

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**EDUARDO VIEIRA STECKERT**

**EFEITO DA ADIÇÃO DE FOSFATO, METAIS TRAÇO E VITAMINAS NO CULTIVO  
DA MICROALGA *Chlorella* sp.**

**Porto Alegre  
2014**

**EDUARDO VIEIRA STECKERT**

**EFEITO DA ADIÇÃO DE FOSFATO, METAIS TRAÇO E VITAMINAS NO CULTIVO  
DA MICROALGA *Chlorella* sp.**

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Alimentos da UFRGS como parte dos requisitos necessários para obtenção do Título de Engenheiro de Alimentos.

Orientador: Rosane Rech

**Porto Alegre**

**2014**

**EDUARDO VIEIRA STECKERT**

**EFEITO DA ADIÇÃO DE FOSFATO, METAIS TRAÇO E VITAMINAS NO CULTIVO  
DA MICROALGA *Chlorella* sp.**

Aprovado em: 10/12/2014

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Rosane Rech (Orientadora)  
Doutor em Ciências  
ICTA/UFRGS

---

Prof<sup>a</sup>. Elizangela Gonçalves de Oliveira  
Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos  
UFRGS

---

Prof. André Jarenkow  
Mestre em Engenharia Química  
UFRGS

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais por todo apoio e suporte.

Aos amigos e familiares pelo incentivo ao longo da graduação.

À Carol, pela paciência, apoio e amor.

Aos amigos de longa, em especial, meu grande amigo Rodrigo Ahlert Weirich, pelos conselhos, o incentivo e estar disposto a me ouvir e ajudar há 19 anos.

Aos amigos do Lab 117 pelas risadas e alegria que tornaram o ambiente de trabalho um lugar acolhedor e agradável.

Aos amigos feitos ao longo da graduação, esta experiência não seria a mesma sem vocês.

À minha orientadora, professora Rosane Rech, agradeço por me deixar fazer parte do seu grupo de pesquisa e a disponibilidade, paciência e atenção dadas nessa etapa final.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>7</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>8</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	8
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	8
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>9</b>
3.1 MICROALGAS .....	9
<b>3.1.1 Uso de microalgas na alimentação humana</b> .....	<b>10</b>
<b>3.1.2 Uso de microalgas para o biodiesel</b> .....	<b>11</b>
<b>3.1.3 Microalga <i>Chlorella</i></b> .....	<b>13</b>
3.2 NUTRIÇÃO ALGÁCEA.....	13
<b>3.2.1 Influência de nutrientes em cultivos no conteúdo lipídico</b> .....	<b>14</b>
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>16</b>
4.1 MICROALGA E MEIO DE CULTIVO .....	16
4.2 PRÉ-INÓCULOS .....	17
4.3 CULTIVO EM FOTOBIORREATOR .....	17
4.4 ACOMPANHAMENTO DO CRESCIMENTO DAS MICROALGAS POR GRUPO DE CONTROLE .....	18
4.5 ANÁLISE DO TEOR DE LIPÍDIOS .....	19
<b>4.5.1 Bligh n' Dyer</b> .....	<b>20</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>21</b>
5.1 CULTIVO DE <i>CHLORELLA</i> SP. ....	21
5.2 EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS.....	22
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>24</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>25</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Estufa rotatória com os pré-inóculos das microalgas.....	17
<b>Figura 2:</b> Vista lateral do fotobiorreator utilizado (KOCHEM et al., 2014).....	18
<b>Figura 3:</b> Relação entre biomassa e densidade ótica da <i>Chlorella</i> sp. a 750 nm (JARENKOW, 2014).....	19
<b>Figura 4:</b> Curva de biomassa ao longo do tempo do cultivo de <i>Chlorella</i> sp. sob temperatura de 28,5 °C e luminosidade de 18 kwx, para os grupos de análise Padrão (sem adição de nutrientes), F (adição de fosfato), FM (adição de fosfato e metais traço) e FMV (adição de fosfato, metais traço e vitaminas).....	21

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Principais microalgas produzidas no mundo, sua quantidade, os países produtores e suas aplicações.....	10
<b>Tabela 2:</b> Rendimento de Óleo por hectare de diferentes fontes.....	11
<b>Tabela 3:</b> Teor lipídico de algumas espécies de microalga.....	12
<b>Tabela 4:</b> Elementos presentes na composição celular das microalgas.....	13
<b>Tabela 5:</b> Grupos de análise e seus respectivos nutrientes.....	19
<b>Tabela 6:</b> Biomassa final e produtividade de biomassa para o cultivo de <i>Chlorella</i> sp com diferentes nutrientes.....	21
<b>Tabela 7:</b> Teor de Lipídios do cultivo de <i>Chlorella</i> sp. com diferentes nutrientes....	22

## RESUMO

Existem cada vez mais estudos voltados para tentar extrair ao máximo os diversos compostos presentes nas microalgas, uma vez para estes existem diversas aplicações. No caso da indústria de alimentos, as microalgas possibilitam diversos tipos de pigmentos com propriedades bioativas, diversos ácidos graxos poli-insaturados e pós para a mistura com diferentes tipos de alimentos. Existem empresas que realizam a produção em massa de microalgas, se beneficiando dos produtos e da vantagem de que elas não necessitam de grandes áreas para o seu cultivo. Mesmo assim, existem diversas pesquisas que visam maximizar a produção de biomassa e Lipídios através de variações nas condições do cultivo. Foi proposto, no presente trabalho, a adição de diferentes nutrientes ao longo do tempo de cultivo para determinar seu efeito tanto na biomassa e quanto no teor lipídico final da microalga *Chlorella* sp. Para isso foi realizado um cultivo no qual existiram 4 grupos para análise: o grupo Padrão, que serviu como controle; o grupo F, no qual foi adicionado solução fosfato; o grupo FM, no qual foi adicionado fosfato e metais traço; e o grupo FMV, no qual foi adicionado fosfato, metais traço e vitaminas. Ao término do cultivo todos os grupos apresentaram a mesma quantidade de biomassa final. Já em relação ao teor de lipídios, o grupo Padrão, F e FM apresentaram a mesma quantidade, entretanto, o grupo FMV apresentou 50 % a mais de lipídios.

**Palavras-chave:** Biocombustíveis. Microalgas. *Chlorella* sp. Fosfato. Metais Traço. Vitaminas.

## 1 INTRODUÇÃO

As microalgas possuem um papel essencial no ecossistema terrestre, uma vez que elas fazem parte do fitoplâncton, que é responsável por 90 % da fotossíntese produzida em oceanos, tornando-se assim as principais produtoras primárias marinhas. Sabe-se também que existem espécies que são encontradas em solos, pois convivem em associação com outros organismos.

Apesar de existirem relatos da utilização de microalgas ao longo dos séculos por algumas civilizações, elas só começaram a ser produzidas em massa a, aproximadamente, 40 anos atrás quando foi percebido que delas poderiam ser retirados diversos produtos de alto valor agregado, como vitaminas, proteínas, ácidos graxos poli-insaturados e pigmentos. Tais produtos podem ser aplicados em diversas áreas como a nutrição humana e animal, aquicultura, cosméticos e produção de biocombustíveis.

No caso da nutrição humana, o uso de microalgas se destaca em duas aplicações, como suplemento humano, devido às vitaminas e proteínas, e a aplicação dos ácidos graxos e pigmentos em diversos produtos industrializados, como bebidas, doces, sorvetes, entre outros.

Existem diversas pesquisas que visam a otimização da produção de biomassa e lipídios, a partir de modificações das condições de cultivo, entretanto estas pesquisas utilizam tecnologias ou produtos químicos para se obter uma alta produção de biomassa e lipídeos. Devido a isso, notou-se a necessidade de um estudo que tentasse alcançar este objetivo utilizando apenas a adição de quantidades maiores dos mesmos nutrientes que são indispensáveis para o crescimento microbiano.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho visa avaliar a influência da adição de solução fosfato, metais traço e de vitaminas em cultivos de *Chlorella* sp.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar as possíveis variações na cinética de crescimentos dos cultivos uma vez que são adicionadas as soluções com nutrientes.
- Verificar as possíveis variações no teor lipídico das microalgas uma vez que são adicionadas as soluções com nutrientes.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 MICROALGAS

Microalgas são microrganismos fotossintetizantes que, atualmente, são cultivados para a produção de compostos de alto valor agregado, como ácidos graxos, proteínas, pigmentos, polissacarídeos e vitaminas (MARKOU *et al.*, 2014).

Elas constituem o fitoplâncton que é responsável por 90 % da fotossíntese no mar. Também, são de extrema importância para a existência de todos os ecossistemas marinhos e costeiros, uma vez que são os principais produtores primários marinhos (LOURENÇO, 2006).

As microalgas estão presentes principalmente em ambientes aquáticos, mas também estão na superfície de diversos tipos solos; podendo, inclusive, viver de forma simbiótica com vários organismos. Estima-se que exista aproximadamente 5000 espécies diferentes, das quais somente 3000 foram estudadas (RICHMOND, 2004).

Devido à sua estrutura unicelular, ou multicelular, que proporciona alta capacidade de adaptação e tolerância em condições ambientais consideradas extremas, microalgas possuem um alto crescimento (MATA *et al.*, 2010).

Existem diversas aplicações para microalgas, como:

- Aplicação em cosméticos, principalmente para produtos para a pele, como cremes e protetor solar, assim como produtos para cabelo (SPOLAORE *et al.*, 2006).
- Ração animal, principalmente para peixes, animais de estimação e animais de fazenda (SPOLAORE *et al.*, 2006).
- Consumo humano, como suplemento alimentar (SPOLAORE *et al.*, 2006).
- Produção de biocombustíveis renováveis (CHISTI, 2007).
- Produção de fertilizante, devido ao seu alto teor de nitrogênio e fósforo (WANG, *et al.*, 2008).
- Remoção de CO<sub>2</sub> da atmosfera e efluentes gasosos industriais pela biofixação (WANG *et al.*, 2008).
- Tratamento de água residuária, utilizando os contaminantes NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> como nutrientes (WANG *et al.*, 2008).

A Tabela 1 mostra as microalgas mais produzidas no mundo, os países que as produzem e suas aplicações.

**Tabela 1:** Principais microalgas produzidas no mundo, sua quantidade, os países produtores e suas aplicações.

Microalga	Produção Anual (ton de peso seco)	Países Produtores	Aplicação
<i>Spirulina</i>	3000	China, Índia, EUA, Myanmar e Japão	Nutrição Humana Nutrição Animal Cosméticos
<i>Chlorella</i>	2000	Taiwan, Alemanha e Japão	Nutrição Humana Cosméticos Aqüicultura
<i>Dunaliella salina</i>	1200	Austrália, Israel, EUA e Japão	Nutrição Humana Cosméticos
<i>Aphanizomenon flosaquae</i>	500	EUA	Nutrição Humana
<i>Haematococcus pluvialis</i>	300	EUA, Índia e Israel	Aqüicultura

FONTE: adaptado de BRENAN; OWENDE, 2010.

### 3.1.1 Uso de microalgas na alimentação humana

Segundo Richmond (2004), microalgas têm sido cultivadas há mais de 35 anos para obtenção de biomassa que será destinada ao ser humano. Normalmente, elas são ofertadas como suplemento alimentar na forma de encapsulados ricos em proteínas e vitaminas ou como adição a alimentos industrializados, como massas, doces e bebidas (LOURENÇO, 2006).

Cultivos em larga escala também são realizados para obter compostos que podem ser aplicados na indústria de alimentos, como carotenoides e ácidos graxos poli-insaturados (MATA *et al*, 2010).

Carotenoides são pigmentos que podem ser aplicados como corantes em alimentos, mas que também possuem compostos antioxidantes e compostos que podem ser utilizados para síntese de substâncias essenciais para as células (LOURENÇO, 2006).

Dentre os carotenoides produzidos pelas microalgas, destaca-se a luteína, que o corpo humano não produz (GRANADO *et al.*, 2003). Ela é abundante em

vegetais verdes como o espinafre (SOMMERBURG *et al.*, 1998) e está relacionada a prevenção de doenças do coração, câncer e cataratas (GRANADO *et al.*, 2003). Já foi constatado que a *Chlorella* acumula uma significativa quantidade de luteína, podendo ser uma alternativa à extração de plantas e vegetais (CHA *et al.*, 2008).

Em relação aos ácidos graxos, as microalgas produzem uma grande quantidade destes que podem ser utilizados para a prevenção de doenças degenerativas, Alzheimer e câncer (HUANG *et al.*, 2011), assim como para a aplicação em indústrias de alimentos como suplementação (APT, BEHRENS, 1999).

### 3.1.2 Uso de microalgas para o biodiesel

Biodiesel é produzido a partir de óleos derivados de biomassa, principalmente de óleos vegetais (HUANG *et al.*, 2009). Ele é uma fonte de energia atrativa devido a uma série de razões:

- É uma fonte renovável que pode ser estabelecida de maneira sustentável (SHEEHAN *et al.*, 1998).
- Não possui uma liberação alta nem de dióxido de carbono quanto de enxofre (VICENTE *et al.*, 2004);
- Apresenta vantagens econômicas devido à tendência de combustíveis não renováveis aumentem seus preços cada vez mais (CADENAS *et al.*, 1998).
- Possui uma melhor biodegradabilidade (MA; HANNA, 1999).

As microalgas têm sido visadas como produtoras para o biodiesel devido à eficiência fotossintética, maior produção de biomassa e maior taxa de crescimento, comparadas a outras fontes (HUANG, *et al.*, 2009). Chisti (2007) também destaca que o rendimento de óleo por área para a produção de microalgas é maior do que outros vegetais (vide Tabela 2) e que algumas espécies podem ter mais de 50 % de seu peso na forma de óleo (vide Tabela 3), o que reforça o potencial que as microalgas têm para se tornar umas das principais fontes de produção de biodiesel.

**Tabela 2:** Rendimento de óleo por hectare de diferentes fontes.

Fontes	Produção de Óleo (L/ha)
Milho	172
Soja	446

Canola	1190
Coco	2689
Palma	5950
Microalga <sup>a</sup>	136.900
Microalga <sup>b</sup>	58.700

<sup>a</sup> 70% de óleo em peso seco de biomassa.

<sup>b</sup> 30% de óleo em peso seco de biomassa.

FONTE: adaptado de CHISTI, 2007.

**Tabela 3:** Teor lipídico de algumas espécies de microalga (CHISTI, 2007).

<b>Espécie de Microalga</b>	<b>Teor Lipídico (% em peso seco)</b>
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella</i> sp.	28-32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16-37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis</i> sp.	25-33
<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Nannochloris</i> sp.	20-35
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia</i> sp.	45-47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30
<i>Schizochytrium</i> sp.	50-77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23

FONTE: CHISTI, 2007.

Embora as microalgas apresentem um bom rendimento de lipídios para a produção de biodiesel o processo não está livre de falhas, sendo um dos pontos mais estudados a redução da viscosidade do biodiesel produzido por elas. Uma vez que quanto maior a viscosidade do combustível, mais difícil sua combustão. Atualmente existem estudos em técnicas que estão resolvendo este problema (BAHADAR; KAHN, 2013).

### 3.1.3 Microalga *Chlorella*

A microalga *Chlorella* é uma alga unicelular, com formato esférico, globular ou elipsoidal e não móvel. Segundo PHUKAN et al (2011), sua composição centesimal é, em média, de 10 % de carboidrato, 44 % de proteína, 29 % de Lipídios e 8,5 % de minerais e vitaminas.

A comercialização da *Chlorella* começou em 1961, quando esta foi produzida em massa pela empresa Nihon Chlorella nas instalações do Instituto de Pesquisa de Microalga do Japão (também chamado de Instituto *Chlorella*). Este foi construído em 1957 para o desenvolvimento em massa de microalgas, em especial a *Chlorella* (RICHMOND, 2004).

Ela é utilizada em muitas pesquisas de biodiesel (XU et al., 2006, ZHOU et al, 2013) e é a segunda microalga mais produzida do mundo para aplicação na nutrição humana, cosméticos e aquicultura (BRENAN; OWENDE, 2010).

### 3.2 NUTRIÇÃO ALGÁCEA

Devido ao fato das microalgas conterem menos celulose em relação a espécies de plantas terrestres, elas possuem uma demanda maior de nutrientes, como carbono, nitrogênio, fósforo, ferro, entre outros; pois os utilizam na fotossíntese para se multiplicar (MARKOU et al, 2014).

A Tabela 4 apresenta os principais nutrientes necessários às algas e que fazem parte de sua composição.

**Tabela 4:** Elementos presentes na composição celular das microalgas.

Elemento	Composição celular mg/g (peso seco)
C	175-650
H	205-330
O	29-100
N	0,4-47
Na	1-75
K	0-80
Ca	0,5-33

P	1,5-16
S	0,75-16
Mg	0,5-75
Fe	0,2-34

FONTE: adaptado de RICHMOND, 2004.

Richmond (2004) destaca entre estes elementos, os seguintes:

Carbono: está presente em todos os compostos orgânicos que são sintetizados pelas microalgas, podendo corresponder à 65 % do peso seco delas (MARKOU et al, 2014).

Nitrogênio: está presente nas substâncias das células e das proteínas funcionais das microalgas, podem corresponder até 10 % de biomassa seca (LOURENÇO, 2006).

Fósforo: está presente nos ácidos nucleicos, ATP, membranas celulares, e em todos os processos que envolvem trocas energéticas nas células (LOURENÇO, 2006).

### 3.2.1 Influência de nutrientes em cultivos no conteúdo lipídico

Existem estudos que visam maximizar o crescimento e acúmulo de Lipídios das microalgas por meio de oferta de nutrientes. Liu *et al.*, (2007) avaliou o efeito da adição de ferro em um cultivo de *Chlorella vulgaris* adicionando diferentes alíquotas de  $\text{FeCl}_3(6\text{H}_2\text{O})/\text{EDTA}$  em seus grupos de análise em dois momentos, sete dias após o cultivo e no décimo oitavo dia para estimular seu crescimento. Ao término do cultivo, foi constatado que o cultivo com adição dupla de Fe apresentou um crescimento maior comparado com o padrão. Entretanto, não foram constatadas diferenças na quantidade de Lipídios produzida.

Li *et al.* (2014) estudaram o crescimento de um cultivo de *Chlorella protothecoides* através da adição de diferentes concentrações de fosfato e nitrogênio em diferentes grupos. Todas as adições foram realizadas no início do cultivo, o qual durou 168 h. Foi observado que os cultivos com menor quantidade de fósforo e nitrogênio apresentaram melhores resultados na produção de lipídios.

Chen *et al.* (2011) testaram a influência de nutrientes em um cultivo de *Dunaliella tertiolecta* através da carência de algum elemento necessário para a

nutrição da microalga. Foram estudados diversos grupos, cada um sem um elemento, como fósforo, cobalto, ferro, molibdênio, manganês, entre outros. Ao término do cultivo, foi constatado que fosfato e metais traços como cobalto, ferro, molibdênio e manganês são fundamentais para um bom crescimento do cultivo. Além disso, foi visto que o uso de nitrato ao invés de amônia como fonte de nitrogênio possibilitou uma produção maior de biomassa.

## 4 METODOLOGIA

O cultivo da microalga *Chlorella* sp., assim como as análises do teor de Lipídios destas, foram desenvolvidos no Laboratório de Bioengenharia do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O cultivo e as análises foram realizados entre os meses de setembro e outubro de 2014.

### 4.1 MICROALGA E MEIO DE CULTIVO

Para a realização do trabalho, foi utilizada a microalga *Chlorella* sp., cujas cepas foram cedidas pelo professor Sérgio Lourenço do Laboratório de Fisiologia e Cultivo de Algas do Departamento de Biologia Marinha da Universidade Federal Fluminense.

O meio de cultivo utilizado no trabalho é o meio Guillard - "f1/2" modificado (JARENKOW, 2014), utilizando água do mar artificial contendo os seguintes componentes: 34 g L<sup>-1</sup> de sal marinho (Red Sea), 300 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de sódio (NaNO<sub>3</sub>), 1 mL L<sup>-1</sup> de solução de fosfato de sódio (5 g L<sup>-1</sup>), 1 mL<sup>-1</sup> de solução de silicato de sódio (30 g L<sup>-1</sup>), 1 mL L<sup>-1</sup> de solução de metais-traço, 1 mL L<sup>-1</sup> de solução de vitaminas e 1 mL L<sup>-1</sup> de solução-tampão de pH. A solução de metais traço possui os seguintes componentes: 9,8 mg L<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 22 mg L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1 mg L<sup>-1</sup> de CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 180 mg L<sup>-1</sup> de MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 6,3 mg L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 4,36 g L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>EDTA e 3,15 g L<sup>-1</sup> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O. A solução de vitaminas contém: 100 mg L<sup>-1</sup> de tiamina, 0,5 mg L<sup>-1</sup> de cianocobalamina e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de biotina. A solução tampão, utilizada para manter o pH entre 7,5 e 8,5, foi feita com 50 g de TRIS, aproximadamente 30 mL de ácido clorídrico para ajustar o pH em valor de 7,1 a 7,3 e água destilada, sendo o volume total da solução de 200 mL.

As soluções estoques dos componentes foram mantidas em geladeira até serem adicionadas ao meio de cultivo, que foi previamente autoclavado (121 °C / 15 min), para que não ocorresse a precipitação ou degradação térmica dos mesmos.

## 4.2 PRÉ-INÓCULOS

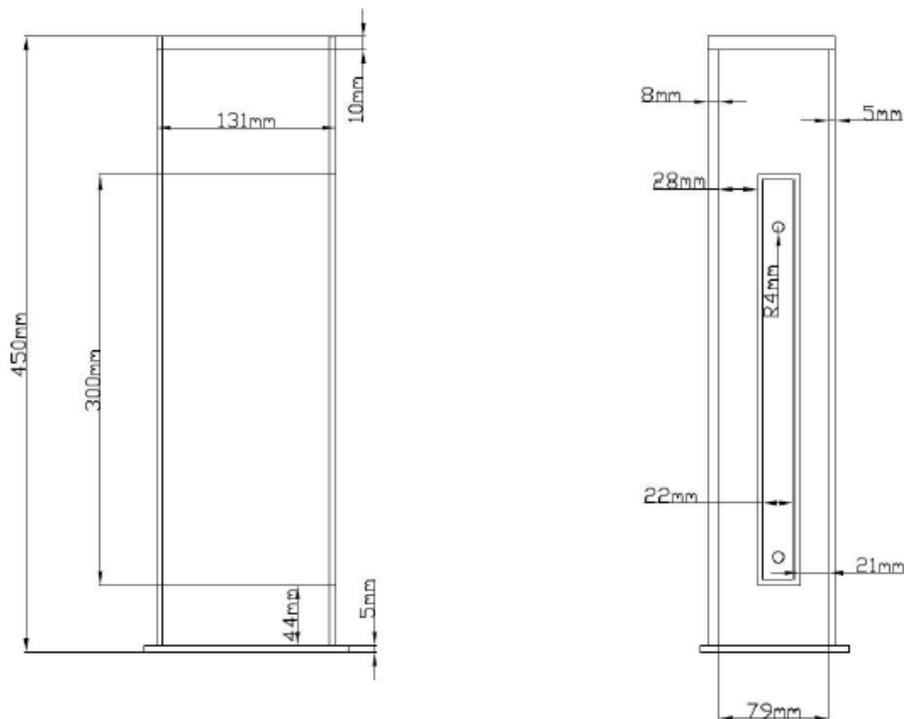
Alíquotas de 10 mL da solução de cultura estoque de *Chlorella* sp. foram pré-inoculadas em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio de cultivo. Após, os frascos foram colocados em estufa rotatória (Figura 1) com agitação de 90 rpm e temperatura de 30 °C com iluminação constante por lâmpadas eletrônicas totalizando 64 W (aproximadamente 2,5 klx). Passados 7 dias, foram adicionados mais 100 mL de meio de cultivo e os pré-inóculos foram mantidos em estufa por mais 7 dias. Para a inoculação dos biorreatores, os pré-inóculos foram homogeneizados em um frasco Duran estéril, a fim de eliminar as variações devido à diferença no crescimento entre as microalgas na estufa rotatória.



**Figura 1:** Estufa rotatória com os pré-inóculos das microalgas.

## 4.3 CULTIVO EM FOTOBIORREATOR

Os experimentos foram realizados em 8 fotobiorreatores de acrílico do tipo *airlift* com loop externo, volume útil de 2,5 L e com as seguintes dimensões: altura, 450 mm, largura, 150 mm, profundidade 79 mm, conforme a Figura 2 (KOCHEM et al., 2014). Os fotobiorreatores também possuem uma camisa interna para a troca de calor com um banho termostático para o controle da temperatura, a qual se manteve a 28,5 °C e estiveram sob iluminação constante de 18,0 klx na face do *riser*.



**Figura 2:** Vista lateral do fotobiorreator utilizado (KOCHEM et al., 2014).

Previamente à inoculação, cada fotobiorreator, teve seu volume útil completado com água e foi higienizado com uma solução comercial de hipoclorito de sódio ( $5 \text{ mL L}^{-1}$ ) durante 12 h. Após este período, foi adicionado, a cada fotobiorreator, 2,5 mL de solução de tiosulfato de sódio ( $250 \text{ g L}^{-1}$ ) com a finalidade de neutralizar o cloro. Após 1 h, esta água de lavagem foi descartada e os meios de cultivos foram colocados nos fotobiorreatores.

A cada fotobiorreator foi acoplado uma corrente de ar comprimido, o qual era filtrado por uma membrana de  $0,22 \text{ }\mu\text{m}$  (Midisart®2000 da Sartorius Stedim Biotech), para evitar que sujeiras pudessem contaminar o cultivo; e possuía uma vazão de  $1,0 \text{ L min}^{-1}$ , a qual era controlada por rotômetros.

#### 4.4 ACOMPANHAMENTO DO CRESCIMENTO DAS MICROALGAS POR GRUPO DE CONTROLE

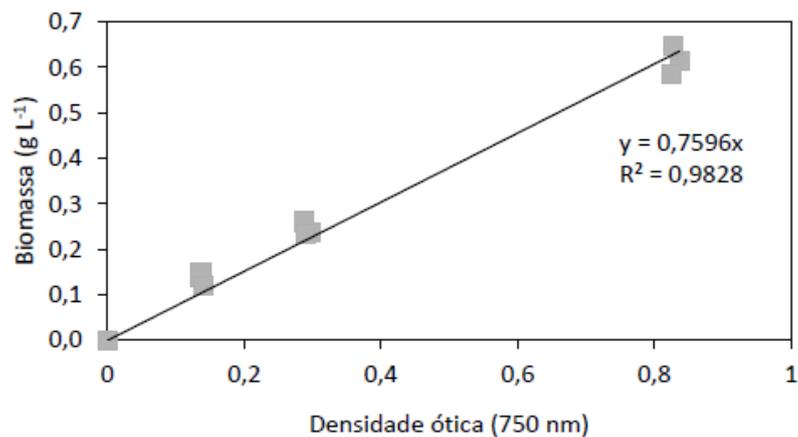
Uma vez feito o inoculo das microalgas nos fotobiorreatores, foram separados os 4 grupos de controle, 2 para cada grupo, na estante com iluminação. A Tabela 5 mostra os grupos analisados e os nutrientes adicionados aos mesmos. Todos os nutrientes foram adicionados na concentração de  $1,0 \text{ mL L}^{-1}$ . Todas as adições de

nutrientes começaram a ser aplicadas após ser transcorridas 24 h do início do cultivo.

**Tabela 5:** Grupos de análise e seus respectivos nutrientes.

Grupo	Nutrientes Adicionados (1 mL L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
Padrão	-
F	Fosfato
FM	Fosfato + Metais Traço
FMV	Fosfato + Metais Traço + Vitaminas

O crescimento das algas foi monitorado através de medida de densidade ótica da cultura a 750 nm com espectrofotômetro (Amersham Biosciences modelo Ultrospec 3100 pro) e relacionada com biomassa ( $X$ ) por medida de peso-seco. Para determinar a quantidade de biomassa relacionada com a densidade ótica para *Chlorella* sp., foi utilizada a relação observada por JARENKOW (2014), e está mostrada na Figura 3.



**Figura 3:** Relação entre biomassa e densidade ótica da *Chlorella* sp. a 750 nm (JARENKOW, 2014).

#### 4.5 ANÁLISE DO TEOR DE LIPÍDIOS

Após o término do experimento, o conteúdo do fotobiorreatores foi centrifugado (9000 ×  $g$  por 10 min) para a obtenção da biomassa, a qual foi

lioofilizada por 72 h, para que se pudesse realizar a extração de Lipídios através do método Bligh n' Dyer.

#### 4.5.1 Bligh n' Dyer

Para a extração dos Lipídios, pesou-se aproximadamente 0,5 g de microalgas liofilizadas em um vidro âmbar, após foram adicionadas 20 mL de metanol, 10 mL de clorofórmio e 8 mL de água destilada. O vidro foi então fechado e agitado em agitador magnético por 20 min.

Passado este tempo, foram adicionados mais 10 mL de clorofórmio e uma solução 10 % em peso de sulfato de sódio e água. A solução foi então vertida em um funil de separação, no qual foi separado o clorofórmio, contendo os Lipídios, e o metanol, contendo água. A parte inferior da mistura, a qual era constituída pelo clorofórmio, foi coletada e adicionada 1 g de sulfato de sódio anidro. Esta solução foi então filtrada e teve 5 mL colocadas em um béquer previamente tarado e colocada em estufa a 75 °C. Todas as análises foram feitas em duplicatas por reator. Após 2 h, os béqueres foram retirados da estufa e pesados. Por diferença analítica foi calculado o teor de Lipídios na amostra, segundo a equação (1):

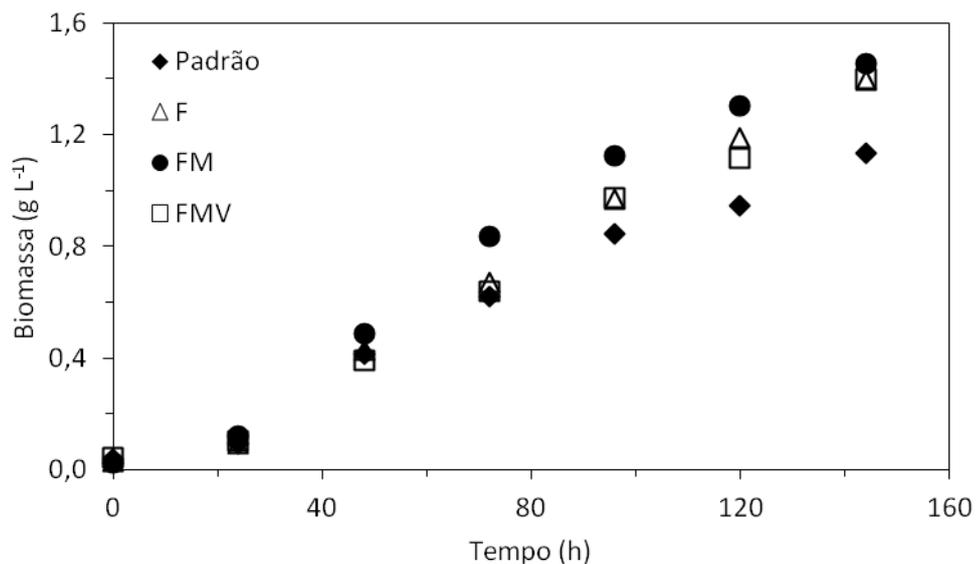
$$\% \text{ lipideos} = \left( \frac{(Pg - Ps) * 4}{m} \right) * 100 \quad (1)$$

Onde: Pg é o peso do béquer contendo Lipídios (g) a partir de 5 mL da solução filtrada, Ps é o peso do béquer seco e *m* é o peso da amostra (g).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CULTIVO DE *Chlorella* sp.

A curva de cinética de crescimento, biomassa final e a produtividade de biomassa dos grupos Padrão, F, FM e FMV, estão representados na Figura 4 e Tabela 6 respectivamente:



**Figura 4:** Curva de biomassa ao longo do tempo do cultivo de *Chlorella* sp. sob temperatura de 28,5 °C e luminosidade de 18 klx, para os grupos de análise Padrão (sem adição de nutrientes), F (adição de fosfato), FM (adição de fosfato e metais traço) e FMV (adição de fosfato, metais traço e vitaminas).

**Tabela 6:** Biomassa final e produtividade de biomassa para o cultivo de *Chlorella* sp. com diferentes nutrientes.

Grupo	Biomassa Final (g L <sup>-1</sup> )	Produtividade de Biomassa (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
P	1,13 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,19 ± 0,00 <sup>b</sup>
F	1,40 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,23 ± 0,02 <sup>ab</sup>
FM	1,46 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,00 <sup>a</sup>
FMV	1,40 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,07 <sup>a</sup>

Letras iguais na mesma coluna significam que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ )

Observa-se que, tanto em relação à biomassa final quanto à produtividade, os grupos FM e FMV obtiveram uma biomassa maior que o grupo Padrão, este que, por sua vez, não apresentou diferença significativa em relação ao grupo F. Entretanto o grupo F também não apresentou diferença significativa entre os outros grupos que foram adicionados nutrientes, sendo que a diferença entre suas cinéticas de crescimento ocorre a partir de 96 h a partir do início do cultivo.

Nenhum dos grupos de análise de Chen *et al.* (2011), os quais continham carência de fósforo, cobalto, ferro, molibdênio, manganês, entre outros nutrientes, conseguiu obter uma biomassa maior do que o grupo padrão, o qual não tinha carência de nenhum nutriente.

Liu *et al.* (2007) observou um aumento de biomassa em todos os grupos de análise em que adicionou ferro em comparação ao controle.

Já Li *et al.*, (2014), também constatou que a maior quantidade de biomassa foi proveniente do grupo em que foi adicionado tanto fósforo quanto nitrogênio.

## 5.2 EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS

O teor de Lipídios dos grupos Padrão, F, FM e FMV, estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7:** Teor de Lipídios do cultivo de *Chlorella* sp. com diferentes nutrientes.

Grupo	Lipídios (%)	Produtividade de Lipídeos (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
Padrão	7,88 ± 0,02 <sup>b</sup>	14,9 ± 0,02 <sup>b</sup>
F	7,86 ± 0,01 <sup>b</sup>	18,1 ± 0,01 <sup>b</sup>
FM	7,95 ± 0,00 <sup>b</sup>	19,1 ± 0,00 <sup>b</sup>
FMV	11,59 ± 0,26 <sup>a</sup>	26,6 ± 0,26 <sup>a</sup>

Observa-se que não houve diferença significativa entre o teor de Lipídios dos grupos Padrão, F e FM. Entretanto, o grupo FMV, o qual recebeu alíquotas diárias de fosfato, metais traço e vitaminas, apresentou um teor de Lipídios de 11,59 % em relação aos outros grupos analisados, mostrando que as vitaminas possuem maior influência na quantidade de Lipídios presentes na *Chlorella* sp.

Os resultados são similares aos de Chen *et al.* (2007), pois o grupo que tinha carência de fósforo obteve um teor de Lipídios próximo ao do grupo padrão, assim como no cultivo, o grupo F (adicionado de fosfato), obteve o mesmo teor de Lipídios do que o padrão.

Estes resultados são diferentes aos de Liu *et al* (2007), uma vez que ele não constatou diferença significativa entre o teor de lipídios do cultivo com diferentes aplicações de ferro.

Já em relação à Li *et al* (2014) também existem diferenças pois o grupo que continham uma quantidade maior de fósforo obteve um teor lipídico maior do que o grupo controle, enquanto que o no cultivo o grupo F não apresentou diferença em relação ao grupo Padrão.

## 6 CONCLUSÃO

A adição de nutrientes ao longo do cultivo se mostrou uma técnica válida para estimular o crescimento da microalga *Chlorella* sp., uma vez que os grupos FM e FMV, mesmo contendo diferentes nutrientes, apresentam uma quantidade de biomassa superior ao grupo Padrão, sem adição de nutrientes ao longo do cultivo. Entretanto, não se pode apontar a melhor opção de adição de nutrientes uma vez que não houve diferença significativa de crescimento entre os 3 grupos acrescidos destes.

Em relação ao teor lipídico, os grupos F e FM não apresentaram diferença entre o grupo Padrão. Entretanto, o grupo FMV obteve um teor lipídico aproximadamente 47 % maior aos demais grupos, mostrando que as vitaminas possuem maior influência na quantidade de Lipídios presentes na *Chlorella* sp.

Visto isso, é correto afirmar que a adição de fosfato, metais traço e vitaminas ao longo do cultivo indica ser a melhor opção para se promover um crescimento e teor lipídico maior para a *Chlorella* sp.

## 7 REFERÊNCIAS

APT, K.E., BEHRENS, P.W. Commercial developments in microalgal biotechnology. **J. Phycol.** 1999, 35, 215–226.

BAHADAR, A., KHAN, M.,B. , Progress in energy from microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews.** p. 128-148, 2013.

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.** p. 557-577, 2010.

CADENAS, A., CABEZANDO S. Biofuels as sustainable technologies: perspectives for less developed countries. **Technol Forecast Social Change** 1998;58:83–103.

CAVONIUS, L., R.; CARLSSON, N., G.; UNDELAND, I. Quantification of total fatty acids in microalgae: comparison of extraction and transesterification methods. **Anal Bioanal Chem.**p. 7313–7322, 2014.

CHA, K. H.; KOO, S. Y.; LEE, D. Antiproliferative effects of carotenoids extracted from *Chlorella ellipsoidea* and *Chlorella vulgaris* on human colon cancer cells. **J. Agric. Food Chem.** 2008, 56, 10521–10526.

CHEN, M.; TANG, H.; MA, H.; HOLLAND, T. C.; SIMON NG, K. Y.; SALLEY, S. O. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. **Bioresource Technology.** 2011, 102,1649-1655.

CHISTI, Y. Constraints to commercialization of algal fuels. **Journal of Biotechnology.** p. 201-214, 2010.

CHISTI, Y. Research review paper Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances** 25. p. 294–306, 2007.

ELSER, J., J. Phosphorus: a limiting nutrient for humanity?. **Current Opinion in Biotechnology**. p. 833–838, 2012.

GRANADO, F.; OLMEDILLA, B.; BLANCO, I. Nutritional and clinical relevance of lutein in human health. **Brit. J. Nutr.** 2003, 90, 487-502.

JARENKOW, A. **Estudo da produção e extração de Lipídios na microalga *Chlorella* sp.** Programa de Pós-graduação de Engenharia Química UFRGS. Porto Alegre: [s.n.]. 2014.

KOCHEM, L. H. et al. Characterization of a Novel Flat-Panel Airlift Photobioreactor With an Internal Heat Exchanger. **Chemical Engineering & Technology**, v. 37, n. 1, p. 59–64, 1 jan. 2014.

HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X.; CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**. P.38-46, 2010.

HUANG, J.J†., CHEUNG, P.,C†. Enhancement of Polyunsaturated Fatty Acids and Total Carotenoid Production in Microalgae by Ultraviolet Band A (UVA, 365 nm) Radiation. **J. Agric. Food Chem.** 2011, 59, 4629–4636.

LI, Y.; HAN, F.; XU, H.; MU, J.; CHEN, D.; FENG, B., ZENG, H. Potential lipid accumulation and growth characteristic of the green alga *Chlorella* with combination cultivation mode of nitrogen (N) and phosphorus (P). **Bioresource Technology**. 2014, 171, 24-32.

LIU, Z-Y.; WANG, G-C.; ZHOU, B-C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**.2008, 99.131-135, 2013.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. São Carlos, SP: RiMa, 2006.

MA F, HANNA M., A. Biodiesel production: a review. **Bioresour Technol** 1999;70: 1–15.

MARKOU, G.; VANDAMME, D.; MUYLAERT, K. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. **Water Research**. p. 186-202, 2014.

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

PHUKAN, M. M. et al. Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock. **Special Issue of Energy from algae: Current status and future trends**, v. 88, n. 10, p. 3307–3312, out. 2011.

RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture**. Biotechnology and Physiology [s.l.] Blackwell Science, 2004.

SHEEHAN J, CAMBRECO, DUFFIELD J, GRABOSKI M, SHAPOURI H. An overview of biodiesel and petroleum diesel life cycles. **US Department of agriculture and Energy Report**; 1998. p. 1–35.

SOMMERBURG, O., KEUNEN, J.E., BIRD, A.C., van KUIJK, F.J. Fruits and vegetables that are sources for lutein and zeaxanthin: the macular pigment in human eyes. **Br. J. Ophthalmol.** 1998, 82, 907–910.

SPOLAORE, P. et al. Commercial application of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, p. 87–96, 2006.

VICENTE G, MARTINEZ M, ARACIL J. Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. **Bioresour Technol** 2004;92: 297–305.

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

ZHOU, X., P.; XIA, L.; GE, H.; Zhang, D.; HU, C. Feasibility of biodiesel production by microalgae *Chlorella* sp. (FACHB-1748) under outdoor conditions. **Bioresource Technology**. p.131-135, 2013.

WANG, B.; LI, Y.; WU, N.; LAN, C. CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology** **79**, 2008. 707-718.