |
|-------------|---|-----------------------------|
| 1 | $70 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ | 10 |
| 2 | $14 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^a | 10 |
| 3 | $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^b | 10 |

FONTE: A autora (2016).

NOTA: a) glucose adicionada a cada 48 horas. b) glucose adicionada a cada 24 horas.

Para melhor compreensão, a Figura 4.6 resume de forma esquemática o procedimento utilizado no sistema integrado nesse estudo.

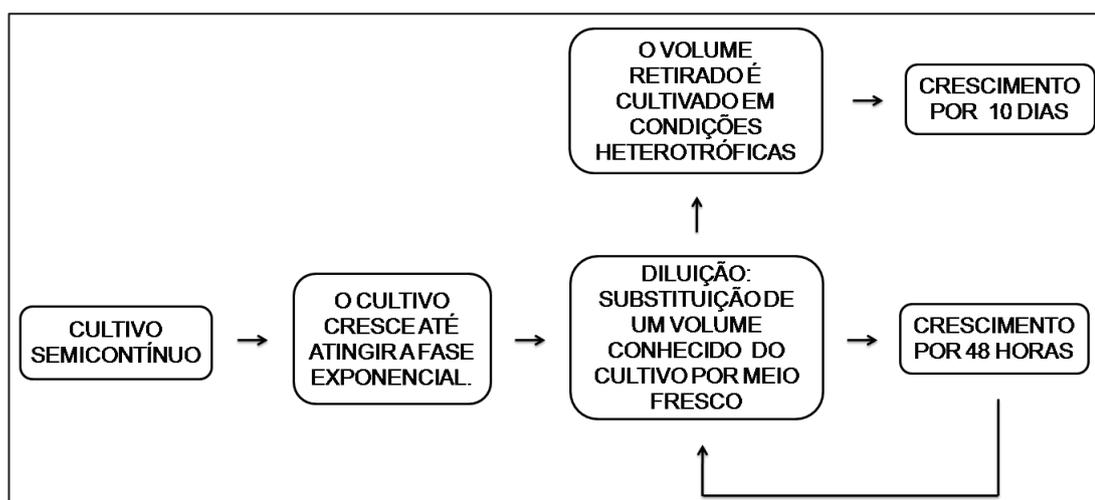


FIGURA 4.6 - SISTEMA INTEGRADO SEMICONTÍNUO E HETEROTRÓFICO
FONTE: A Autora (2016).

4.4 RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA

A recuperação da biomassa foi realizada por meio da floculação e sedimentação das células de microalgas utilizando quitosana como agente floculante. Após a floculação e sedimentação, o sobrenadante clarificado foi reutilizado em três diluições em um cultivo sob regime semicontínuo. A seguir será detalhada a metodologia para floculação e a forma de cultivo.

4.4.1 Floculação com quitosana

Para recuperação da biomassa de microalgas os cultivos passaram por uma etapa de floculação. O método consistiu na utilização de quitosana na concentração de 10 mg L^{-1} dissolvida em ácido acético a 1%. A floculação foi realizada sob duas agitações, uma rápida a 200 rpm por 10 segundos seguida de uma agitação lenta a 50 rpm por 10 minutos. Decorrido o tempo de agitação, houve uma espera de 10 minutos para ocorrer a sedimentação da biomassa e posterior separação do sobrenadante clarificado. O sobrenadante foi separado e reservado para utilização nas diluições em um cultivo semicontínuo. A biomassa sedimentada passou ainda por um processo de filtração e secagem. Após secagem completa a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ a biomassa foi macerada e armazenada em freezer a $-4 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.4.2 Cultivo semicontínuo utilizando o sobrenadante clarificado da floculação

Os cultivos foram realizados em regime semicontínuo, utilizando fotobiorreatores do tipo *airlift* em ambiente externo e meio de cultura sintético CHU. Aos 9 dias de crescimento, o cultivo passou pelo processo de diluição e floculação do volume retirado. Após a recuperação da biomassa por meio da floculação com quitosana, o volume do sobrenadante clarificado (água livre de biomassa) foi utilizado para recompor as diluições do cultivo semicontínuo. O experimento teve

duração de 21 dias desde a inoculação do sistema até a sua finalização. Ao longo do período do cultivo foram realizadas 6 diluições, sendo três reutilizando o sobrenadante clarificado da floculação e três diluições utilizando água da rede de abastecimento, de modo intermitente. Contagem celular e quantificação biomassa seca foram realizadas a cada 48 horas, momentos de diluição, conforme metodologia descrita nos itens 4.1.5 e 4.1.6. A taxa de diluição foi calculada seguindo a metodologia do item 4.2.2.

A Figura 4.7 resume de forma esquemática o procedimento empregado nesse experimento.

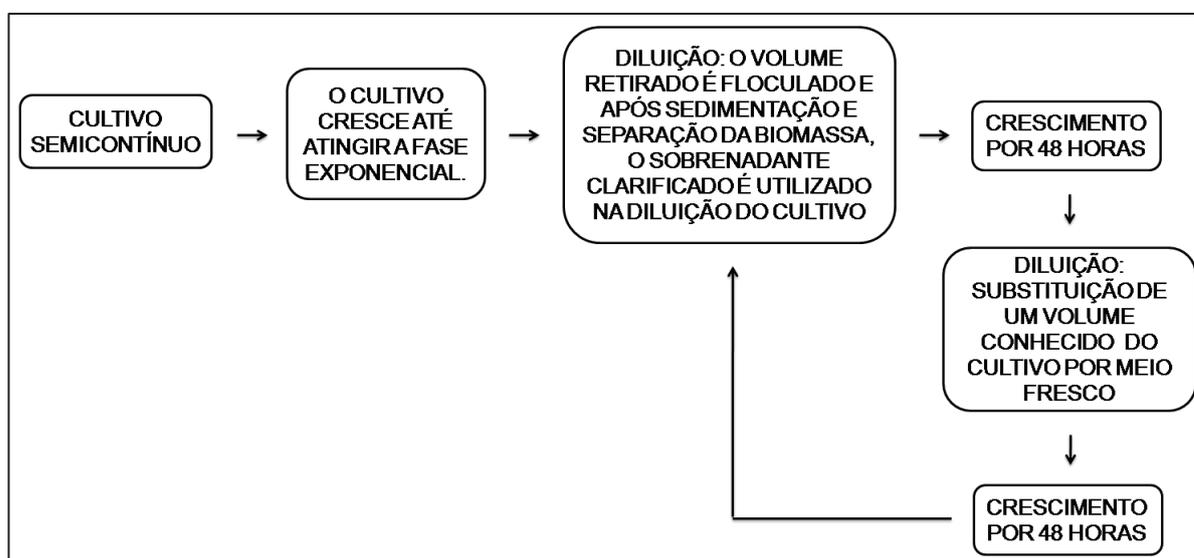


FIGURA 4.7 –CULTIVO SEMICONTÍNUO COM REUSO DO SOBRENADANTE CLARIFICADO
 FONTE: A autora (2016).

4.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DAS AMOSTRAS

Os valores de densidade celular e biomassa seca apresentados nesse trabalho são as médias dos resultados das amostras de cada experimento, acompanhadas dos erros (desvio padrão) das amostras:

$$S = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - x)^2}}{(n-1)} \quad (4.8)$$

Onde:

S = desvio padrão;

x_i = valor individual das amostras;

x = média aritmética dos valores das amostras;

n = número de amostras.

Os desvios padrão foram multiplicados por dois para que o nível de significância dos erros abrangesse 95% dos valores das amostras. Para determinar se duas amostras apresentavam diferenças significativas foi aplicado o teste estatístico t de *student*, com a utilização das ferramentas de análise do Excel, com nível de significância de 5%, onde:

- $p > 0,05$ significa que não houve diferença significativa entre os valores das médias das amostras;
- $p < 0,05$ significa que houve diferença significativa entre os valores das médias das amostras.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados a seguir foram obtidos de experimentos utilizando a espécie de microalga *Acutodesmus obliquus* cultivadas sob condições autotróficas nos regimes batelada e semicontínuo e em um sistema integrando o regime semicontínuo com o crescimento heterotrófico. Os cultivos foram realizados em dois fotobiorreatores distintos, um em ambiente interno numa sala de cultivo com controle de temperatura e luminosidade e o outro realizado em ambiente externo em reatores do tipo *airlift* sem controle da temperatura e luminosidade.

5.1. CULTIVOS EM FOTOBIORREACTORES ERLLENMEYER – BATELADA E SEMICONTÍNUO

Nos cultivos em regime batelada, a concentração celular máxima e a velocidade específica de crescimento foram calculadas utilizando uma equação da cinética de crescimento com valores ajustados pelos valores obtidos. No modelo de crescimento logístico uma população crescerá até certo limite, apresentando um período de desaceleração e atingindo uma fase estacionária. Essa diminuição da velocidade do crescimento ocorre devido à capacidade suporte que é determinada por fatores ambientais. Em cultivos autotróficos de microalgas esses fatores são a disponibilidade de nutrientes, luminosidade e fonte de carbono inorgânico. Por outro lado, cultivos em regime semicontínuo não apresentam esse perfil, uma vez que são realizadas diluições periodicamente, mantendo o cultivo em condições para manter um crescimento exponencial por um longo período de tempo (LOURENÇO, 2006).

A concentração celular (X_c) nos cultivos em regime batelada e semicontínuo realizados na sala de cultivo iniciaram com $129 \pm 11 \cdot 10^4$ células mL⁻¹ com duração de 21 dias (FIGURA 5.1). A taxa de diluição do cultivo semicontínuo foi de 35%, calculada em função da taxa de crescimento observada durante a fase exponencial.

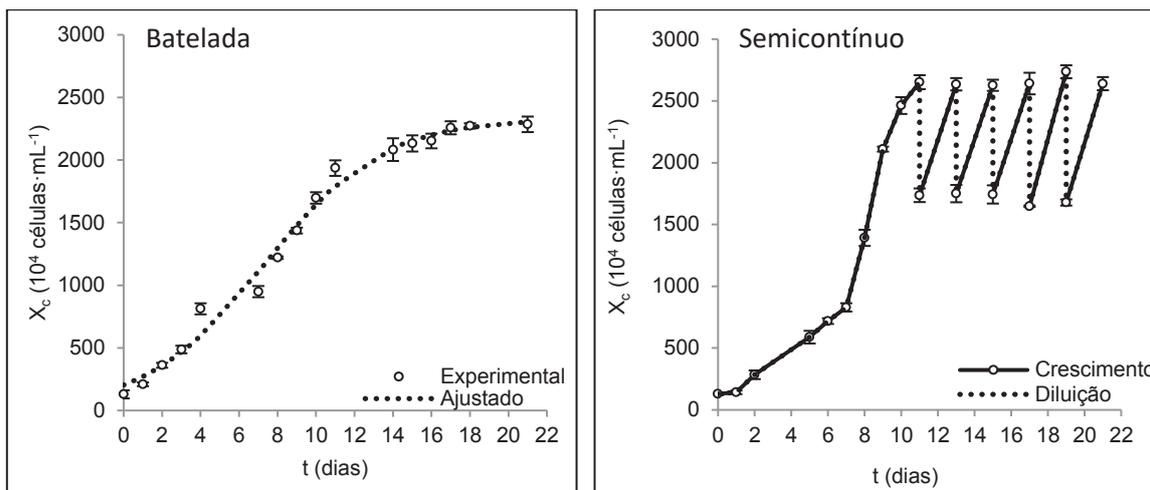


FIGURA 5.1 – NÚMERO DE CÉLULAS DOS CULTIVOS EM REGIME BATELADA E SEMICONTÍNUO REALIZADOS NA SALA DE CULTIVO
 FONTE: A autora (2016).

O número de células do cultivo batelada realizado na sala de cultivo estão muito próximos ao ajuste da equação logística, em que é possível perceber que não existe um período de adaptação. A inexistência do período de adaptação se deve ao fato da microalga utilizada estar adaptada às condições de cultivo em laboratório com meio de cultura sintético. O cultivo iniciou com $129 \pm 11 \cdot 10^4$ células mL $^{-1}$ e aumentou aproximadamente 12 vezes durante o período exponencial, alcançando $1630 \pm 45 \cdot 10^4$ células mL $^{-1}$. O crescimento exponencial permaneceu até o dia 10, com uma taxa de crescimento de $0,25$ dia $^{-1}$. A partir do dia 15, a taxa de crescimento diminuiu para $0,02$ dia $^{-1}$, resultado da baixa divisão celular, caracterizando a fase estacionária de crescimento. Analisando esses dois períodos é possível observar que durante a fase exponencial a população dobrou em 2,7 dias, por outro lado, no período estacionário a população de microalgas levaria 60 dias para duplicar de tamanho.

O cultivo semicontínuo cresceu em regime batelada até 11º dia. As diluições foram realizadas a cada 48 horas e o cultivo permaneceu nesse regime por 10 dias. A Tabela 5.1 apresenta as taxas de crescimento nos cultivos em regime batelada e semicontínuo

TABELA 5.1 – TAXAS DE CRESCIMENTO DOS CULTIVOS EM REGIME BATELADA E SEMICONTÍNUO REALIZADOS EM AMBIENTE INTERNO

| Período (dias) | Taxa de crescimento (dia ⁻¹) | |
|-------------------|--|--------------|
| | Batelada | Semicontínuo |
| 1-11* | 0,24 | 0,27 |
| 11-13 | 0,02 | 0,21 |
| 13-15 | 0,02 | 0,2 |
| 15-17 | 0,009 | 0,21 |
| 17-19 | 0,006 | 0,25 |
| 19-21 | 0,002 | 0,22 |

FONTE: A autora (2016).

NOTA: * período em que o cultivo semicontínuo cresceu em batelada

A fase exponencial do cultivo semicontínuo realizado na sala de cultivo teve duração de 11 dias, e apresentou um aumento da concentração celular cerca de 20 vezes, alcançando uma concentração celular de $2651 \pm 56 \cdot 10^4$ células mL⁻¹.

Os cultivos em batelada e semicontínuo cresceram em diferentes velocidades até o 11º, com taxas de 0,24 dia⁻¹ e 0,27 dia⁻¹, cultivos em batelada e semicontínuo, respectivamente. Entretanto, as taxas de crescimento no cultivo semicontínuo permaneceram relativamente altas e constantes, ao passo que as taxas de crescimento do cultivo em batelada apresentaram um grande decréscimo, devido às variações das condições de cultivos que são diferentes daquelas do início, como a escassez de nutrientes e ao aumento no número de células que provoca o autossombreamento. Essas variações não são observadas nos cultivos semicontínuos, uma vez que a renovação do meio de cultura ocorre periodicamente. A diminuição brusca da taxa de crescimento no cultivo batelada nos dias 11 e 13 indica que o cultivo havia entrado na fase estacionária de crescimento.

Assim como a concentração celular, a biomassa seca (X_b) foi quantificada em dias alternados até o término do cultivo. Os cultivos em batelada e semicontínuo iniciaram ambos com aproximadamente 31 mg L⁻¹ (FIGURA 5.2).

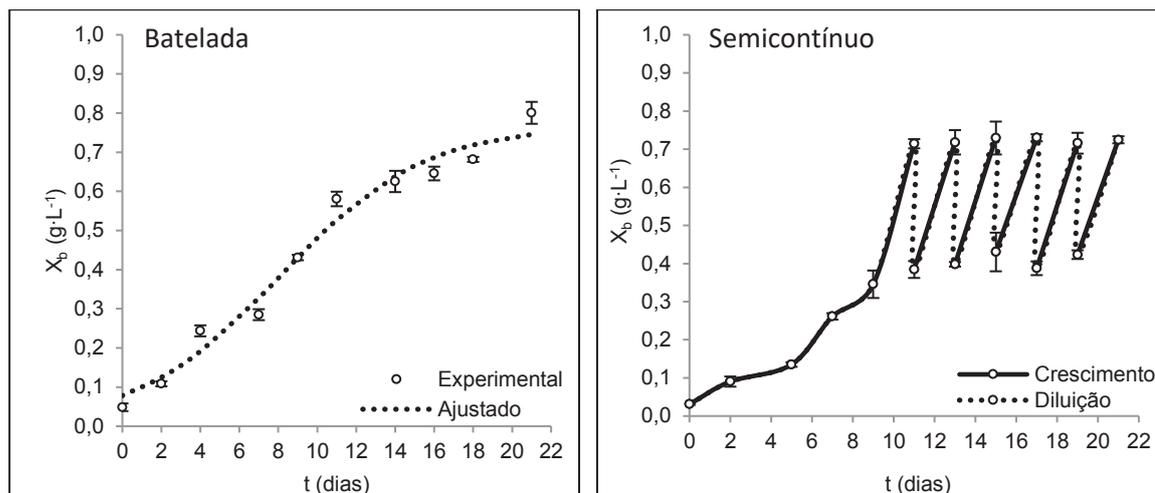


FIGURA 5.2 – BIOMASSA SECA DOS CULTIVOS EM REGIME BATELADA E SEMICONTÍNUO REALIZADOS NA SALA DE CULTIVO
FONTE: A autora (2016).

O valor máximo de biomassa alcançado no cultivo em batelada foi de $801 \pm 0,03 \text{ mg L}^{-1}$, um aumento de 25 vezes em relação ao primeiro dia de cultivo. Esse valor está em concordância com os dados apresentados por Corrêa (2015) que conseguiu um valor máximo de biomassa de 730 mg L^{-1} , cultivando uma espécie de microalga do gênero *Scenedesmus* por 14 dias em meio sintético CHU. A produtividade máxima do cultivo em batelada foi de $60 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, alcançada em 2 momentos durante o cultivo. O primeiro momento foi durante a fase exponencial, período em que as células estão se multiplicando a elevadas taxas. O segundo momento ocorreu durante a fase estacionária, período em que a concentração dos nutrientes é limitada, de modo que as células de microalgas se multiplicam pouco, mas passam a ganhar massa e a armazenar energia em forma de macromoléculas, como carboidratos ou lipídeos (URIARTE *et al.*, 1993) (TABELA 5.2).

A produtividade de biomassa no cultivo semicontínuo se manteve com poucas oscilações ao longo das diluições, ao passo que no cultivo em batelada, a produtividade de biomassa altera ao longo das diferentes fases de crescimento (TABELA 5.2). As renovações do meio de cultura criam um ambiente propício para as altas produtividades de biomassa, já que a adição de nutrientes favorece o crescimento celular, enquanto que a remoção de parte da cultura garante um cultivo com pequenas concentrações de metabólitos secundários e evita o autossombreamento.

TABELA 5.2 – PRODUTIVIDADES DE BIOMASSA DOS CULTIVOS EM REGIME BATELADA E SEMICONTÍNUO REALIZADOS NA SALA DE CULTIVO

| Período (dias) | Produtividade de biomassa (mg L ⁻¹ dia ⁻¹) | |
|-------------------|---|--------------|
| | Batelada | Semicontínuo |
| 1-11 | 60 ± 0,002 | 62 ± 0,001 |
| 11-13 | 10 ± 0,001 | 167 ± 0,03 |
| 13-15 | 10 ± 0,02 | 166 ± 0,02 |
| 15-17 | 20 ± 0,006 | 150 ± 0,03 |
| 17-19 | 60 ± 0,01 | 164 ± 0,02 |
| 19-21 | 60 ± 0,001 | 151 ± 0,01 |

FONTE: A autora (2016).

Os resultados encontrados nesse estudo indicam que a espécie estudada possui potencial para crescer em regime semicontínuo. A produtividade média de biomassa aumentou de 36 mg L⁻¹ dia⁻¹ no cultivo em batelada para 143 mg L⁻¹ dia⁻¹ no cultivo semicontínuo, um aumento de quatro vezes. Os cultivos sob regime semicontínuo não passaram por nenhum tratamento, como ajuste do pH ou adição de carbono inorgânico, contudo, a população de microalgas foi capaz de recuperar os valores de biomassa anteriores às diluições. Sabe-se que o regime semicontínuo proporciona grande ganho de biomassa em um curto espaço de tempo, entretanto, nem todas as espécies de microalgas toleram as variações decorrentes das diluições. A manipulação diária dos frascos pode causar contaminações por bactérias e outros micro-organismos, além disso, é muito difícil controlar perfeitamente os parâmetros, como intensidade da luz, temperatura e agitação do meio de cultura, acarretando produtividades menores do que a esperada.

O cultivo semicontínuo em condições padrões se mostrou de maneira inequívoca ser a melhor metodologia para a produção de biomassa evidenciada pelo aumento da produtividade e pela taxas de crescimento estáveis ao longo das diluições.

5.2 CULTIVOS EM FOTOBIOREACTORES AIRLIFT – BATELADA E SEMICONTÍNUO

Os cultivos batelada e semicontínuo em fotobiorreatores *airlift* iniciaram com concentração celular (X_c) de aproximadamente $121 \cdot 10^4$ células mL^{-1} (FIGURA 5.3), com duração de 23 dias. O cultivo semicontínuo cresceu em batelada até o dia 11, período em que o cultivo estava saindo da fase exponencial, a partir de então o cultivo passou para o regime semicontínuo ocorrendo diluições a cada 48 horas, com duração de 12 dias. A taxa de diluição foi de 25%, calculada em função da taxa de crescimento no período exponencial.

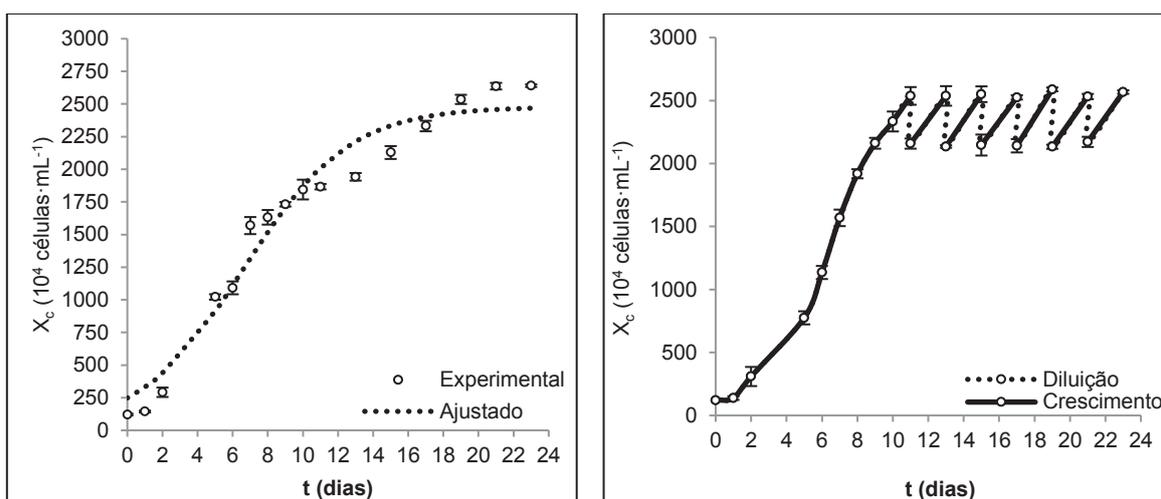


FIGURA 5.3 – NÚMERO DE CÉLULAS DOS CULTIVOS EM REGIME BATELADA E SEMICONTÍNUO REALIZADO EM AMBIENTE EXTERNO
FONTE: A autora (2016).

Um curto período de adaptação foi observado nos cultivos em fotobiorreatores *airlift*. A fase de adaptação é caracterizada por uma defasagem no crescimento celular. Durante esse período, as células estão se adaptando às novas condições de cultivo, podendo levar algumas poucas horas ou dias, dependendo das diferenças entre as características do cultivo pré-existente e o novo. Quanto maiores as diferenças (irradiância, temperatura, composição do meio de cultura, etc), maior será a fase de adaptação. A inoculação de um cultivo velho (cultivos entrando na fase de declínio) também pode acarretar um período de adaptação, pois nessa fase

a concentração de metabólitos intracelulares pode ser baixa inviabilizando a divisão celular imediata. Contudo, a fase de adaptação pode ser inexistente, quando as diferenças entre o cultivo pré-existente e o novo são discretas ou nulas, ou se as células recém inoculadas forem provenientes de um cultivo novo (LOURENÇO, 2006). Nesse estudo, a microalga *Acutodesmus obliquus* já estava adaptada ao meio de cultura sintético, entretanto, essa espécie estava aclimatada ao ambiente interno, com 24 horas de luminosidade, temperatura constante e fotobiorreator Erlenmeyer, de tal modo que, ao ser transferida para o ambiente externo com fotoperíodo e variação de temperatura ao longo do dia, o cultivo passou por um período de adaptação às novas condições.

A Tabela 5.3 apresenta as taxas de crescimento dos cultivos em batelada e semicontínuo realizados em fotobiorreatores *airlift*.

TABELA 5.3 – TAXA DE CRESCIMENTO (R) DOS CULTIVOS EM REGIME BATELADA E SEMICONTÍNUO EM FOTOBIORREACTORES *AIRLIFT*.

| Período (dias) | Taxa de crescimento (dia ⁻¹) | |
|-------------------|--|--------------|
| | Batelada | Semicontínuo |
| 1-11 | 0,27 | 0,29 |
| 11-13 | 0,02 | 0,29 |
| 13-15 | 0,01 | 0,31 |
| 15-17 | 0,01 | 0,25 |
| 17-19 | 0,06 | 0,31 |
| 19-21 | 0,01 | 0,35 |
| 21-23 | 0,04 | 0,24 |

FONTE: A autora (2016)

A fase exponencial dos cultivos em batelada permaneceu até o 8º dia. Nesse período a taxa de crescimento foi de 0,32 dia⁻¹. Ao final da fase exponencial o cultivo em batelada alcançou uma média de $1632 \pm 56 \cdot 10^4$ células mL⁻¹ correspondendo um aumento de 13 vezes. Já o cultivo semicontínuo teve uma fase exponencial de 11 dias, com uma taxa de crescimento de 0,27 dia⁻¹. A concentração celular (X_c) aumentou 21 vezes, atingindo $2537 \pm 70 \cdot 10^4$ células mL⁻¹.

O cultivo semicontínuo cresceu em batelada até o 11º dia. Nesse período, as taxas de crescimento observadas nos cultivos em batelada e semicontínuo foram de $0,27 \text{ dia}^{-1}$ e $0,29 \text{ dia}^{-1}$, respectivamente. Assim como foi observado no cultivo semicontínuo realizado na sala de cultivo, as taxas de crescimento se mantêm altas após iniciar as diluições, entretanto, uma pequena variação pode ser observada nas taxas de crescimento no cultivo semicontínuo em *airlift*. Essas variações são decorrentes das mudanças de luminosidade e temperatura experimentadas no ambiente externo. Segundo Lourenço (2006), parâmetros como temperatura, irradiância e composição do meio de cultura devem ser constantes no período que antecede as diluições e durante o período sob regime semicontínuo. Alterações nesses parâmetros podem interferir na recuperação populacional após as diluições. Não obstante, os cultivos em regime semicontínuo realizados em ambiente externo durante esse estudo cresceram a altas taxas, apesar das variações ambientais.

A falta de controle dos parâmetros naturais torna o regime semicontínuo pouco utilizado em ambientes externos, porém, esse estudo demonstrou a sua viabilidade utilizando a espécie *Acutodesmus obliquus*. Henrard, Morais e Costa (2011) também analisaram o comportamento da espécie *Acutodesmus obliquus* em ambiente externo, contudo, o intervalo entre as diluições não era fixo, além disso, o tempo mínimo entre uma diluição e a seguinte foi de quatro dias, configurando o que alguns autores definem como batelada alimentada, uma variação do cultivo semicontínuo.

Assim como a concentração celular, a biomassa seca foi quantificada em dias alternados até o término do cultivo. Os cultivos iniciaram com $31 \pm 0,002 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (FIGURA 5.4) de biomassa (X_b).

A produção de biomassa no cultivo em batelada durante o período exponencial aumentou aproximadamente 18 vezes, alcançando $549 \pm 0,02 \text{ mg L}^{-1}$, mas a maior produção de biomassa foi observada no último dia de cultivo, obtendo $878 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$. Já o cultivo semicontínuo produziu $774 \pm 0,004 \text{ g L}^{-1}$ ao final da fase exponencial, representando um aumento de 24 vezes em relação ao primeiro dia de cultivo. O cultivo semicontínuo foi capaz de recuperar o valor da biomassa em todas as diluições, porém, foi observada uma pequena queda na recuperação da biomassa após a terceira diluição (Figura 5.4). Em ambiente com condições

controladas, o cultivo geralmente recupera o valor da biomassa após 48 horas (desde que a taxa de diluição tenha sido corretamente calculada), entretanto, cultivos em ambiente externo experimentam grande variação de luminosidade ao longo dos dias, de modo que a taxa de crescimento varia conforme as condições mudam, como conseqüência é possível observar queda no número de células ou produção de biomassa ou mesmo um aumento.

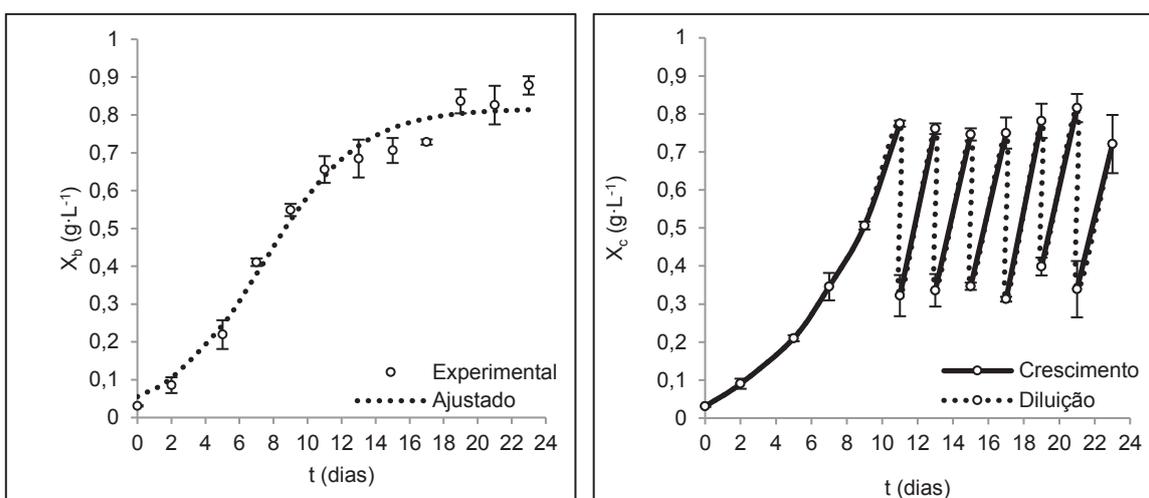


FIGURA 5.4 – BIOMASSA SECA DOS CULTIVOS EM REGIME BATELADA E SEMICONTÍNUO REALIZADOS EM AMBIENTE EXTERNO
FONTE: A autora (2016).

A produtividade nos cultivos batelada foram praticamente os mesmos na sala de cultivo e em *airlift*. Cultivos em batelada sob condições autotróficas não possuem altas produtividades quando comparadas a cultivos mixotróficos e heterotróficos (DEVI *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2014), ou quando comparadas com cultivos em regime semicontínuo (SOARES, 2010). Cultivos em regime semicontínuo têm potencial para obter maior produtividade de biomassa, uma vez que a colheita pode ser feita periodicamente por um longo período de tempo. A Tabela 5.4 mostra as diferentes produtividades encontradas nos cultivos em regime batelada e semicontínuo.

TABELA 5.4 – PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA DOS CULTIVOS EM REGIME BATELADA E SEMICONTÍNUO REALIZADOS EM AMBIENTE EXTERNO

| Período (dias) | Produtividade (mg L ⁻¹ dia ⁻¹) | |
|-------------------|---|--------------|
| | Batelada | Semicontínuo |
| 1-11 | 60 ± 0,002 | 67 ± 0,0008 |
| 11-13 | 10 ± 0,02 | 220 ± 0,03 |
| 13-15 | 10 ± 0,01 | 200 ± 0,03 |
| 15-17 | 10 ± 0,02 | 200 ± 0,02 |
| 17-19 | 53 ± 0,01 | 230 ± 0,02 |
| 19-21 | 23 ± 0,001 | 210 ± 0,02 |
| 21-23 | 26 ± 0,01 | 190 ± 0,01 |

FONTE: A autora (2016).

A produtividade média obtida nos cultivos em regime semicontínuo foi de $208 \pm 0,02 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, aproximadamente 7 vezes maior do que a produtividade média encontrada no cultivo em batelada ($27 \pm 0,01 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$). Os resultados encontrados nesse estudo estão próximos aos obtidos por Feng e colaboradores (2014) que cultivaram a espécie *A. obliquus* em regime semicontínuo por nove dias em ambiente externo e obtiveram uma produtividade mínima de $223 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ utilizando ar enriquecido com 5% de CO₂ e meio sintético BG11. Triansathit e colaboradores (2015) também cultivaram a espécie *A. obliquus* com meio BG11 em regime semicontínuo e obtiveram uma produtividade de $145 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. A única fonte de carbono utilizada nas culturas desse estudo foi proveniente do ar atmosférico local, com aproximadamente 0,04% de CO₂.

Assim como nos cultivos em batelada realizados na sala de cultivo, os cultivos em *airlift* apresentam uma oscilação na produtividade de biomassa. Sendo que a maior produtividade foi obtida durante a fase exponencial, fase em que o cultivo está aumentando o número de células em alta velocidade. Entre os dias 11 e 17, as culturas em batelada mantêm uma produtividade baixa, mas estável, compreendendo a fase linear de crescimento e o início da fase estacionária. Entre os dias 17 e 19 há um aumento na produtividade, seguido de uma diminuição entre os dias 19 e 23, provavelmente devido à variação climática experimentada nesses dias. A variação climática também pode ter influenciado o crescimento do cultivo semicontínuo, o qual apresentou uma produtividade entre 200 e 220 mg L⁻¹ dia⁻¹ até

o dia 17, com aumento de produtividade para $230 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ entre os dias 17 e 19 e diminuição para 210 e $190 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ entre os dias 19 e 23. Nesse estudo, as variações ambientais não comprometeram a produtividade de biomassa, ainda assim a produtividade dos últimos dias de cultivo foi a menor encontrada durante os 12 dias de regime semicontínuo. Como já foi mencionado, é muito difícil controlar alguns parâmetros, como a luminosidade, mesmo em ambiente interno, dificultando a implantação desse regime em ambiente externo.

A microalga *A. obliquus* mostrou ser tolerante ao estresse causado pelas diluições, além de resistir às variações ambientais. Essas características são pertinentes na escolha da espécie para produção de biomassa em escala industrial. Ademais, a produtividade de biomassa nos cultivos semicontínuo foi 7 vezes maior do que a obtida nos cultivos em batelada, mostrando ser factível a sua utilização em cultivos externos em larga escala.

5.3 CULTIVO EM SISTEMA INTEGRADO SEMICONTÍNUO E HETEROTRÓFICO

Um sistema integrando o cultivo semicontínuo em condições autotróficas com o cultivo sob condições heterotróficas foi utilizado como estratégia para aumentar a produtividade de biomassa de microalgas. Para tanto, o volume retirado durante as diluições dos cultivos sob regime semicontínuo foi transferido para a sala de cultivo e mantido sob condições heterotróficas. Para os cultivos heterotróficos foram utilizados diferentes concentrações de glucose e mantidos na ausência de luz por 10 dias.

Para os experimentos com utilização de carbono, foram utilizados dados de estudos prévios realizados pelo grupo, entretanto, ainda não havia sido estudada qual a melhor maneira de adição da glucose, por essa razão, foram mantidos três grupos, todos totalizando 70 g L^{-1} de glucose adicionada ao longo dos 10 dias de cultivo:

1. Adição de 70 g L^{-1} de glucose uma única vez no início do cultivo;
2. Adição de 14 g L^{-1} de glucose a cada 48 horas;

3. Adição de 7 g L⁻¹ de glucose a cada 24 horas.

A integração do cultivo semicontínuo sob condições autotróficas com o cultivo heterotrófico demonstrou ser o mais produtivo. A Tabela 5.5 apresenta as produtividades obtidas nas três estratégias de alimentação da glucose.

TABELA 5.5 – PRODUTIVIDADES NO SISTEMA INTEGRADO COM DIFERENTES FORMAS DE ADIÇÃO DE GLUCOSE

| EXPERIMENTO | GLICOSE (g L ⁻¹) | PRODUTIVIDADE (mg L ⁻¹ dia ⁻¹) |
|-------------|---------------------------------|--|
| 1 | 70 | 457 ± 0,03 |
| 2 | 14 | 1067 ± 0,07 |
| 3 | 7 | 1220 ± 0,08 |

FONTE: A autora (2016).

Após 10 dias na ausência de luz utilizando glucose como substrato orgânico, o cultivo com adição apenas no início apresentou a menor produtividade de biomassa, 457 ± 0,03 mg L⁻¹ dia⁻¹ (TABELA 5.5). Altas concentrações de glucose no início do cultivo podem favorecer o crescimento bacteriano, ocasionando competição interespecífica e resultando em menor produtividade de biomassa de microalga. Ainda assim, esse valor representa o dobro da produtividade média obtida do cultivo semicontínuo e um aumento de aproximadamente 17 vezes em relação à produtividade média obtida no cultivo batelada em *airlift*. Já a produtividade de biomassa encontrada no cultivo alimentado com glucose a cada 48 horas foi aproximadamente 30 vezes maior do que a produtividade média obtida nos cultivos batelada realizados em *airlift*.

Contudo, a maior produtividade de biomassa foi encontrada na integração do cultivo semicontínuo com o cultivo heterotrófico alimentado com glucose a cada 24 horas. Em relação à produtividade média do cultivo semicontínuo, esse aumento foi de 6 vezes, já em relação ao cultivo batelada em *airlift*, houve um aumento de aproximadamente 45 vezes.

A Figura 5.5 ilustra as diferentes produtividades (X_p) encontradas nos cultivos batelada, semicontínuo e no cultivo integrado.

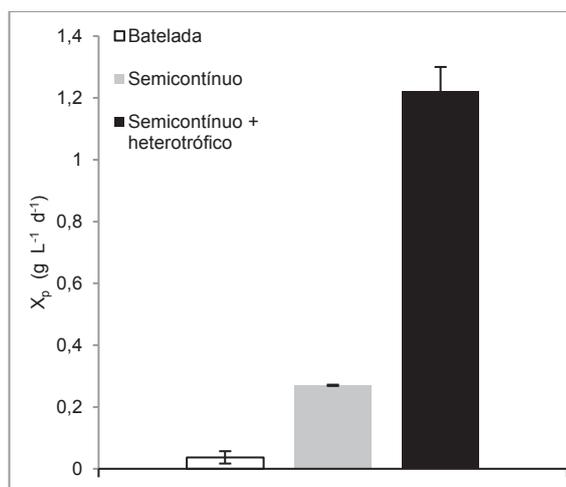


FIGURA 5.5 – PRODUTIVIDADES DOS CULTIVOS BATELADA, SEMICONTÍNUO E SISTEMA INTEGRADO

FONTE: A autora (2016).

A estratégia de integrar dois modelos de cultivos (cultivo semicontínuo sob condições autotróficas e cultivo batelada sob condições heterotróficas) resultou em um aumento significativo na produtividade de biomassa em relação aos modelos de cultivos individuais. A maior produtividade de biomassa observada no sistema integrado pode ser explicada pelo aumento da razão carbono/nitrogênio que é muito maior em cultivos heterotróficos, em função do aporte adicional de fonte de carbono orgânico. Sob condições heterotróficas, a produção de ATP é maior do que sob condições autotróficas ou mixotróficas, resultando em altas taxas de crescimento e maior produção de biomassa (YANG; HUA; SHIMIZU, 2000).

5.4 CULTIVO SEMICONTÍNUO UTILIZANDO MEIO RECICLADO

Para analisar a viabilidade do crescimento da microalga *A. obliquus* em meio reciclado foi realizado um cultivo em fotobiorreator *airlift* sob regime semicontínuo, em ambiente externo e meio sintético CHU. As diluições foram iniciadas após 9 dias de cultivo, quando a cultura estava saindo do crescimento exponencial, e foi mantida por 12 dias com taxa de diluição de 30%, em função da taxa de crescimento do

período exponencial (FIGURA 5.6). A utilização do meio clarificado foi realizada em três diluições intercaladas com diluições sem o reciclo do meio. Nas diluições com reciclo houve adição 50% de meio fresco, uma vez que o meio reciclado possui nutrientes ainda não consumidos pelas microalgas.

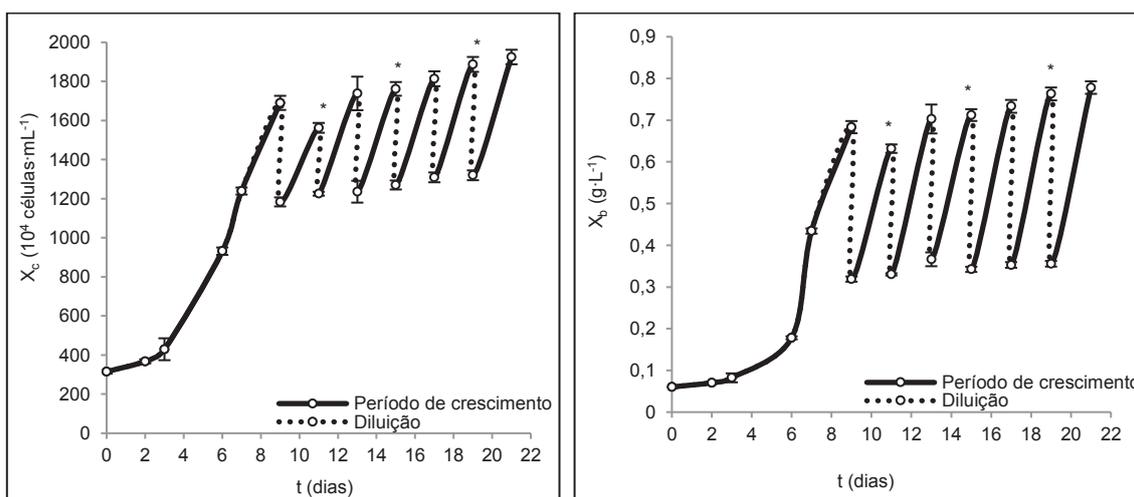


FIGURA 5.6 – CONCENTRAÇÃO CELULAR (ESQ.) E BIOMASSA (DIR.) DO CULTIVO SEMICONTÍNUO COM REUSO DO MEIO.

FONTE: A autora (2016).

* Diluição realizada com a reutilização do clarificado do volume de cultivo floculado com quitosana.

O número de células apresentou um aumento de aproximadamente 5 vezes em relação ao primeiro dia de cultivo, alcançando $1690 \pm 36 \cdot 10^4$ células mL^{-1} , ao fim do período exponencial. Em relação à biomassa, o incremento no mesmo período foi de aproximadamente 11 vezes. O cultivo foi capaz de se recuperar após todas as diluições, no entanto, é possível observar uma pequena variação no número de células e biomassa, devido ao reuso do clarificado. Ao flocular um cultivo, a eficiência de remoção pode ser superior a 90%, no entanto, não atinge 100%, consequentemente algumas células continuam em suspensão no sobrenadante clarificado. Por essa razão, ao reutilizar esse sobrenadante, é possível observar um aumento no número de células não explicado somente pelo crescimento do cultivo.

Assim como no cultivo semicontínuo sem o reuso de meio, as taxas de crescimento permaneceram constantes durante todo período, com exceção da primeira diluição (período 9 – 11) na qual se observa uma taxa de $0,15 \text{ dia}^{-1}$. Essa diferença pode ser explicada pela variação na luminosidade nesse período, uma vez

que o cultivo foi realizado em ambiente externo. A Tabela 5.6 apresenta as produtividades encontradas no cultivo em regime semicontínuo com utilização do meio reciclado.

TABELA 5.6 – TAXA DE CRESCIMENTO E PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA EM CULTIVO SOB REGIME SEMICONTÍNUO COM REUSO DO SOBRENADANTE CLARIFICADO

| Período (dias) | Taxa de crescimento (dia⁻¹) | Produtividade de biomassa (g·L⁻¹·dia⁻¹) |
|-----------------------|---|--|
| 1–9* | 0,19 | 0,07 ± 0,002 |
| 9–11 | 0,13 | 0,15 ± 0,002 |
| 11–13** | 0,17 | 0,18 ± 0,002 |
| 13–15 | 0,17 | 0,17 ± 0,004 |
| 15–17** | 0,17 | 0,19 ± 0,004 |
| 19–21 | 0,18 | 0,20 ± 0,003 |
| 21–23** | 0,18 | 0,21 ± 0,003 |

FONTE: A autora (2016).

NOTA: *Período de crescimento em batelada. **Diluição realizada com reuso do clarificado.

Farroq e colaboradores (2015) analisaram o efeito do clarificado da floculação com cloreto de ferro em cultivos de *Chlorella vulgaris* e obtiveram maior produtividade de lipídeos e biomassa, contudo, foi necessário adicionar uma etapa de lavagem da biomassa recuperada devido ao excesso de ferro. O trabalho de Wu e colaboradores (2015) teve como objetivo avaliar a influência do reuso do clarificado de quatro floculantes na produção de biomassa e lipídeos em cultivos com *Scenedesmus* sp e *A. obliquus*. Os autores não observaram nenhum efeito negativo na produção de biomassa e lipídeos, no entanto, foi necessário o ajuste do pH do clarificado antes do reuso.

Uma preocupação na reutilização do clarificado é o acúmulo do agente floculante que pode ser danoso para o crescimento das microalgas, contudo, esse efeito não foi observado nesse estudo. No presente método de floculação realizado com quitosana, um floculante natural, não havia contaminação do meio, o qual após a floculação pode ser reciclado sem a necessidade de tratamento prévio.

Existem na literatura dados de cultivos em meio reciclado, no entanto, não foi encontrado nenhum trabalho que o tenha realizado em regime semicontínuo. Além da inovação da reutilização em cultivo semicontínuo, os resultados são potencialmente aplicáveis em maiores escalas de produção, uma vez que a metodologia empregada dispensa tratamentos prévios no reuso do clarificado, o que reduz significativamente os custos do processo.

5.5 TEOR DE LIPÍDEOS TOTAIS

A metodologia proposta por Bligh and Dyer (1959) permite a extração de todo material apolar presente nas células de microalgas, isso significa que compostos que não conversíveis em biodiesel, como pigmentos e lipídeos da membrana celular, também serão quantificados. Contudo, essa metodologia permite avaliar, em linhas gerais, o potencial da microalga como matéria prima para a produção de biodiesel. A tabela 5.7 apresenta os teores de lipídeos totais das amostras dos diferentes cultivos.

TABELA 5.7 – TEOR DE LIPÍDEOS TOTAIS DE DIFERENTES CULTIVOS

| CULTIVOS | TEOR DE LIPÍDEOS (%) |
|---------------------------------------|-----------------------------|
| Cultivo batelada - <i>airlift</i> | 27 ± 3,5 |
| Cultivo semicontínuo - <i>airlift</i> | 20 ± 0,4 |
| Cultivo integrado 1 | 7,8 ± 1,5 |
| Cultivo integrado 2 | 7,7 ± 0,7 |
| Cultivo integrado 3 | 9,4 ± 0,6 |
| Cultivo reuso | 20 ± 2 |

FONTE: A autora (2016).

A literatura destaca que cultivos heterotróficos, via de regra, apresentam maiores teores de lipídeos totais, porém, isso não foi observado nos cultivos integrados, nos quais uma etapa heterotrófica foi empregada utilizando as diluições do cultivo semicontínuo. Um fator que pode ter contribuído para o baixo teor lipídico é a razão carbono/nitrogênio (C/N). Segundo Sattur e Karanth (1989) em altas

razões C/N o teor lipídico diminui com o aumento da concentração do substrato orgânico. A Figura 5.7 apresenta as produtividades dos diferentes cultivos.

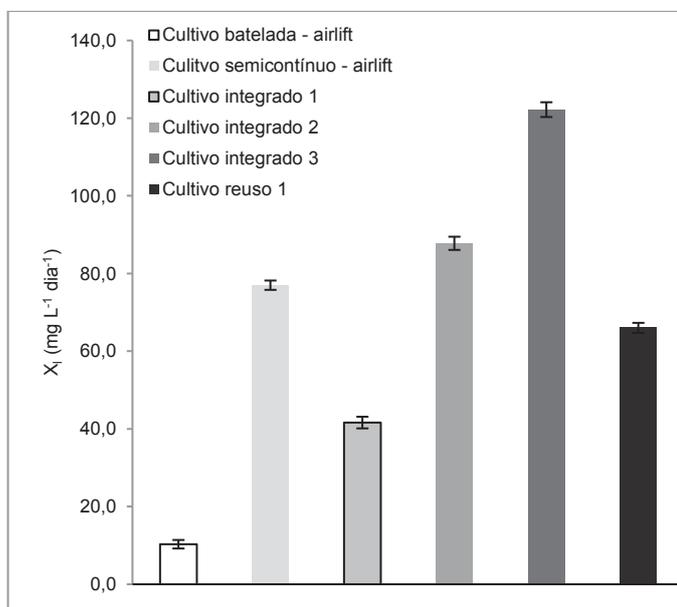


FIGURA 5.7 – PRODUTIVIDADE DE LIPÍDEOS DE DIFERENTES CULTIVOS
FONTE: A autora (2016).

A produtividade do cultivo semicontínuo foi aproximadamente 7 vezes superior à produtividade do cultivo batelada, evidenciando o potencial desse regime de cultivo para produção de lipídeos. Além disso, o reuso do clarificado em regime semicontínuo não influenciou de maneira negativa a produtividade de lipídeos totais.

O maior teor lipídico foi encontrado no cultivo em batelada, entretanto, quando observadas as produtividades, fica evidente a superioridade do sistema integrado, no qual a estratégia de adição diária de carbono orgânico se mostrou mais produtiva. A avaliação dos sistemas de produção de microalgas é feita a partir de dados de produtividade, uma vez que são obtidos dados de produção por período de tempo. Portanto, ainda que o teor de lipídeos totais dos cultivos integrados tenham sido baixos, as produtividades encontradas nesses sistemas são superiores às obtidas no cultivo batelada sob condições autotróficas.

6 CONCLUSÃO

O objetivo principal do presente estudo consistiu em aumentar a produtividade de biomassa de microalgas por meio da adequação de modelos de cultivos. Desse modo, é possível concluir que os cultivos realizados em regime semicontínuo apresentaram maior produtividade em relação ao regime batelada, em escala laboratorial com aumento de 4 vezes.

Na etapa seguinte, escalonamento dos cultivos em ambiente externo, novamente o regime semicontínuo apresentou a mesma tendência de maior produtividade quando comparado ao cultivo batelada, com aumento de aproximadamente 7 vezes. Esse resultado se destaca por ter sido realizado em ambiente externo, sem nenhum controle das condições ambientais, ainda assim a produtividade de biomassa foi superior à encontrada nos cultivos bateladas. Tendo em vista o aumento da produtividade de biomassa, a manutenção dos cultivos sob regime semicontínuo pode ser uma alternativa atraente e simples, do ponto de vista operacional.

A integração dos cultivos em regime semicontínuo com o cultivo heterotrófico proporcionou maior aumento na produtividade de biomassa de microalgas, com aumento de 6 vezes em relação à produtividade encontrada no regime semicontínuo e de 45 vezes em relação ao cultivo em batelada, ambos em fotobiorreator *airlift*. Esses resultados indicam que a integração do cultivo semicontínuo e heterotrófico garante maior produção de biomassa em menor intervalo de tempo.

A maior produtividade de lipídeos foi obtida no cultivo integrado, sendo 12 vezes superior à produtividade encontrada no cultivo batelada e 7 vezes superior à do cultivo semicontínuo, mostrando novamente, que o cultivo integrado garante maior produção em menor intervalo de tempo.

O floculante quitosana não causou nenhum efeito inibitório no crescimento das microalgas sob regime semicontínuo. A produtividade de biomassa ($193 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) e de lipídeos ($66 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) durante as diluições com reuso

mostra que é possível diminuir os impactos ambientais e econômicos sem afetar a qualidade da biomassa de microalgas.

Resumidamente, a estratégia de integrar os cultivos mostra de forma clara que é mais vantajosa quanto à produção de biomassa e lipídeos. Além disso, o reuso do clarificado permitiu menor gasto com água, diminuindo os impactos econômicos e ambientais do processo.

7 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Assumindo que este trabalho não encerra todas as questões pertinentes ao cultivo da microalga *Acutodesmus obliquus*, é possível apontar oportunidades a serem exploradas em trabalhos futuros:

- Determinar os teores de carboidratos e proteínas da espécie *A. obliquus* com o objetivo de melhor compreender a produção de macromoléculas, bem como avaliar o potencial da espécie quanto à produtividade desses compostos;
- Determinar a melhor concentração de glucose em cultivos heterotróficos que proporcione altos teores de lipídeos;
- Avaliar outros substratos orgânicos para produção de biomassa em cultivos heterotróficos e/ou mixotróficos, dando preferência à utilização de resíduos agroindustriais, como a vinhaça;
- Analisar o perfil cromatográfico do material graxo obtido para elucidação do real potencial na geração de biodiesel a partir da microalga *A. obliquus*;
- Realizar o escalonamento dos cultivos em regime semicontínuo nos fotobiorreatores com volume operacional de 10 m³ desenvolvidos pelo NPDEAS, a fim de melhor entender a dinâmica de crescimento das microalgas frente a esse regime em grandes volumes;
- Avaliar o reuso da água restante da floculação em cultivos semicontínuos realizados nos fotobiorreatores do NPDEAS.
- Desenvolver sensores de concentração celular para automatizar as diluições dos cultivos semicontínuos.

REFERÊNCIAS

- AIROLDI, C. A relevante potencialidade de centros básicos nitrogenados disponíveis em polímeros inorgânicos e biopolímeros na remoção catiônica. **Química Nova**, v. 31, p. 144 – 153, 2008.
- ANAND, J; ARUMUGAN, M. Enhanced lipid accumulation and biomass yield of *Scenedesmus quadricauda* under nitrogen starved condition. **Bioresource Technology**, v. 188, p. 190 – 195, 2015.
- ASGHARPOUR, M.; RODGERS, B.; HESTEKIN, J. A. Eicosapentaenoic acid from *Porphyridium Cruentum*: Increasing growth and productivity of microalgae for pharmaceutical products. **Energies**, v. 8, p. 10487 – 10503, 2015.
- AYED, H. B. A.; TAIDI, B.; AYADI, H.; PAREAU D.; STAMBOULI, M. Effect of magnesium ion concentration in autotrophic cultures of *Chlorella vulgaris*, **Algal Research**, v. 9, p. 291 – 196, 2015.
- BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotchnology Advances**, v. 25, p 207 – 210, 2007.
- BICUDO, C. E. M; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil**. São Carlos: RiMa, 2005.
- BOROWITZKA, M. A. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. **Journal of Applied Phycology**, v. 7, p. 3 – 15, 1995.
- BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 313 – 321, 1999.
- BOSMA, R. *et al.* Ultrasound, a new separation technique to harvest microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 15 p. 143 – 153, 2003.
- BRENNAN, L. OWENDE, P. Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 557 – 577, 2010.

BURKHOLDER, J. M.; GLIBERT, P. M.; SKELTON, H. M. Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters. **Harmful Algae**, v. 8, p. 77 – 93, 2008.

CAMACHO, F. G.; GÓMEZ, A. C.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; SEVILLA, J. F.; GRIMA, E. M. Use of concentric-tube *airlift* photobioreactors for microalgal outdoor mass cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 164 – 172, 1999.

CHEN, F.; JOHNS, M. R. Heterotrophic growth of *Chlamydomonas reinhardtii* on acetate in chemostat culture. **Process Biochemistry**, v. 31, p. 602 – 604, 1996.

CHEN, G.; CHEN, F. Growing phototrophic cells without light. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 607 – 616, 2006.

CHEN, L.; WANG, C.; WANG, W.; WEI, J. Optimal conditions of different flocculation methods for harvesting *Scenedesmus* sp. cultivated in an open-pond system. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 9 – 15, 2013.

CHEN, P. *et al.* Review of the biological and engineering aspects of algae to fuels approach. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 2, n.1, p. 1 – 30, 2009.

CHENG, Y.; LU, Y.; GAO, C.; WU, Q. Alga-based biodiesel production and optimization using sugar cane as the feedstock. **Energy and Fuels**, v. 23, p. 4166 – 4173, 2009.

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

CHOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. **Biotechnology**, v. 3, p. 21 – 34, 2004.

CHU, S. P. The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae. **Journal of Ecology**, v. 30, p. 284 – 325, 1942.

CORRÊA, D. O. **Desenvolvimento e caracterização do cultivo de microalgas em fotobiorreator alimentado por emissões gasosas de motores**. 101 f, Dissertação

(Mestrado em Engenharia e Ciências de Materiais) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

COUTTEAU, P. Micro-algae. In: LAVENS, P.; SORGELOOS, P. **Manual on the production and use of live food for aquaculture**. FAO Fisheries Technical Paper, n. 361. Rome, FAO. 1996. 295p.

CUARESMA, M.; CASAL, C.; JORJÁN, E.; VÍLCHEZ, C. Productivity and selective accumulation of carotenoids of the novel extremophile microalga *Chlamydomonas acidophila* grown with different carbon sources in batch systems. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 38, p. 167 – 177, 2011.

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 776-792, abr. 2009.

DAS, P.; AZIZ, S. S.; OBBARD, J. P. Two phase microalgae growth in the open system for enhanced lipid productivity. **Renewable Energy**, v. 36, p. 2524 – 2528, 2011.

DELRUE, F.; IMBERT, Y.; FLEURY, G.; PELTIER, G.; SASSI, J. Using coagulation-flocculation to harvesting *Chlamydomonas reinhardtii*: Coagulant and flocculant efficiencies, and reuse of the liquid phase as growth medium. **Algal Research**, v. 9, p. 283 – 290, 2015.

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

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.

DI CAPRIO, F.; ALTMARI, P.; PAGNANELLI, F. Integrated biomass production and biodegradation of olive mill wastewater by cultivation of *Scenedesmus* sp. **Algal Research**, v. 9, p. 306 – 311, 2015.

DIAZ, G. D. Caspase-8 and apoptosis inducing mediate a cytochrome c-independent pathway of apoptosis in human colon cancer cells induced by the dietary phytochemical chlorophyllin. **Cancer Research**, v. 63, p. 1254 – 1261, 2003

DIVAKARAN, R.; PILLAI, V. N. S. Flocculation of algae using chitosan. **Journal of Applied Phycology**, v. 14, p. 419 – 422, 2002.

DONG, C; CHEN, W; LIU, C. Flocculation of algal cells by amphoteric chitosan-based flocculant. **Bioresource Technology**, v. 170, p. 239 – 247, 2014.

EMDADI, D.; BERLAND, B. Variation in lipid class composition during batch growth of *Nannochloropsis salina* and *Pavlova lutheri*. **Marine Chemistry**, v. 26, p. 215 – 225, 1989.

ESPINOSA-GONZALEZ, I.; PARASHAR, A.; BRESSLER, D. C. Heterotrophic growth and lipid accumulation of *Chlorella protothecoides* in whey permeate, a dairy by-product stream, for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 155, p. 170 – 176, 2014.

FARID, M. S.; SHARIATI, A.; BADA KHSHAN, A.; ANVARIPOUR, B. Using nano-chitosan for harvesting microalga *Nannochloropsis* sp. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 555 – 559, 2013.

FARROQ, W. *et al.* Effect of harvesting methods on the reusability of water for cultivation of *Chlorella vulgaris*, its lipid productivity and biodiesel quality. **Algal Research**, v. 8, p. 1 – 7, 2015.

FENG, P. *et al.* Growth and lipid accumulation characteristics of *Scenedesmus obliquus* in semi-continuous cultivation outdoors for biodiesel feedstock production. **Bioresource Technology**, v. 173, p. 406 – 414, 2014.

GAO, C. ZHAI, Y; DING. Y.; WU, Q. Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga *Chlorella protothecoides*. **Applies Energy**, v.87 p, 756 – 761, 2010.

GERARDO, M. L.; HENDE, S. V. D.; VERVAEREN, H.; COWARD T.; SKILL, S. C. Harvesting of microalgae within a biorefinery approach: A review of the developments and case studies from pilot-plants. **Algal Research**, v. 11, p. 248 – 262, 2015.

GIM, G. H. *et al.* Comparison of biomass production and total lipid content of freshwater green microalgae cultivated under various culture conditions. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, p. 99 – 106, 2014.

GRIFTTHIS, M.; HILLE, R. P.; HARRISON, S. T. L. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species growth under nitrogen replete and limited conditions. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, p. 989 – 1001, 2012.

GRIMA, E. M.; BELARBI, E. H.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; MEDINA, A. R.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 491 – 515, 2003.

GROBBELAAR, J. U. Mass Production of Microalgae: Photobioreactors. In: RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Blackwell Science, 2004. p. 97-115.

GONZÁLEZ-GARCINUÑO, A. TABERNERO, A. SÁNCHEZ-ÁLVAREZ, J. M.; VALLE, E. M.M.; GALÁN, M. A. Effect of nitrogen source on growth and lipid accumulation in *Scenedesmus abundans* and *Chlorella ellipsoidea*. **Bioresource Technology**, v. 173, p. 334 – 341, 2014.

HAN, F. *et al.* Enhanced lipid productivity of *Chlorella pyrenoidosa* through the culture strategy of semi-continuous cultivation with nitrogen limitation and pH control by CO₂. **Bioresource Technology**, v. 136, p. 418 – 424, 2013.

HANSEL, P. A.; RIEFLER, R. G.; STUART, B. J. Efficient flocculation of microalgae for biomass production using cationic starch. **Algal Research**, v. 5, p. 133 – 139, 2014.

HEASMAN, M.; DIEMAR, J.; O'CONNOR, W.; SUSHAMES, T.; FOULKES, L. Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs – a summary. **Aquaculture Research**, v. 31, p. 637 – 659, 2000.

HENRARD, A. A.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Vertical tubular photobioreactor for semicontinuous culture of *Cyanobium* sp. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4897 – 4900, 2011.

HENRICH, J. M.; IRAZOQUI, H. A. Kinetic model of photoautotrophic growth of *Chlorella* sp. Microalga, isolated from the Setúbal Lagoon. **Photochemistry and Photobiology**, v. 91, p. 1095 – 1102, 2015;

HO, S.; CHEN, C.; CHANG, J. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/ carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. **Bioresource Technology**, v. 113, p. 244 – 252, 2012.

HO, S.; KONDO, A.; HASUNUMA, T.; CHENG, J. Engineering strategies for improving the CO₂ fixation and carbohydrate productivity of *Scenedesmus obliquus* CNW-N used for bioethanol fermentation. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 163 – 171, 2013.

HO, S.; YE, X.; HASUNUMA, A.; CHANG, J.; KONDO, A. Perspectives on engineering strategies for improving biofuel production from microalgae — A critical review. **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 1448 – 1459, 2014

HSIEH, C.; WU, W. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3921 – 3926, 2009.

HU, Q.; SOMMERFELD, M. JARVIS, E. GHIRARDI, M. POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS. A. Microalgae triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal**. v. 54, p. 621 – 639. 2008.

HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X.; CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v. 87, p. 38 – 46, 2010.

JENSEN, G. S.; GINSBERG, D. I.; DRAPEAU, C. Blue-green alga as an immune-enhancer and biomodulator. **Journal of the American Nutraceutical Association**, v 3, n 4, 2001.

JI, M. *et al.* Mixotrophic cultivation of a microalga *Scenedesmus obliquus* in municipal wastewater supplemented with food wastewater and flue gas CO₂ for biomass production. **Journal of Environmental Management**, v. 159, p. 115 – 120, 2015.

JIANG, L. *et al.* Effect of diethyl aminoethyl hexanoate on the accumulation of high-value biocompounds produced by two novel isolated microalgae. **Bioresource Technology**, v. 197, p. 178 – 184, 2015.

JUDÉ, S. *et al.* Dietary long-chain omega-3 fatty acids of marine origin: A comparison of their protective effects on coronary heart disease and breast cancers. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 90, p 299 – 325, 2006.

KATO, T.; KOLENIC, N.; PARDINI, R. S. Docosahexaenoic acid (DHA), a primary tumor suppressive omega-3 fatty acid, inhibits growth of colorectal cancer

independent of p53 mutational status. **Nutrition and Cancer**, v. 58, p. 178 – 187, 2007.

KOLLER, M.; MUHR, A.; BRAUNEGG, G. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. **Algal Research**, v. 6, p. 52 – 63, 2014.

LAM, G. P. *et al.* Cationic polymers for successful flocculation of marine microalgae. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 804 – 807, 2014.

LEE, A. K.; LEWIS, D. M.; ASHMAN, P. J. Microbial flocculation, a potentially low cost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel, **Journal Applied Phycology**, v. 21, p. 559 – 567, 2009.

LE MOS, J. S. **Desenvolvimento de sistema de tratamento e reciclagem de meio de cultivo de microalgas para produção de biodiesel**. 85 f, Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Materiais) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

LI, X.; XU, H.; WU, Q. Large-scale biodiesel production from microalgae *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 98, p. 764 – 771, 2007.

LI, Y. *et al.* Comparison of autotrophic and mixotrophic cultivation of green microalgal for biodiesel production. **Energy Procedia**, v. 52, p. 371 – 376, 2014.

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

LIU, J. *et al.* Production potential of *Chlorella zofingienensis* as a feedstock for biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8658 – 8663, 2010.

LOREY, J.; YILDIZ, I. Investigation of heterotrophic cultivation potential of *Chlorella vulgaris* and *Tetraselmis chuii* in controlled environment wastewater growth media from dairy, poultry and aquaculture industries. **Acta Horticulturae**, v. 1037, p. 1109 – 1114, 2014.

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

MARTINEZ, M. E. *et al.* Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource Technology**, v. 73, p. 263 – 272, 2000.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 14, p. 217 - 232, 2009.

MATOS, A. P. *et al.* Biomass, lipid productivities and fatty acids composition of marine *Nannochloropsis gaditana* cultured in desalination concentrate. **Bioresource Technology**, v. 197, p. 48 – 55, 2015.

MATTOS, E. R. *et al.* Enhancement of biomass production in *Scenedesmus bijuga* high-density culture using weakly absorbed green light. **Biomassa and Bioenergy**, v. 81, p. 473 – 478, 2015.

MENDES, R. L. *et al.* Supercritical CO₂ extraction of linolenic acid (GLA) from the cyanobacterium *Arthrospira (Spirulina) maxima*: experiments and modeling. **Engineering Journal**, v. 105, p. 147 – 152, 2005.

MIYAWAKI, B. **Purificação de biogás através de cultivo de microalga em resíduos agroindustriais**. 137 f, Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Materiais) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

MOLINA-CÁRDENAS, C. A.; SÁNCHEZ-SAAVEDRA, M. P; LIZÁRRAGA-PARTIDA. Inhibition of pathogenic *Vibrio* by the microalgae *Isochrysis galbana*. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, p. 2347 – 2355, 2014.

MORALES-AMARAL, M. M. *et al.* Outdoor production of *Scenedesmus* sp. in thin-layer and raceway reactors using centrate from anaerobic digestion as the sole nutrient source. **Algal Research**, v. 12, p. 99 – 108, 2015.

MORTENSEN, A.; GEPPEL, A. HPLC-MS analysis of the green food colorant sodium copper chlorophyllin. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, p. 19 – 25, 2007.

MURTHY, K. N. C. *et al.* In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina* – a green alga. **Life Sciences**, v. 76, p 1381 – 1390, 2005.

MUZZARELLI, R.; TARSI, R.; FILIPPINI, O.; GIOVANETTI, E.; BIAGINI, G.; VARALDO, P. E. Antimicrobial properties of N-carboxybutyl chitosan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, p. 2019 – 2023, 1990.

NUÑES, V. J. *et al.* Nitrogen budget in *Scenedesmus obliquus* cultures with artificial wastewater. **Bioresource Technology**, v. 78, p. 161 – 164, 2001.

OGBONNA, J.C.; TANAKA, H. Light requirement and photosynthetic cell cultivation – Development of process for efficient light utilization in photobioreactors. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, p. 207 – 218, 2000.

OLIVEIRA, A. C. **Produção de biomassa de microalgas *Scenedesmus sp.* em efluente de bovinocultura biodigerido**. 82 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Materiais) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013a.

OLIVEIRA, A. C. D. **Síntese enzimática do biodiesel de microalgas a partir de lípases produzidas por fungos endofíticos**. 106 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Materiais) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013b.

PATNAIK, R.; MALLICK, N. Utilization of *Scenedesmus obliquus* biomass of feedstock for biodiesel and other industrially important co-products: An integrated paradigm for microalgal biorefinery. **Algal Research**, v. 12, p. 328 – 336, 2015.

PEET, M. *et al.* Two double-blind placebo-controlled pilot studies of eicosapentanoic acid in the treatment of schizophrenia. **Schizophrenia research**, v 49, p. 243 – 252, 2001.

PEREIRA, A. B. **Produção de biomassa e de lipídeos por cultivo misto de microalgas suplementado com CO₂**. 109 f, Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

PEREZ-GARCIA, O. *et al.* Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, p. 11 – 36, 2011.

PIRES, J. C. M. *et al.* Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: engineering aspects and biorefinery concept. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 3043-3053, 2012.

PRAVEENKUMAR, R. *et al.* Influence of nutrient deprivations on lipid accumulation in a dominant indigenous microalga *Chlorella* sp., BUM11008: Evaluation for biodiesel production. **Biomass and Bioenergy**, v. 37, p. 60 – 66, 2012.

PRYBIL, P.; CEPÁK, V.; ZACHLEDER, V. Production of lipids in 10 strains of *Chlorella* and *Parachlorella*, and enhanced lipid productivity in *Chlorella vulgaris*. **Bioenergy and Biofuel**, 94, p. 549 – 561, 2012.

PYLE, D. J.; GARCIA, R. A.; WEN, Z. Producing docosahexaenoic acid (DHA)-rich algae from biodiesel-derived crude glycerol: Effects of impurities on DHA production and algal biomass composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 2008, p. 3933 – 3939, 2008.

QUEIROZ, M. I. *et al.* Fish processing wastewater as a platform of the microalgal biorefineries. **Biosystems Engineering**, v. 115, p. 195 -202, 2013

RATTANAPOLTEE, P.; KAEWKANNETRA, P. Cultivation of microalga, *Chlorella vulgaris* under different auto-hetero-mixotrophic growths as a raw material during biodiesel production and cost evaluation. **Energy**, v. 78, p. 4 – 8, 2014.

RAVEN, J. A. Sensing pH. *Plant, Cell & Environment*, v. 13, p. 721-729, 1990

REIREZ, M. J. F. *et al.* Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. **Aquaculture**, v. 83, p. 17-37, 1989.

REN, H.; LIU, B.; MA, C.; ZHAO, L.; REN, N. A new lipid-rich microalga *Scenedesmus* sp. strain R-16 isolated using Nile red staining: effects of carbon and nitrogen sources and initial pH on the biomass and lipid production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, 2013.

RENAUD, S. M. *et al.* Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis* sp., *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea*, and commercial species *Isochrysis* sp. (Clone T. ISO). **Journal of Applied Phycology**, v. 7, p. 595-602, 2004.

REVIERS, B. de. **Biologia e filogenia das algas**. Porto Alegre: Artmed, 2006.

RIAÑO, B.; MOLINUEVO, B.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M. C. Optimization of chitosan flocculation for microalgal-bacterial biomass harvesting via response surface methodology. **Ecological Engineering**, v. 38, p. 110 – 113, 2012.

RICHMOND, A. Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: an overview. In: Asian Pacific Phycology in the 21st Century: **Prospects and Challenges**. Springer Netherlands, p. 33-37, 2004.

RODOLFI, L. *et al.* Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, p. 100-112, 2008.

ROSA, G. M. *et al.* Chemical absorption and CO₂ biofixation via the cultivation of *Spirulina* in semicontinuous mode with nutrient recycle, **Bioresource Technology**, v. 192, p. 321 – 327, 2015.

SALAMA, E. *et al.* Enhancement of microalgae growth and fatty acid content under the influence of phytohormones. **Bioresource Technology**, v. 172, p. 97 – 103, 2014.

SANTOS *et al.* Dual-mode cultivation of *Chlorella protothecoides* applying inter-reactors gas transfer improves microalgae biodiesel production. **Journal of Biotechnology**, v. 184, p. 74 – 83, 2014.

SATTUR, A. P.; KARANTH, N. G. Production of microbial lipids: II. Influence of C/N ratio – model prediction. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 34, p. 868 – 872, 1989.

SCHMIDT, C. J. B. Aislamiento, purificación, y mantenimiento de cepas de microalgas. In: VEGA, B. O. A. VOLTOLINA, D. **Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal**. 1. ed. La Paz: Centro de Investigaciones biológicas Del Noroeste (CIBNOR), 2007. p 1-16.

SHEKH, A. Y.; SHRIVASTAVA, P.; GUPTA, A.; KANNAN, K.; DEVI, S.; MUDLIAR S. Biomass and lipid enhancement in *Chlorella* sp. with emphasis on biodiesel quality assessment through detailed FAME signature. **Bioresource technology**, v. 201, p 276 – 286, 2016.

SILVA, D. A. Produção de biomassa de microalgas cultivadas em esgoto sanitário biodigerido visando a produção de biodiesel. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Materiais) – Setor de tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

SINGH, M; REYNOLDS, D. L.; DAS, K. C. Microalgal system for treatment of effluent from poultry litter anaerobium digestion. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10841 – 10848, 2011.

SOARES, D. **Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivos**. 107 f, Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Programa de Pós Graduação de Ciências, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SPOLAORE, P. *et al.* A. Commercial applications of microalgae: Review. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.

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

SUBCZUK, T. M.; CHISTI, Y. Potential fuels oils from the microalgae *Choricystis minor*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v 85, p. 100 – 108, 2010.

TAHER. D. M. **Biodiesel de microalgas cultivadas em dejetos suíno biodigerido**. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Materiais) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

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

TANG, D. *et al.* CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3071 – 3076, 2011.

TANG, H. *et al.* Continuous Microalgae Cultivation in a Photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, p. 2468 – 2474, 2012.

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

THIANSATHI, W. *et al.* The kinetics of *Scenedesmus obliquus* microalgae growth utilizing carbon dioxide gas from biogas. **Biomass and Bioenergy**, v. 76, p. 79 – 85, 2015

TOMASELLI, L. The microalgal cell. In: RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Blackwell Science, 2004. p. 178 – 214.

TREDICI, M. R. Mass production of microalgae: Photobioreactors. In: RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Blackwell Science, 2004. p. 178 – 214.

URIARTE, I. *et al.* Cell characteristics and biochemical composition of *Dunaliella primolecta* Butcher conditioned at different concentrations of dissolved nitrogen. *Journal of Applied Phycology*, v. 5, p. 447 – 453, 1993.

WANG, B.; LAN, C. Q.; HORSMAN, M. Close photobioreactor for production of microalgal biomasses. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 904 – 912, 2012.

WANG, X. *et al.* Two-stage photoautotrophic cultivation to improve carbohydrate production in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Biomass and Bioenergy**, v. 74, p. 284 – 287, 2015.

WEI, Y; CHENG, F.; ZHENG, H. Synthesis and flocculating properties of cationic starch derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 673 – 679, 2008.

WEN, Q., CHEN, Z.; LI, P.; DUAN, R.; REN, N. Lipid production for biofuels from hydrolyzate of waste activated sludge by heterotrophic *Chlorella protothecoides*. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 695 – 698, 2013.

WU, J. *et al.* Evaluation of several flocculants for flocculating microalgae. **Bioresource Technology**, v. 197, p. 495 – 501, 2015.

WU, L. F. *et al.* The feasibility of biodiesel production by microalgae using industrial wastewater. **Bioresource Technology**, v. 113, p. 14 – 18, 2012.

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

XU, L. *et al.* Microalgal bioreactors: Challenges and opportunities. **Engineering in Life Sciences**, v 9,. P. 178 – 189, 2009.

XU, Y.; PURTON, S.; BAGANZ, F. Chitosan flocculation to aid the harvesting of the microalgae *Chlorella sorokiana*. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 296 – 301, 2013.

YANG, C.; HUA, Q.; SHIMIZU, K. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, p. 87 – 102, 2000.

YANG, J.; XU, M.; ZHANG, X.; HU, Q.; SOMMERFELD, M.; CHEN, Y. Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: Water footprint and nutrients balance. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 159 – 165, 2011.

YOO, C.; JUN, S.; LEE, J.; AHN, C.; OH, H. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 71 – 74, 2010.

ZHAO, B. et al. Carbon dioxide fixation and biomass production from combustion flue gas using energy microalgae. **Energy**, v. 89, p. 347 – 357, 2015.

ZHAO, G. et al. The effect of different trophic modes on lipid accumulation of *Scenedesmus quadricauda*. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 466 – 471, 2012.

ZHENG, A; HE, M.; JIANG, J.; ZOU, S.; YANG, W.; ZHANG, Y.; DENG, J.; WANG, C. Effect of kelp waste extracts on the growth and lipid accumulation of microalgae. **Bioresource Technology**, v. 201, p. 80 – 88, 2016.

ZHU, S. et al. Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis*. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 191 – 198, 2014.

ZITTELI, G. C. et al. Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. Cultures in outdoor tubular photobioreactors. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 299 – 312, 1999.