



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL



ESCOLA DE ENGENHARIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

ENG07053 - TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**TESTE DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO PARA O CRESCIMENTO
DAS ESPÉCIES *Dunaliella tertiolecta* e *Chlorella* sp.**

LUIZA ABDALA

Orientador: Prof Dr Nilson Romeo Marcilio

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Rosane Rech

Porto Alegre, Dezembro de 2011

LUIZA ABDALA

**TESTE DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO PARA O CRESCIMENTO
DAS ESPÉCIES *Dunaliella tertiolecta* e *Chlorella* sp.**

Estudo apresentado como requisito parcial à
obtenção do grau de Engenheiro Químico na
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof Dr Nilson Romeo Marcilio

Co-Orientadora: Prof^ª Dr^ª Rosane Rech

Porto Alegre, 2011

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, aos meus pais, Paulo Abdala e Raquel Utz, pela ajuda e interesse demonstrado, pela constante atenção e apoio durante toda a minha formação acadêmica e em todos os momentos em que tive dúvidas. Agradeço também aos meus colegas da Engenharia Química, que me proporcionaram diversão e aprendizado “extraclasse” mesmo durante os momentos mais tensos.

Muito obrigada a Géssica, Tobias e André, do laboratório 117 do ICTA, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, que me ajudaram a desenvolver este trabalho com muita paciência e dedicação. Agradeço especialmente à Prof^a Dr^a. Rosane Rech, que me possibilitou a realização deste trabalho, sempre se dedicando ao máximo ao meu aprendizado.

Por fim agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela sua excelência no ensino, pela sua diversidade, que me ajudou a perceber o mundo e as pessoas de uma forma diferente, e principalmente, por ser uma universidade pública, gratuita e de qualidade.

RESUMO

A crescente preocupação com o meio ambiente e as emissões atmosféricas, principalmente o CO₂, alavancaram uma necessidade de se estudar formas de reduzir a emissão destes gases. As microalgas são uma grande alternativa neste sentido. Elas metabolizam o CO₂ durante a fotossíntese, e, como uma vantagem adicional, ainda são capazes de produzir subprodutos de alto valor agregado, como biodiesel e pigmentos, entre outros.

Em revisão bibliográfica, constatou-se que meios de cultivo de microalgas suplementados com nitrogênio apresentam maiores crescimentos de biomassa formada, chegando-se ao valor máximo de 5 g.L⁻¹, enquanto meios não suplementados formam aproximadamente 0,35 g.L⁻¹. Este trabalho visa testar a suplementação do meio de cultivo de microalgas das espécies *Dunaliella tertiolecta* e *Chlorella* sp com três diferentes sais de nitrato, o nitrato de amônio (NH₄NO₃), o nitrato de potássio (KNO₃) e o nitrato de sódio (NaNO₃), e verificar se existe diferença entre o uso de cada sal, quanto ao crescimento de biomassa e quanto à formação de carotenoides.

Para a espécie *Chlorella* sp, o nitrato de sódio apresentou maior crescimento de biomassa, maior biomassa final e maior acúmulo de carotenóides, em relação aos demais nitratos. Para a espécie *Dunaliella tertiolecta* os três sais não apresentaram diferença significativa entre si.

Palavras-chave: microalgas, nitrato de amônio (NH₄NO₃), nitrato de potássio (KNO₃), nitrato de sódio (NaNO₃).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais etapas da produção de produtos de microalgas (Demirbas, 2011).	5
Figura 2: Estrutura de alguns carotenoides (Guerin, Huntley <i>et al.</i> , 2003).....	8
Figura 3: Estágios da cadeia de produção de biodiesel a partir de microalgas (adaptado de Mata, Martins <i>et al.</i> , 2010).	15
Figura 4: Reação de transesterificação (Mata, Martins <i>et al.</i> , 2010)	15
Figura 5: Fotobiorreator tubular com sistema <i>airlift</i> (Molina, Fernandez <i>et al.</i> , 2001).....	18
Figura 6: Fotobiorreator <i>airlift</i> de placa plana (Degen, Uebele <i>et al.</i> , 2001).....	19
Figura 7: Representação dos fotobiorreatores utilizados no desenvolvimento deste trabalho.	21
Figura 8: Curva de crescimento de biomassa versus tempo para a <i>Chlorella</i> sp.	25
Figura 9: Biomassa total acumulada para a <i>Chlorella</i> sp.....	25
Figura 10: Reatores 5 e 6 no último dia de cultivo da <i>Chlorella</i> sp.	26
Figura 11: Reatores 1 e 2 no último dia de cultivo da <i>Chlorella</i> sp.	27
Figura 12: Curva de crescimento de biomassa versus tempo para a <i>D. tertiolecta</i>	28
Figura 13: Biomassa total acumulada para a <i>D. tertiolecta</i>	28
Figura 14: Curva de acúmulo de carotenoides no cultivo da <i>Chlorella</i> sp.	29
Figura 15: Carotenoides totais para o cultivo da <i>Chlorella</i> sp.	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Alguns produtos obtidos de microalgas.....	4
Tabela 2: Função dos nutrientes no cultivo de microalgas.	6
Tabela 3: Funções biológicas, benefícios à saúde e aplicações dos principais carotenoides.....	9
Tabela 4: Comparação entre fontes microbianas e sintéticas de carotenoides.....	10
Tabela 5: Comparação de algumas fontes de biodiesel.	13
Tabela 6: Vantagens e desvantagens do uso de microalgas para produção de biodiesel.	14
Tabela 7: Comparação entre sistemas abertos e fechados para microalgas.	16

Sumário

1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1 Microalgas.....	3
2.1.1 Meio de cultivo de Microalgas	5
2.1.2 Microalgas como fontes de pigmentos	8
2.1.3 Geração de Biodiesel a partir de Microalgas	11
2.2 Fotobiorreatores.....	15
2.2.1 Reatores tubulares.....	17
2.2.2 Reatores de placa plana.....	18
2.2.3 Fotobiorreatores <i>airlift</i> e Coluna de Bolhas	19
3. Materiais e Métodos.....	21
3.1 Fotobiorreatores.....	21
3.2 Condições de cultivo.....	22
3.3 Acompanhamento do crescimento.....	23
4. Resultados e Discussão	25
4.1 Cultivo <i>Chlorella</i> sp	25
4.2 Cultivo <i>Dunaliella tertiolecta</i>	28
4.3 Pigmentos na <i>Chlorella</i> sp.....	29
5. Conclusões	31
6. Trabalhos Futuros	32
7. Referências Bibliográficas	33

1. Introdução

Com o aumento nos níveis de CO₂ e outros gases de efeito estufa na atmosfera, e as alterações climáticas resultantes, começaram a se fazer necessários estudos para avaliar as possibilidades de redução dos níveis destes gases na atmosfera. Ainda assim, poucas alternativas se mostram viáveis para a redução da emissão do CO₂. Além disto, a crise energética mundial também traz preocupações tendo em vista que a principal matéria prima utilizada atualmente, os combustíveis fósseis, é um recurso não renovável e, portanto, passível de esgotamento.

A captura de CO₂ por microalgas pode ser considerada uma das mais eficientes técnicas de redução de emissão desses gases. Microalgas são organismos fotossintéticos que convertem luz solar, água e CO₂ em biomassa, e assim, são aliadas contra os problemas ambientais causados pelo CO₂, além de terem o potencial de gerar produtos de alto valor agregado a partir desta biomassa formada, como, por exemplo, o biodiesel.

Em comparação com outras matérias primas, como o óleo de dendê, e o óleo de milho, o biodiesel produzido a partir da biomassa de microalgas apresenta algumas vantagens. O óleo extraído das microalgas apresenta uma maior eficiência do que óleos de vegetais superiores e as microalgas têm a grande vantagem de não serem um alimento e, portanto, não contribuem para a crise alimentar, como é o caso do óleo de milho, nos Estados Unidos. Além disto, os cultivos de microalgas ocupam menor área de cultivo, e podem ser desenvolvidos em locais áridos, assim, não ocupam área de terras cultiváveis e, portanto, não competem com a agricultura. Sendo assim, pode-se dizer que as microalgas são as únicas matérias primas que poderiam substituir totalmente as matérias primas derivadas de petróleo.

Além disto, por ter a sua composição bioquímica extremamente variável de espécie em espécie, cultivos de microalgas também têm sido utilizados para a produção de diversos outros produtos, como alimentos e cosméticos, e, além disto, também podem ser utilizadas no tratamento de águas residuais, entre diversas outras aplicações. Dentre os inúmeros compostos extraídos, podem ser citados ácidos graxos poli-insaturados, carotenoides, ficobilinas, polissacarídeos, vitaminas, esteróis e diversos compostos bioativos naturais (antioxidantes, redutores do colesterol etc.), os quais podem ser empregados especialmente no desenvolvimento de alimentos funcionais, por suas propriedades nutricionais e farmacêuticas.

Esta grande flexibilidade nas aplicações do uso de biomassa de microalgas é que confere a elas a condição de grande objeto de estudo, em diversas áreas de conhecimento.

O objetivo deste trabalho será testar a suplementação do meio de cultivo de microalgas das espécies *Dunaliella tertiolecta* e *Chlorella* sp com três diferentes sais de nitrato, o nitrato de amônio (NH_4NO_3), o nitrato de potássio (KNO_3) e o nitrato de sódio (NaNO_3), e verificar se existe diferença entre o uso de cada sal, quanto ao crescimento de biomassa e quanto à formação de carotenoides.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Microalgas

Microalgas são microrganismos eucarióticos, com representantes nas Divisões Cyanophyta (cianobactérias) e Prochlorophyta, ou procarióticos com representantes nas Divisões Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Haptophyta (Prymnesiophyta), Heterokontophyta (Bacillariophyceae, Chrysophyceae, Xantophyceae etc.), Cryptophyta e Dinophyta (Dermer, Ohse *et al.*, 2006), os quais crescem rapidamente e sob as mais diversas condições, devido a sua estrutura simples e unicelular. As microalgas são tidas como “fábricas de células”, que convertem dióxido de carbono em biomassa, ou em uma grande variedade de compostos bioativos (Xu, Weathers *et al.*, 2009). Estão presentes em todos os ecossistemas da Terra, não só aquáticos, como também terrestres, e é estimado que existam mais 50 mil espécies de algas, sendo somente 30 mil objetos de estudo (Mata, Martins *et al.*, 2010).

A produção comercial de microalgas tem aproximadamente 40 anos de história, sendo algumas espécies mais largamente cultivadas, como a *Spirulina*, utilizada para alimentos, *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis* para produção de carotenoides, e um grande número de espécies para aquicultura (Xu, Weathers *et al.*, 2009). Atualmente, a biodiversidade e consequente variabilidade na composição bioquímica da biomassa obtida através dos cultivos de microalgas, aliadas ao avanço tecnológico e subsequente possibilidade de atingir produções em larga escala, permitem que determinadas espécies sejam comercialmente utilizadas (Dermer, Ohse *et al.*, 2006).

Um crescente interesse comercial no cultivo e colheita de produtos de microalgas resultou em pesquisas no seu uso para produção de substâncias de alto valor agregado (Xu, Weathers *et al.*, 2009). Como organismos fotossintéticos, microalgas contém clorofila, a qual pode ser utilizada na alimentação e cosméticos. Também podem ser utilizadas na indústria farmacêutica já que algumas espécies de microalgas produzem compostos bioativos como antioxidantes e toxinas. Além disto, microalgas também são utilizadas com suplementos nutricionais por serem ricas em proteínas, vitaminas e polissacarídeos. Algumas espécies também contêm altos níveis de lipídeos, que podem ser extraídos e convertidos em biocombustíveis. Sendo assim, o cultivo de microalgas surge como uma alternativa, que além de permitir uma maior absorção de CO₂ da atmosfera, poderia ainda gerar produtos de interesse comercial como corantes, ácidos graxos, aminoácidos e proteínas, entre outros

(Meinerz, 2007). A Tabela 1 apresenta alguns produtos obtidos de microalgas. A Figura 1 apresenta as principais etapas da produção de produtos de microalgas.

Tabela 1: Alguns produtos obtidos de microalgas.

	Produto	Aplicações
Biomassa	Biomassa	Alimentos naturais "health food" Alimentos funcionais Aditivos alimentares Aquicultura Condicionador de solo
Corantes e antioxidantes	Xantofilas Luteína Beta-caroteno Vitamina C e E	Aditivos alimentares Cosméticos
Ácidos graxos	Ácido araquidônico - ARA Ácido eicosapentenoico - EPA Ácido docosahexaenoico - DHA Ácido gama-linoleico - GCA Ácido linoleico - LA	Aditivos alimentares
Enzimas	Superóxido dismutase - SOD Fosfoglicerato quinase - PGK Luciferase e Luciferina Enzimas de restrição Polissacarídeos	Alimentos naturais Pesquisa Medicina Aditivos alimentares
Polímeros	Amido Ácido poli-beta-hidroxitirico - PHB Peptídeos Toxinas	Cosméticos Medicina
Produtos especiais	Isótopos Aminoácidos Esteróis	Pesquisa Medicina

Fonte: (Derner, Ohse *et al.*, 2006)

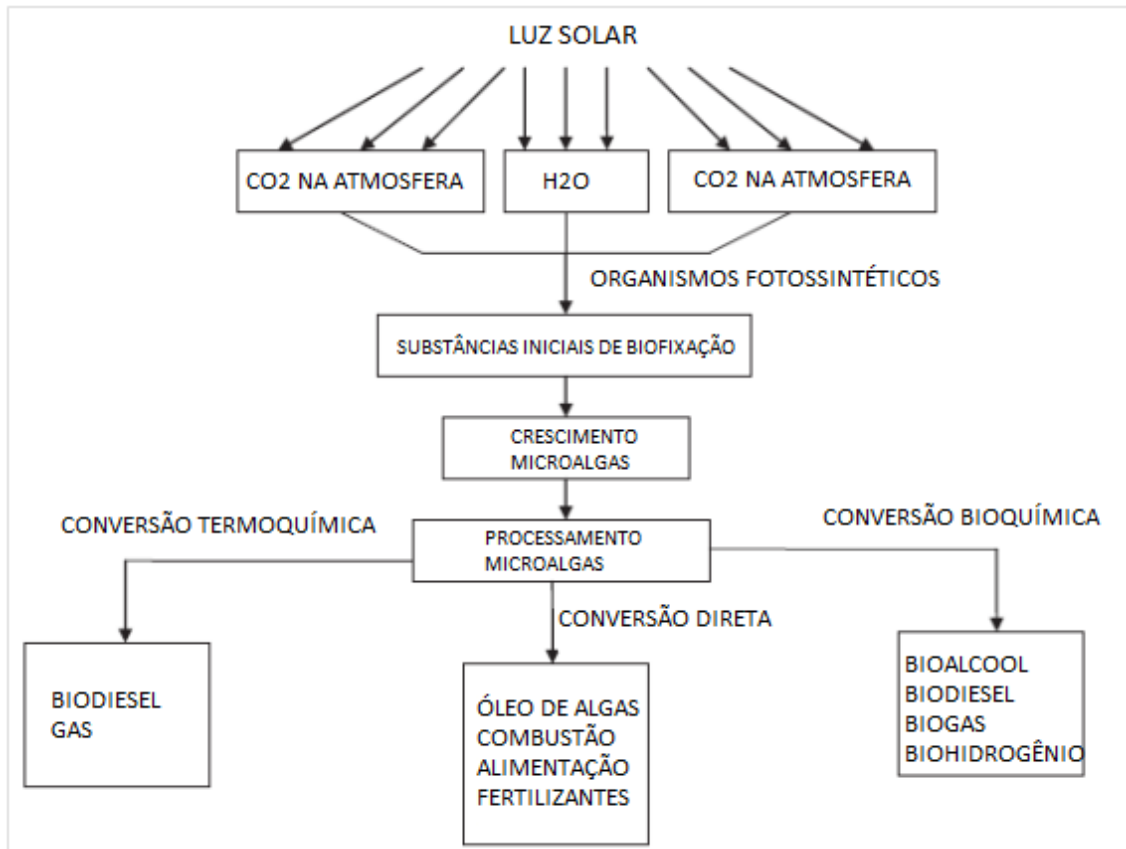


Figura 1: Principais etapas da produção de produtos de microalgas (Demirbas, 2011).

2.1.1 Meio de cultivo de Microalgas

Meio de cultivo pode ser definido como o ambiente específico que contém os nutrientes necessários ao desenvolvimento das microalgas em cultivo. No caso de algas e plantas vasculares, além do meio de cultura, a luz também é essencial para promover o desenvolvimento dos organismos. Isto decorre das características fotossintéticas dos mesmos.

A água do mar é um meio ideal para o crescimento da maioria das espécies de algas, mas é um meio extremamente complexo e contém dezenas de elementos químicos e um número grande de compostos orgânicos, porém, muitos elementos estão presentes em quantidades limitadas, e são insuficientes para proporcionar seu crescimento adequado. Desta forma, estudos de cultivos de microalgas envolvem o uso de água do mar suplementada com elementos químicos necessários em maiores concentrações. Existem três tipos de meios de cultura marinhos: meios de cultura definidos, os quais são preparados a partir de água de elevada pureza à qual são adicionados os sais constituintes da água do mar e os sais nutrientes que estimulam o crescimento, meios de cultura semidefinidos, os quais utilizam a água do

mar como matriz, a qual é enriquecida com nutrientes inorgânicos, de composição conhecida, e os meios de cultura indefinidos, os quais são feitos a partir de água do mar enriquecida com uma mistura não determinada de substâncias orgânicas e inorgânicas. (Lourenço, 2006).

Os sistemas de cultivo de microalgas podem ser rigidamente controlados e otimizados. Temperatura, pH, concentração de nutrientes, e de CO₂ podem ser monitorados de modo a produzir o máximo de biomassa. Luz, CO₂, e sais inorgânicos são indispensáveis. As microalgas convertem a energia da luz solar em energia química. Simultaneamente, CO₂ é fixado e transferido para compostos de carbono, como carboidratos, lipídeos e proteínas. Assim, a capacidade de captação de CO₂ reflete na biomassa da microalga (Zeng, Danquah *et al.*, 2011).

O meio de cultivo precisa fornecer nutrientes suficientes para o crescimento das microalgas. Para acumular diferentes produtos nas microalgas, formulações diferentes são requeridas. Os componentes mais desejáveis para a produção de biodiesel são os lipídeos, entretanto, alguns produtos de alto valor agregado são obtidos através de proteínas e ácidos graxos (Zeng, Danquah *et al.*, 2011). Cultivos intensos podem ser realizados também para outros fins, como a produção de microalgas para o aproveitamento de pigmentos. Carotenoides são pigmentos acessórios da fotossíntese, e podem ser aproveitados comercialmente como corantes de alimentos e rações, ou mesmo por propriedades especiais, como a atividade antioxidante ou fornecimento de matéria prima para a fotossíntese de outras substâncias importantes para as células como a vitamina A (Lourenço, 2006).

A avaliação da importância de dado nutriente envolve alguns critérios como a avaliação se a deficiência do mesmo impede o crescimento da alga ou que ela complete seu desenvolvimento vegetativo ou ciclo de vida, se não é possível que o elemento em foco seja substituído por outro e se existe um efeito direto do elemento sobre a alga, que não seja decorrente da interação com outros elementos químicos ou da interação biológica com outros organismos. Os macronutrientes são os elementos químicos necessários em concentrações na ordem de centenas ou milhares de µg.g⁻¹ de massa seca, os demais são chamados micronutrientes (Lourenço, 2006). A Tabela 2 apresenta alguns nutrientes e suas funções no cultivo de microalgas.

Tabela 2: Função dos nutrientes no cultivo de microalgas.

Nutriente	Ingredientes principais	Função	Range adequado
Fonte de carbono	CO ₂ , HCO ₃ ⁻ , CO ₃ ²⁻ , etc	Fornecer carbono	1-10 g.L ⁻¹

		para toda a célula	
Fonte de nitrogênio	NO_3^- , N_2 , uréia, AA, etc	Fornecer nitrogênio para toda a célula	10 - 2000 mg.L^{-1}
Fósforo	Hidrofosfato, Fosfato, etc	Fornecer fósforo para toda a célula	10-500 mg.L^{-1}
Enxofre	Sulfatos, etc	Fornecer enxofre para toda a célula	1-200 mg.L^{-1}
Sais inorgânicos	K, Ca, Na, Mg, etc	Manter a estrutura/atividade celular	0,1-100 mg.L^{-1}
Elementos traço	Fe, Zn, Mn, Pb, Cd, etc	Cofatores de enzima	0,01-10 mg.L^{-1}
Vitaminas	V_B , V_C , V_E , etc.	Ajudar na divisão celular	0,01-1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$

Fonte: (Zeng, Danquah *et al.*, 2011)

O nitrogênio é um macronutriente de fundamental importância em três classes de substâncias estruturais das células: proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos fotossintetizantes. O nitrogênio é encontrado nas mais diversas formas químicas na água do mar. O nitrogênio molecular (N_2) é o gás mais abundante na água do mar, mas somente algumas cianobactérias são capazes de utilizá-lo. O nitrato (NO_3^-) é a forma mais estável de nitrogênio presente na água do mar e é a forma mais utilizada pelo fitoplâncton. O nitrito (NO_2^-) é a forma mais tóxica, porém pode ser absorvida por microalgas se estiver presente em pequenas quantidades.

Sais de nitrato, sais de amônio e uréia são as principais formas de nitrogênio empregadas em meios de cultura. O uso de amônio como fonte de nitrogênio requer alguns cuidados, pois algumas espécies se mostram sensíveis a altas concentrações de amônia. Se o suprimento de nitrogênio é abundante, observa-se um aumento nas concentrações de proteínas e clorofilas nas células. Mais carotenoides e menos clorofilas são produzidas em culturas deficientes de nitrogênio (Lourenço, 2006). Para o crescimento de microalgas, no entanto, sabe-se que meios suplementados com sais de nitrogênio apresentam melhores resultados de crescimento de biomassa. Com suplementações de até 5 g.L^{-1} de sal, chega-se a um resultado de biomassa final de até 5 g.L^{-1} (Degen, Uebele *et al.*, 2001).

2.1.2 Microalgas como fontes de pigmentos

Existem três classes de pigmentos em algas, as clorofilas, os carotenoides e as ficobilinas. Destes, os carotenoides têm recebido atenção especial, pois clorofilas não apresentam grande valor comercial, e existem melhores matérias primas alternativas às microalgas. Já as ficobilinas apresentam importância na produção de corantes para alimentos industrializados (Lourenço, 2006). O uso de carotenoides como fontes de pigmentos mostrou-se viável a partir dos anos 1980, após pesquisas intensivas a respeito do assunto, e especula-se que o uso de carotenoides pode contribuir para tornar a produção de biodiesel a partir de microalgas economicamente viável (Vilchez, Forjan *et al.*, 2011). Há cerca de 400 carotenoides existentes na natureza, mas apenas alguns são utilizados comercialmente: β -caroteno, astaxantina, e, com menor importância, luteína, zeaxantina, licopeno e bixina (Lourenço, 2006). A Figura 2 mostra a estrutura de alguns dos principais carotenoides.

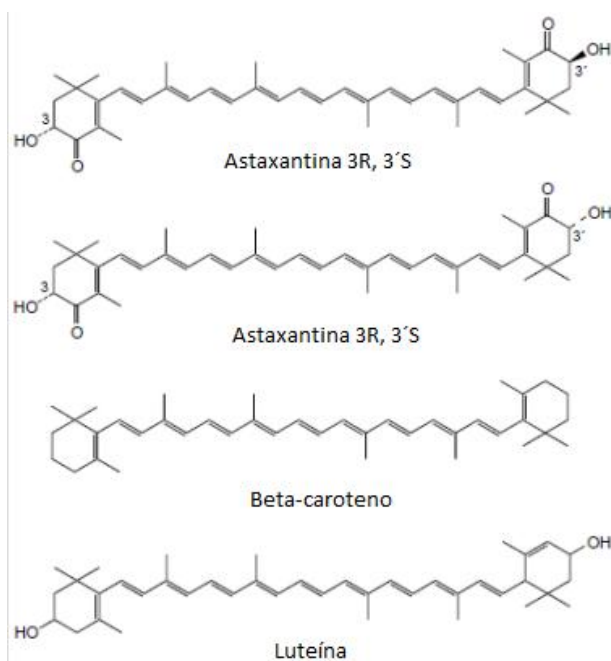


Figura 2: Estrutura de alguns carotenoides (Guerin, Huntley *et al.*, 2003)

Em organismos fotossintéticos, incluindo plantas e microalgas, os carotenoides contemplam diversas funções importantes. Essencialmente, os carotenoides podem ser pigmentos acessórios na captação de luz durante a fotossíntese e também são capazes de proteger a estrutura fotossintética do excesso de luz através da eliminação das espécies reativas de oxigênio como oxigênio molecular singlete e outros radicais livres. Em humanos,

as funções biológicas mais relevantes dos carotenoides estão ligadas às propriedades antioxidantes dos mesmos (Vilchez, Forjan *et al.*, 2011). A alimentação suplementada com carotenoides está relacionada com a diminuição no risco de doenças degenerativas, inflamações, envelhecimento, aumento da atividade do sistema imunológico (Guerin, Huntley *et al.*, 2003), melhoria no tratamento de lesões musculares e redução de cólicas menstruais (Lourenço, 2006). As principais funções biológicas dos carotenoides e seus benefícios à saúde humana estão listados na Tabela 3.

Tabela 3: Funções biológicas, benefícios à saúde e aplicações dos principais carotenoides.

Carotenóide	Função e benefícios à saúde
Licopeno	Hiperlasia prostática e câncer de próstata Prevenção da esclerose e síndrome coronária crônica e aguda
B-Caroteno	Vitamina A Câncer colorretal Prevenção da esclerose e síndrome coronária crônica Proteção da pele contra raios UV
Astaxantina	Hiperlasia prostática benigna e tumores de próstata e fígado Propriedades antiinflamatórias
Zeaxantina	Contra neoplasias de fígado Prevenção da síndrome coronária crônica e aguda Prevenção da catarata Prevenção da degeneração macular associada ao envelhecimento
Luteína	Prevenção da síndrome coronária crônica e aguda, e acidente vascular cerebral Ajuda a manter uma visão normal Prevenção da catarata Prevenção da degeneração macular associada ao envelhecimento Evita a infecção gástrica causada pela <i>H. Pylori</i>

Fonte: (Vilchez, Forjan *et al.*, 2011)

Uma das funções mais importantes dos carotenoides no corpo humano é a sua habilidade de se converter a retinol (função provitamina A), função que aproximadamente 10% dos carotenoides existentes na natureza possui. A vitamina A é reconhecida como um fator de grande importância na saúde e sobrevivência de crianças, e a sua deficiência pode

causar problemas de visão e outros problemas relacionados ao pulmão, traquéia e doenças na cavidade oral. Animais e humanos não sintetizam carotenoides mas são capazes de convertê-los em vitamina A. A dieta é a única fonte destes carotenoides com função provitamina A, sendo frutas, vegetais e microalgas, os principais fornecedores dos mesmos (Vilchez, Forjan *et al.*, 2011).

Radicais livres são formas reativas do oxigênio produzidas no corpo humano durante a atividade metabólica. O estresse, poluição do ar, fumaça do cigarro, exposição a produtos químicos e exposição à radiação ultravioleta podem aumentar a produção de tais agentes. Radicais livres podem danificar o DNA, proteínas e a membrana lipídica (Guerin, Huntley *et al.*, 2003). Do ponto de vista nutricional, um antioxidante pode ser definido como qualquer substância presente nos alimentos que reduz significativamente os efeitos das formas reativas de oxigênio nas condições normais humanas. Eles também ajudam a prevenir a produção em cadeia de radicais livres provenientes da degradação de ácidos graxos poli-insaturados. Antioxidantes, em particular carotenoides, são essenciais à saúde, por causa da sua ação protetora nos componentes celulares contra o dano oxidativo (Vilchez, Forjan *et al.*, 2011).

Carotenoides produzidos naturalmente através do cultivo de microalgas representam apenas uma parcela do mercado mundial. Uma vez denominado o processo, a síntese dos carotenoides envolve custos menores e elimina a necessidade de realização de cultivos para a obtenção de biomassa. Esta característica acarreta em um menor preço de venda dos carotenoides sintéticos. A Tabela 4 mostra a diferença de preço dos carotenoides β -caroteno e astaxantina obtidos de matéria prima natural e de forma sintética.

Tabela 4: Comparação entre fontes microbianas e sintéticas de carotenoides.

Molécula	Origem	Preço (US\$)
β -caroteno	<i>Dunaliella</i>	300 - 3 000/kg
	Sintético	200/kg
Astaxantina	<i>Haematococcus</i>	3 000/kg
	Sintético	2 500/kg

Fonte: (Lourenço, 2006)

Apesar da grande diferença de preço entre as duas fontes, dois fatores contribuem para a continuidade dos cultivos de microalgas para a produção de carotenoides. O fator mais importante seria as propriedades diferenciadas dos isômeros produzidos. Para o β -caroteno, somente a forma *trans* da molécula pode ser produzida sinteticamente. Já na substância

natural, há mistura dos isômeros, e acredita-se que esta mistura acarreta em uma atividade biológica mais acentuada (Lourenço, 2006). Ademais, carotenoides naturalmente extraídos estão aumentando sua popularidade devido a uma grande parcela da população que prefere consumir produtos naturais (Vilchez, Forjan *et al.*, 2011), e os consumidores que se enquadram neste perfil estão dispostos a pagar mais caro por produtos de procedência natural.

A principal espécie utilizada para acumular β -caroteno é a *Dunaliella salina*. A forma consagrada de produção da mesma é o cultivo extensivo. Neste, o cultivo se divide em 2 etapas. Na primeira, a microalga é estimulada a crescer num meio de cultura com concentrações normais de nutrientes, mas preparado com alta salinidade, visto que a *Dunaliella salina* apresenta alta tolerância neste sentido. Isto resulta da sua capacidade de produzir glicerol, que funciona como substância osmorreguladora que equilibra osmoticamente a microalga com o meio. Nesta fase o crescimento da microalga é estimulado. Na fase seguinte, a salinidade é aumentada, e é retirado o nitrogênio disponível. Nestas condições de estresse salino e deficiência de nitrogênio, a síntese de carotenoides é fortemente estimulada, com predomínio da formação de β -caroteno, que pode chegar a representar 14% da massa seca da microalga (Lourenço, 2006).

2.1.3 Geração de Biodiesel a partir de Microalgas

Combustíveis fósseis contribuem com 80% do total da energia consumida no mundo. Dependendo da produção e da demanda exigida, as reservas conhecidas de petróleo podem durar de 41 a 700 anos. Por não serem renováveis e finitos, os combustíveis fósseis trazem preocupação e, juntamente com a necessidade de atuar para parar as mudanças climáticas, levaram a um crescente interesse por energias renováveis como biocombustíveis (Koh e Ghazoul, 2008).

O presente século foi testemunha de uma grande enfase no uso de biomassa como alternativa ao uso de combustíveis fósseis em função da sua natureza renovável e emissão de CO₂ reduzida. A biomassa está entre as mais promissoras matérias primas para produção de energias renováveis, podendo ser sustentável, benigna ao meio ambiente e economicamente viável. Além disto, pode fornecer calor, energia e combustíveis para transporte sem afetar o meio ambiente, e reduzindo gases de efeito estufa na atmosfera (Phukan, Chutia *et al.*, 2011). Muitos países desenvolvidos como Estados Unidos e em rápido desenvolvimento como a China veem os biocombustíveis como solução para reduzir a dependência do petróleo

estrangeiro e como forma de reduzir emissões de gases de efeito estufa como CO₂ e CH₄, além de ser um jeito de incentivar o desenvolvimento rural, uma vez que a matéria prima provém da biomassa.

O interesse no uso de microalgas para produção de energia renovável teve grande aumento nos anos 1970 durante a primeira crise do petróleo, quando o Laboratório Nacional de Energias Renováveis dos Estados Unidos (NREL) lançou através do Programa de Espécies Aquáticas (ASP), um programa específico dedicado a energias renováveis, incluindo biodiesel a partir de microalgas, que durou de 1978 a 1996. Um dos principais objetivos deste programa era estudar a bioquímica e fisiologia da produção de lipídeos em microalgas oleaginosas. Entre 1987 e 1990, um teste ao ar livre foi realizado em 2 tanques de 1.000 m² em Roswell, no México. Ao fim dos testes, foi concluído que a produção era de fato factível, mas que ainda seriam necessários estudos para se chegar a um alto nível de produtividade. Contudo, em 1995 o Departamento de Energia dos Estados Unidos diminuiu a verba alocada para tais projetos, e o mesmo acabou sendo descontinuado. A recente volatilidade no preço do petróleo e as expectativas de aumento de preço do petróleo no futuro, aliadas a necessidade de redução de emissão de poluentes, incentivaram um novo interesse na produção de biodiesel usando microalgas (Mata, Martins *et al.*, 2010).

Por um lado, uma das maiores desvantagens do uso de microalgas para produção de biodiesel é a baixa concentração de massa no cultivo devido à dificuldade de penetração da luz que, combinado com o pequeno tamanho das células das algas, faz com que a extração da biomassa da alga seja relativamente cara. Os grandes investimentos iniciais e a necessidade de cuidado intensivo fazem com que a fazenda de microalgas, se comparada com uma fazenda convencional, seja muito mais cara, o que ainda impede a implementação comercial dos cultivos atualmente.

Por outro lado, em função de seu rápido crescimento, alto rendimento, de poder ser cultivadas em regiões áridas e sem grande valor comercial (Chisti, 2007), além de consumir menos água em seu cultivo (Demirbas, 2011), as microalgas tornam-se a única matéria prima viável para total substituição total de combustíveis fósseis por biodiesel. Por exemplo, para substituir todo o combustível fóssil utilizado para transporte nos Estados Unidos, seriam necessários 530 milhões de m³ de biodiesel anualmente, levando-se em conta a atual demanda. Oleaginosas, gordura animal, e óleo de cozinha usado não poderiam realisticamente satisfazer esta demanda. Para substituir apenas metade dos 530 milhões de m³ já seriam

necessárias áreas de cultivo insustentáveis e inviáveis do ponto de vista econômico, como pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5: Comparação de algumas fontes de biodiesel.

Matéria prima	Rendimento de óleo (L/ha)	Área necessária (M ha) ^a	% da terra cultivável dos EUA ^a
Milho	172	1540	846
Soja	446	594	326
Canola	1190	223	122
Coco	2689	99	54
Óleo de Dendê	5950	45	24
Microalga ^b	136,9	2	1,1
Microalga ^c	58,7	4,5	2,5

^a Para produção de 50 % de todo o combustível fóssil utilizado para transporte nos Estados Unidos.

^b 70 % de óleo em biomassa.

^c 30 % de óleo em biomassa.

Fonte: (Chisti, 2007).

Se o óleo de dendê fosse utilizado para produção total de biodiesel, 24% das terras cultiváveis dos Estados Unidos teriam que ser dedicadas exclusivamente para o plantio do dendê para substituir somente metade do total de combustíveis utilizados hoje para transporte nos Estados Unidos. Obviamente, as oleaginosas podem contribuir significativamente para substituição gradual de petróleo como matéria prima para os combustíveis, mas não de maneira total. Este cenário muda totalmente quando se considera microalgas como outra fonte de biomassa. Em comparação com o óleo de dendê, microalgas ocupariam somente de 1 a 3% das terras cultiváveis americanas para produzir os mesmos 50 % do combustível utilizado para transporte no país (Chisti, 2007). A Tabela 6 evidencia as vantagens e desvantagens do cultivo de microalgas para produção de biodiesel em comparação com cultivos de fazenda.

As microalgas para produção de biodiesel poderiam usar parte do CO₂ proveniente de plantas industriais. Deste ponto de vista, microalgas podem ser vistas como simples sequestradoras de CO₂ para serem usadas no controle das emissões de gases de efeito estufa. Assim, o potencial de contribuição das microalgas na produção em larga escala de biodiesel fica evidente (Converti, Casazza *et al.*, 2009).

Tabela 6: Vantagens e desvantagens do uso de microalgas para produção de biodiesel.

Vantagens	Desvantagens
Alta taxa de crescimento	Baixa concentração de biomassa
Menor demanda por água	Maiores investimentos de capital
Alta eficiência na absorção de CO ₂	
Cultivo de maior custo benefício	

Fonte: (Demirbas, 2011)

Todos os processos de produção de biodiesel a partir de microalgas incluem uma unidade de produção onde as células crescem, seguidas de uma separação das células do substrato e subsequente extração de lipídeos. Então, o biodiesel é produzido de forma semelhante aos processos existentes e tecnologias utilizadas para produção a partir de outras matérias primas (Mata, Martins *et al.*, 2010): o biodiesel é produzido a partir de óleo vegetal e gordura animal, os quais consistem em triglicerídeos, sendo estes compostos de 3 cadeias de ácidos graxos unidos por uma molécula de glicerol. O processo de biodiesel substitui o glicerol por metanol, formando ésteres metílicos de ácidos graxos, o chamado biodiesel. O subproduto glicerol pode ser separado do biodiesel por processos de separação de fases. Este processo é chamado transesterificação, que substitui o metanol por glicerol em uma reação química, usando um ácido/alcalino como catalisador (Koh e Ghazoul, 2008). A Figura 3 mostra as reações envolvidas no processo de esterificação, onde R1, R2, e R3 representam hidrocarbonetos de cadeias longas, como ácidos graxos (Mata, Martins *et al.*, 2010). Recentemente, estão sendo estudados outros mecanismos alternativos a transesterificação, como por exemplo, craqueamento térmico (ou pirólise), que envolve a decomposição térmica ou clivagem dos triglicerídeos e outros compostos orgânicos presentes na matéria prima em moléculas mais simples, como alcanos, alquenos, aromáticos, ácidos carboxílicos, entre outros. A Figura 4 mostra uma representação dos estágios da cadeia de produção de biodiesel a partir de microalgas, da seleção das microalgas, até a extração de óleo (Mata, Martins *et al.*, 2010).

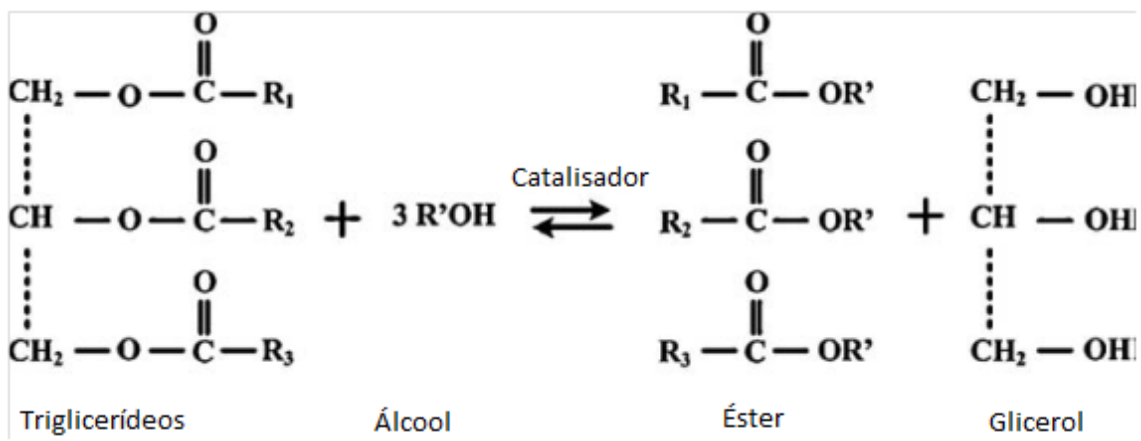


Figura 3: Reação de transesterificação (Mata, Martins *et al.*, 2010)

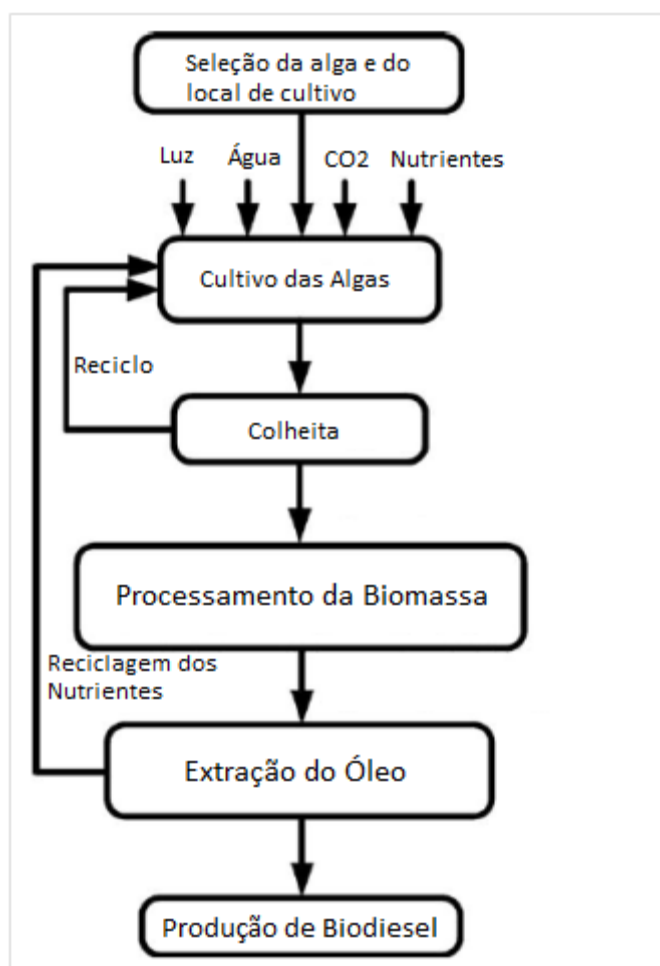


Figura 4: Estágios da cadeia de produção de biodiesel a partir de microalgas (Mata, Martins *et al.*, 2010).

2.2 Fotobiorreatores

Atualmente, muitas pesquisas estão sendo direcionadas ao estudo da unidade de cultivo das algas. Em muitos casos, esta unidade representa um elemento chave para se

determinar a viabilidade econômica do processo. Enquanto no passado microalgas eram geralmente cultivadas em águas naturais (lagos, lagoas, entre outros) ou tanques abertos, atualmente está cada vez mais em evidência o cultivo em fotobiorreatores (FBR) fechados. Os sistemas abertos, geralmente são localizados em áreas externas, e dependem da iluminação natural. Apesar de serem sistemas de baixo custo de instalação e operação, sistemas abertos enfrentam muitos problemas: a cultura não é estéril, assim, pode sofrer ataques de contaminantes que podem competir com o crescimento das algas, além disto, predadores como rotíferos, podem dizimar a cultura, e o clima pode causar variações bruscas na iluminação e dificuldade no controle de nutrientes e CO₂. Fotobiorreatores fechados, por outro lado, são utilizados para culturas esterilizadas de microalgas. Uma comparação entre sistemas abertos e fechados está apresentada na Tabela 7.

Tabela 7: Comparação entre sistemas abertos e fechados para microalgas.

	Sistemas abertos	Sistemas fechados
Risco de contaminação	Alto	Baixo
Perdas de CO ₂	Alto	Baixo
Perdas em evaporação	Alto	Baixo
Eficiência em uso de luz	Pobre	Excelente
Relação área/volume	Baixo	Alto
Área requerida	Alto	Baixo
Controle do processo	Difícil	Fácil
Produtividade da biomassa	Baixo	Alto
Custos de investimento	Baixo	Alto
Custos de operação	Baixo	Alto
Custos de colheita	Alto	Relativamente baixo
Scale up	Fácil	Difícil

Fonte: (Xu, Weathers *et al.*, 2009)

Fotobiorreatores são sistemas flexíveis que podem ser otimizados de acordo com as características fisiológicas e biológicas das microalgas do cultivo, o que permite o cultivo de qualquer espécie em qualquer localidade. Dependendo das condições locais e materiais disponíveis, é possível construir sistemas de cultivo diferentes que variam de tamanho, forma, materiais de construção, inclinação, agitação, o que influenciará seu desempenho, custo e durabilidade. Alguns fatores que contribuem para a baixa produtividade em fotobiorreatores

não adequados são o acúmulo de O₂ que inibe o crescimento, consumo de biomassa pela respiração em zonas escuras do FBR, mistura insuficiente entre o dióxido de carbono e os nutrientes, e fotoinibição em zonas intensamente iluminadas (Degen, Uebele *et al.*, 2001).

Em FBRs, o contato entre as células de cultivo e gases e/ou contaminantes é limitado, ou inexistente (Mata, Martins *et al.*, 2010). Fotobiorreatores têm sido utilizados de maneira eficiente para produzir grandes quantidades de biomassa a partir de microalgas, e os seus diferentes projetos incluem tubo horizontal ou serpentina, placa plana, coluna de bolhas, coluna *airlift*, entre outros (Xu, Weathers *et al.*, 2009).

2.2.1 Reatores tubulares

Fotobiorreatores totalmente fechados são bastante atrativos para cultivos axênicos em larga escala, e é um dos *designs* mais utilizados em sistemas ao ar livre. FBRs tubulares consistem em um conjunto de tubos transparentes dispostos de maneira reta, enrolada ou em *loop*. As microalgas circulam através dos tubos através de bombeamento ou tecnologia *airlift*. O uso de dispositivos *airlift* apresenta algumas vantagens. Permite trocas de CO₂ e o O₂ entre o meio líquido e o gás de aeração, minimiza os riscos de danos celulares associados ao bombeamento mecânico, e a circulação é obtida sem partes móveis nos FBRs (Xu, Weathers *et al.*, 2009).

Um fotobiorreator tubular com sistema *airlift* é mostrado na Figura 5. A coluna *airlift* faz o cultivo circular através do coletor solar onde a maior parte da fotossíntese ocorre. O oxigênio produzido fotossinteticamente se acumula no caldo até que o fluido retorne à zona do *airlift* onde este oxigênio acumulado é despojado no ar. Uma coluna separadora gás-líquido na parte superior da coluna *airlift* evita a recirculação de bolhas de gás no coletor solar. O coletor solar em *loop* é projetado para coletar de maneira eficiente a luz solar, minimizar a resistência à vazão e ocupar menor espaço possível (Molina, Fernandez *et al.*, 2001). O diâmetro dos tubos é limitado (geralmente 0,1 m). O aumento excessivo no diâmetro dos tubos leva a uma diminuição na relação superfície/volume, e esse fator tem grande impacto no cultivo. Ao crescer e aumentar em densidade, as algas tendem a sombrear umas às outras e isso resulta numa redução na relação biomassa/unidade de luz incidente (Xu, Weathers *et al.*, 2009).

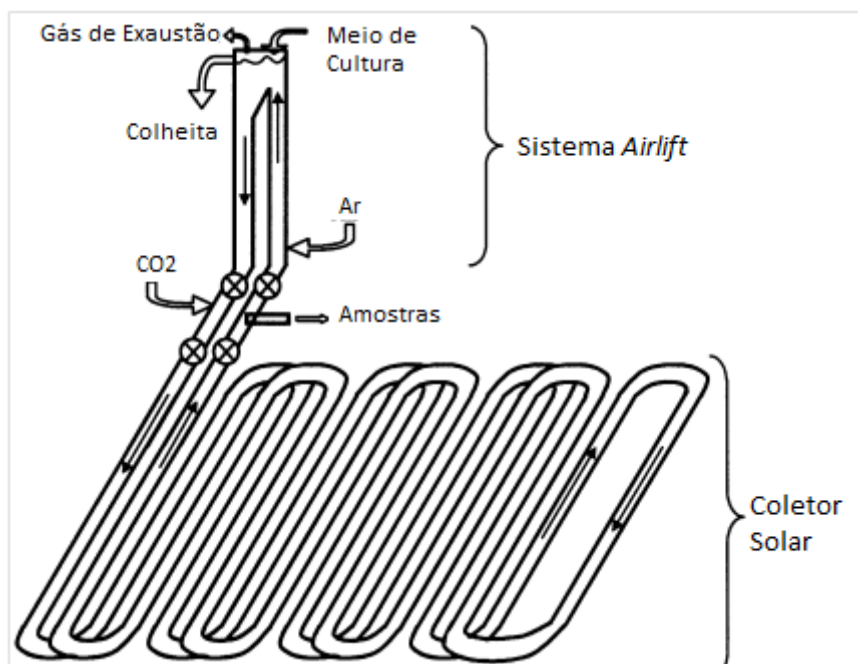


Figura 5: Fotobiorreator tubular com sistema *airlift* (Molina, Fernandez *et al.*, 2001).

Por outro lado, o comprimento do tubo pode ser utilizado como fator de ampliação de escala para reatores tubulares. Como mencionado anteriormente, um aumento no diâmetro não é desejável, entretanto, também existem limitações no aumento do comprimento dos tubos. Tubos muito longos permitem que o O_2 produzido na fotossíntese acumule excedendo a saturação do ar, o que pode inibir a realização da fotossíntese. Concentrações de O_2 acima de 35 mg.L^{-1} também mostram-se tóxicas para a maior parte das microalgas (Xu, Weathers *et al.*, 2009). Recentemente, sistemas tubulares para produção de altas concentrações de biomassa se tornaram comerciais, mas eles apresentam um investimento inicial bastante alto (Zhang, Zmora *et al.*, 2001).

2.2.2 Reatores de placa plana

Os FBRs de placa plana têm o *design* mais robusto. Embora venham sendo largamente utilizado ao longo dos últimos anos, recentes estudos de caracterização destes reatores têm trazido resultados positivos (Posten, 2009). Comparados a fotobiorreatores tubulares, os FBRs de placa plana apresentam algumas vantagens no que diz respeito ao seu tamanho. Suas placas estreitas podem ocupar menos espaço e a espessura das paredes pode ser menor do que as

paredes de um FBR tubular. Há entrada de ar via tubo perfurado no fundo do reator. As placas têm a vantagem de poder ser dispostas tanto horizontalmente como verticalmente.

Fotobiorreatores de placa plana são usados para produção de biomassa de microalgas tanto em sistemas ao ar livre como em sistemas *indoor*, pois apresenta vantagens incluindo alta área superficial de iluminação, baixo acúmulo de O₂ dissolvido, e facilidade de escalonamento (Xu, Weathers *et al.*, 2009).

A Figura 6 representa um modelo possível de fotobiorreator de placa plana.

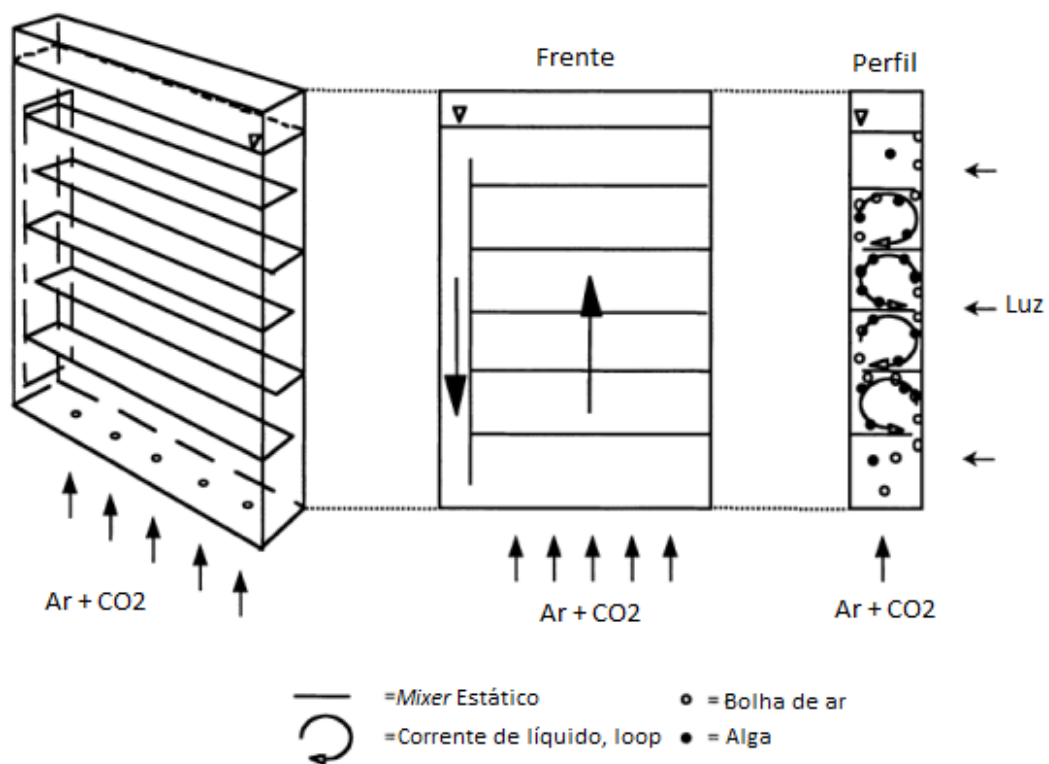


Figura 6: Fotobiorreator *airlift* de placa plana (Degen, Uebele *et al.*, 2001).

O controle da temperatura pode ser um problema neste tipo de reator. Geralmente são usados sistemas de asperção para refrigeração através da evaporação. Estudos mais recentes apontam trocadores de calor no interior do FBR como uma alternativa viável (Sierra, Acien *et al.*, 2008).

2.2.3 Fotobiorreatores *airlift* e Coluna de Bolhas

Fotobiorreatores *airlift* e coluna de bolhas são dispositivos simples que são geralmente utilizados em bioprocessos, tratamento de efluentes líquidos e indústria de processos

químicos. Estes FBRs de coluna vertical são compactos, de baixo custo e de fácil operação. Estes reatores providos de agitação pneumática atendem ao requisito de coeficiente de transferência de massa de 0.006 s^{-1} e velocidade de circulação de líquido em uma demanda de energia relativamente baixa para cultivos de microalgas (Xu, Weathers *et al.*, 2009).

FBRs *airlift* são compostos de quatro zonas distintas, e cada uma tem seu padrão de vazão. A primeira zona é denominada *riser*, pois a dispersão gás-líquido viaja para cima em contracorrente. O líquido que deixa o topo do *riser* entra numa zona de retirada do gás, chamada de separador gás-líquido, onde, dependendo do *design* específico do FBR, parte ou todo o gás disperso é removido. O líquido sem gás (ou com uma pequena fração de gás), então flui dentro da terceira zona, o *downcomer* e viaja até a base do equipamento através da quarta e última zona, a base, onde ele entra novamente no *riser* (Znad, Bales *et al.*, 2004).

Fazendo-se uma comparação entre o sistema *airlift* e o sistema coluna de bolhas, observa-se que o sistema *airlift* produz padrões de fluxo, que leva as células da parte mais escura do FBR (*riser*) para a zona mais clara (*downcomer*). Sendo assim, as células na coluna de bolhas podem residir em alta ou baixa intensidade de luz por um longo tempo sem circulação, ocorrendo uma decantação das células. Considerando-se uma alta taxa de transferência de massa e baixos custos em energia, alguns FBRs coluna de bolhas são equipados com uma membrana difusora de borracha que aumentam a transferência de massa dos gases, fornecendo CO_2 e removendo O_2 . O tamanho das bolhas, entretanto, é fator limitante para minimizar o dano às células de microalgas (Xu, Weathers *et al.*, 2009).

3. Materiais e Métodos

3.1 Fotobiorreatores

Para realização deste trabalho, foram utilizados seis fotobiorreatores de placa do tipo *airlift* com *loop* externo feitos de acrílico, providos de camisa interna de aquecimento ou resfriamento conectadas a banhos térmicos, o que manteve a temperatura dos reatores em 28 °C durante todo o experimento. Esta temperatura ótima já havia sido definida em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa (Fré, 2011). Os reatores possuem um volume útil de 2,2 L, sendo as dimensões do mesmo: altura, 45 cm; largura, 10,8 cm; profundidade, 8 cm. **A Erro! Fonte de referência não encontrada.** representa os FBRs utilizados.



Figura 7: Representação dos fotobiorreatores utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

Para realizar a assepsia dos reatores, os mesmos foram preenchidos com água e uma solução comercial de hipoclorito de sódio (2,5%). Após 15 minutos foram adicionados 2,5 mL de uma solução de tiosulfato de sódio 250 g.L⁻¹ para realizar a neutralização do cloro. Após alguns minutos, esta solução foi descartada e os reatores preenchidos com o 2 L meio de cultivo estéril.

Os fotobiorreatores foram aerados com vazão de 0,5 L.min⁻¹ de ar comprimido filtrado com membrana de 0,22 µm Midisart®2000 da Sartorius Stedim Biotech, controlada por

rotâmetro. Foram utilizadas duas pedras porosas conectadas às mangueiras de aeração para distribuição uniforme da vazão de ar no reator.

Os seis fotobiorreatores foram iluminados continuamente por um painel de lâmpadas eletrônicas a 18,0 klx, iluminação ótima definida em experimentos anteriores do grupo de pesquisa (Redaelli, Kochem *et al.*, 2011).

3.2 Condições de cultivo

As espécies de algas testadas foram a *Chlorella* sp e a *Dunaliella tertiolecta*. O meio de cultivo utilizado nos reatores foi o meio Guillard - "f/2" (Lourenço, 2006) modificado o qual utiliza água do mar artificial contendo por litro: 34 g de sal marinho (Red Sea), 30 mg de silicato de sódio, 1 mL de solução de metais-traço, 1 mL de solução de vitaminas e 1 mL de solução-tampão de pH. A solução de metais-traço contém: 9,8 mg.L⁻¹ de CuSO₄.5H₂O (sulfato de cobre pentahidratado), 22 mg.L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O (sulfato de zinco heptahidratado), 1 mg.L⁻¹ de CoCl₂.6H₂O (cloreto de cobalto hexahidratado), 180 mg.L⁻¹ de MnCl₂.4H₂O (cloreto de manganês tetrahidratado), 6,3 mg.L⁻¹ de Na₂MoO₄.2H₂O (molibdato de sódio dihidratado), 4,36 g.L⁻¹ de Na₂EDTA (sal bi-sódico de ácido etilenodiaminotetracético) e 3,15 g.L⁻¹ de FeCl₃.6H₂O (cloreto férrico hexahidratado). A solução de vitaminas contém: 100 mg.L⁻¹ de tiamina, 0,5 mg.L⁻¹ de cianocobalamina e 0,5 mg.L⁻¹ de biotina. A solução tampão de pH mantém o pH entre 6 e 7 e foi feita com 50 g de TRIS, aproximadamente 30 mL de ácido e água destilada, sendo o volume total da solução de 200 mL. Para a espécie *D. tertiolecta* ainda foi adicionado um suplemento de 17,5 g.L⁻¹ de NaCl (cloreto de sódio), pois, conforme já havia sido definido em experimentos anteriores do grupo, a espécie apresenta melhor crescimentos em ambientes com altas concentrações salinas. O meio de cultivo foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos. A solução de vitaminas foi esterilizada por microfiltração e adicionada após o resfriamento do meio de cultivo.

Além disto, em razão do objetivo do experimento, testar as diferentes fontes de nitrogênio no cultivo, foi fixado o número de mols de nitrogênio em 0,05 mol.L⁻¹ para todos os reatores, baseando-se na literatura que indica que meios suplementados com esta quantidade de mols de nitrogênio tendem a ter maior crescimento de biomassa, chegando a até 5 g.L⁻¹ de biomassa (Degen, Uebele *et al.*, 2001), enquanto que em cultivos no meio padrão f/2 Guillard, atinge-se geralmente em torno de 0,35 g.L⁻¹ de biomassa. Assim foram definidas as quantidades de cada nitrato nos reatores.

A escolha dos diferentes nitratos deu-se a partir da revisão de literatura. Nos artigos pesquisados, alguns autores utilizaram suplementação com nitrato de potássio (KNO_3) (Degen, Uebele *et al.*, 2001; Zhang, Zmora *et al.*, 2001), outros, nitrato de sódio (NaNO_3) (Dayananda, Sarada *et al.*, 2007). A tentativa de utilizar nitrato de amônio (NH_4NO_3) veio a partir da ideia de se utilizar microalgas no tratamento de efluentes. Como muitos efluentes apresentam amônio entre seus contaminantes, foi testado se as microalgas poderiam crescer em um meio contaminado com o mesmo.

Os reatores foram numerados de 1 a 6, sendo que nos reatores 1 e 2 foi adicionado 2 g.L^{-1} de nitrato de amônio (NH_4NO_3), nos reatores 3 e 4 foi adicionado $4,25 \text{ g.L}^{-1}$ de nitrato de sódio (NaNO_3) e nos reatores 5 e 6 foi adicionado $5,05 \text{ g.L}^{-1}$ de nitrato de potássio (KNO_3). Assim, o teste foi realizado em duplicata.

Para inocular cada reator, 10 mL de algas foram retirados do banco de algas e inoculados em 100 mL de meio de cultivo estéril em frasco cônico de 500 mL, os quais foram colocados em incubadora com agitação orbital de 90 rpm, na temperatura de 28°C , com iluminação constante por lâmpadas eletrônicas totalizando a 7,5 klx. Após sete dias, foram adicionados mais 100 mL de meio de cultivo estéril. Após mais uma semana, os pré-inóculos foram considerados prontos para o experimento. Assim, após introdução de 2L de meio de cultivo estéril de Guillard – “f/2” em cada reator, foram adicionados o pré-inóculos.

3.3 Acompanhamento do crescimento

A temperatura dos reatores foi monitorada diariamente através de termômetros os quais foram introduzidos no meio de cultivo. A intensidade luminosa foi monitorada através de luxímetro digital MS6610 da Akso. O pH foi monitorado através de fita indicadora de pH Merck. O tempo total de cultivo foi de aproximadamente 96 horas.

O crescimento das algas foi monitorado através da medida de densidade ótica da cultura a 570 nm medida em espectrofotômetro Amersham Biosciences modelo Ultrospec 3100 pro e relacionada com biomassa (X) por medida de peso-seco. Pequenas alíquotas de aproximadamente 2 mL eram retiradas dos reatores duas vezes ao dia, totalizando 10 medidas de densidade ótica para cada reator. A curva padrão, da biomassa relacionada com a densidade ótica para a *D.tertiolecta* já havia sido realizada em experimentos anteriores do grupo e apresentou comportamento:

$$X (g \times L^{-1}) = 0,5773 \times OD_{570nm} \quad R^2 = 0,9976$$

A curva para a *Chlorella* sp foi realizada durante este experimento e apresentou comportamento:

$$X (g \times L^{-1}) = 0,697 \times OD_{570nm} \quad R^2 = 0,9839$$

Durante o cultivo também foram retiradas amostras para análise de pigmentos (carotenoides) para a espécie *Chlorella* sp. Amostras de 1 mL foram retiradas em pipeta LABMATE soft HTL Lab Solutions de 1 mL, colocadas em eppendorfs de 2 mL e centrifugadas em centrífuga MSE microcentaur Sanyo. Assim, o sobrenadante foi separado dos pigmentos, e as amostras congeladas. Para a análise de pigmentos, as amostras foram descongeladas, e 2 ml de acetona 90% foram adicionados às amostras, posteriormente, as amostras foram submetidas a um vórtex. Os frascos com amostra e acetona foram colocados em local escuro à temperatura de 4 °C por 12 horas. Após transcorrido este tempo, as amostras foram centrifugadas e, em cubetas de vidro, foram lidas absorvâncias (OD) nos comprimentos de onda de 750, 510 e 480 nm. As absorvâncias foram relacionadas à quantidade de carotenoides através da seguinte equação (Lourenço, 2006):

$$C = 7,6 \times OD_{480nm} - 3 \times OD_{750nm} - 1,49 \times OD_{510nm} - 2 \times OD_{750nm}$$

Depois de coletados os resultados de biomassa e carotenoides, foi feita uma análise estatística de variância, e posteriormente teste de Tukey para validação dos resultados. Para tais análises, foi utilizado o *software* STATISTICA versão 10.0 da StatSoft inc.

4. Resultados e Discussão

4.1 Cultivo *Chlorella* sp

As curvas de crescimento em biomassa e de biomassa final da *Chlorella* sp sob diferentes fontes de nitrato estão representadas na Figura 8 e na Figura 9, respectivamente.

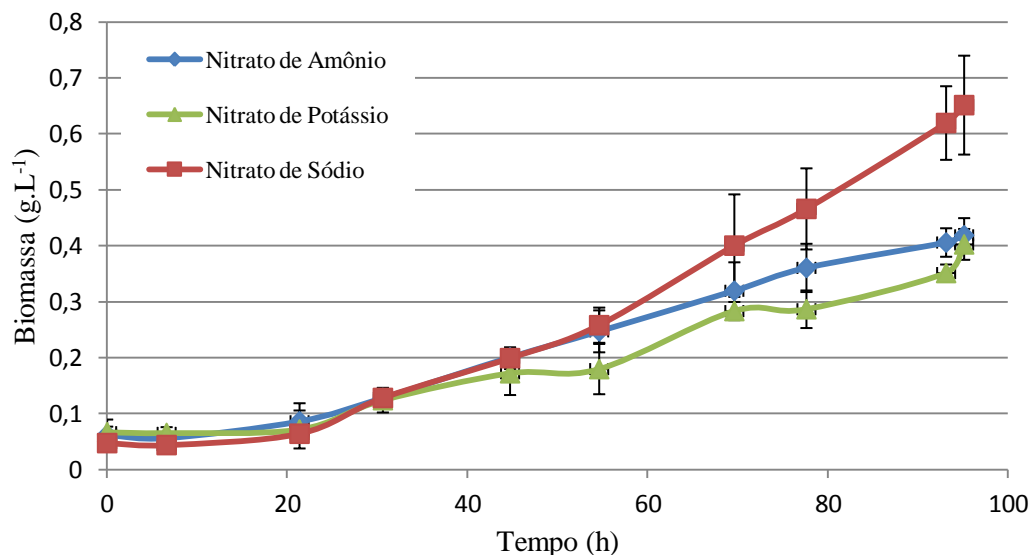


Figura 8: Curva de crescimento de biomassa versus tempo para a *Chlorella* sp.

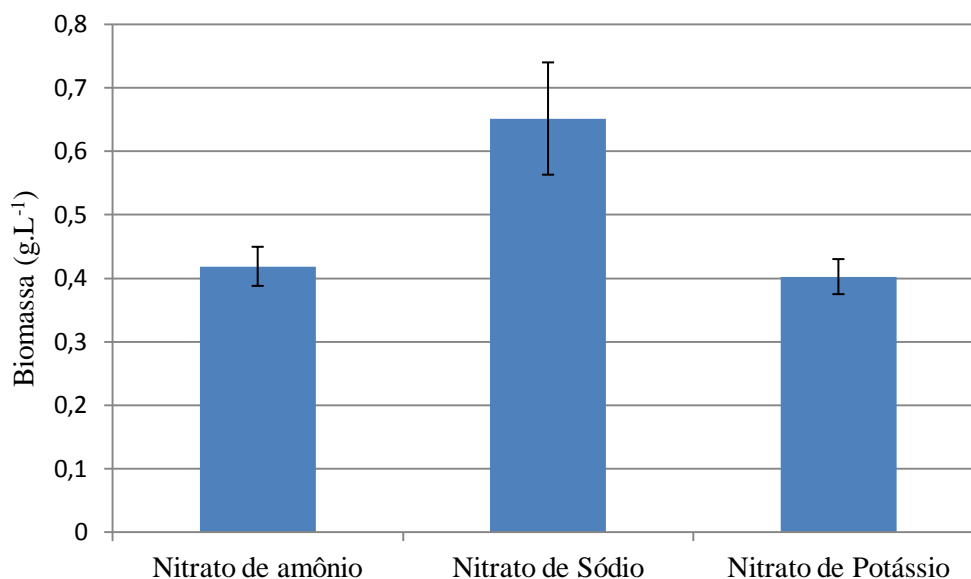


Figura 9: Biomassa total acumulada para a *Chlorella* sp.

Através da curva de crescimento foi possível observar que as algas cultivadas com nitrato de sódio apresentaram melhor crescimento em todo o experimento, além de terem

apresentado maior biomassa final. Porém, através da Figura 10, foi possível observar que os reatores 5 e 6, os quais foram suplementados com nitrato de potássio, apresentaram decantação nas paredes internas do reator, e principalmente na parede externa da camisa interna do reator. Foram realizadas tentativas de homogeneizar o conteúdo do reator, mas sem sucesso. Esta decantação provavelmente influenciou os resultados de densidade ótica das amostras, o que interfere nos resultados de crescimento de biomassa.

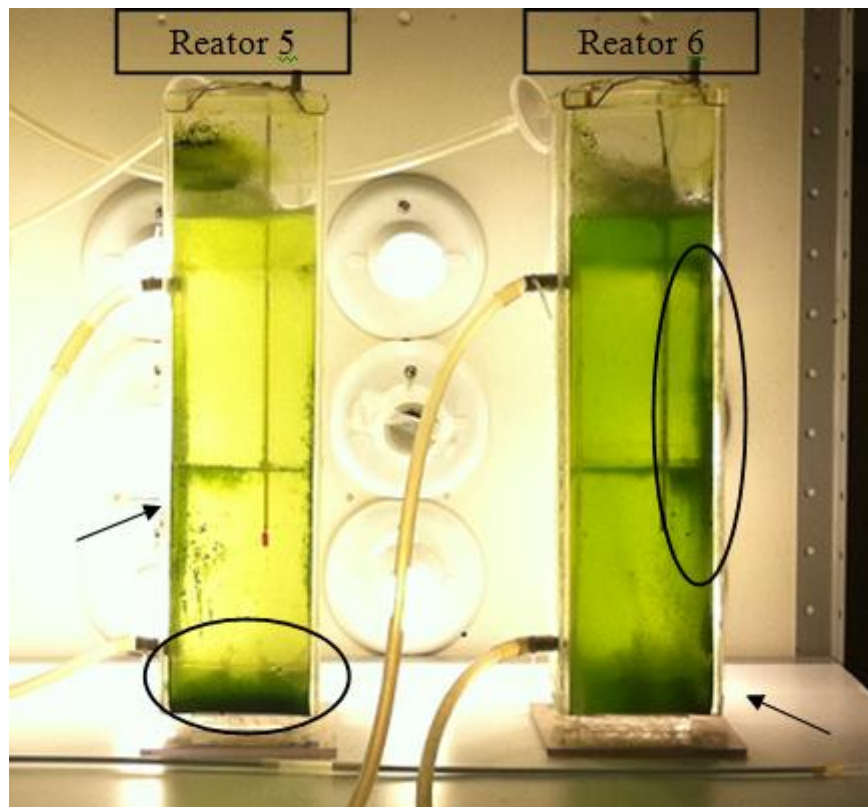


Figura 10: Reatores 5 e 6 no último dia de cultivo da *Chlorella* sp.

Os reatores 1 e 2, com nitrato de amônio, apresentaram muita formação de espuma no topo do reator, como é possível observar através da Figura 11. Esta espuma concentrou um pouco de biomassa, o que pode também ter influenciado na coleta das amostras e, portanto, nos resultados finais.



Figura 11: Reatores 1 e 2 no último dia de cultivo da *Chlorella* sp.

Para validar os resultados obtidos, foi realizado um teste estatístico de análise de variância para os resultados de biomassa final obtida. Esta análise mostrou que existe diferença significativa entre os resultados finais de biomassa ($p=0,016$), posteriormente foi realizado o teste de Tukey a fim de estabelecer qual dos três sais se diferenciava. Este segundo teste mostrou que os reatores com suplementação com nitrato de sódio apresentaram realmente maiores crescimentos, enquanto que os reatores com nitrato de amônio e potássio não apresentaram diferença significativa entre si.

4.2 Cultivo *Dunaliella tertiolecta*

A curva de crescimento em biomassa e de biomassa final da *D. tertiolecta* sob diferentes fontes de nitrato estão representadas na Figura 12 e na Figura 13, respectivamente:

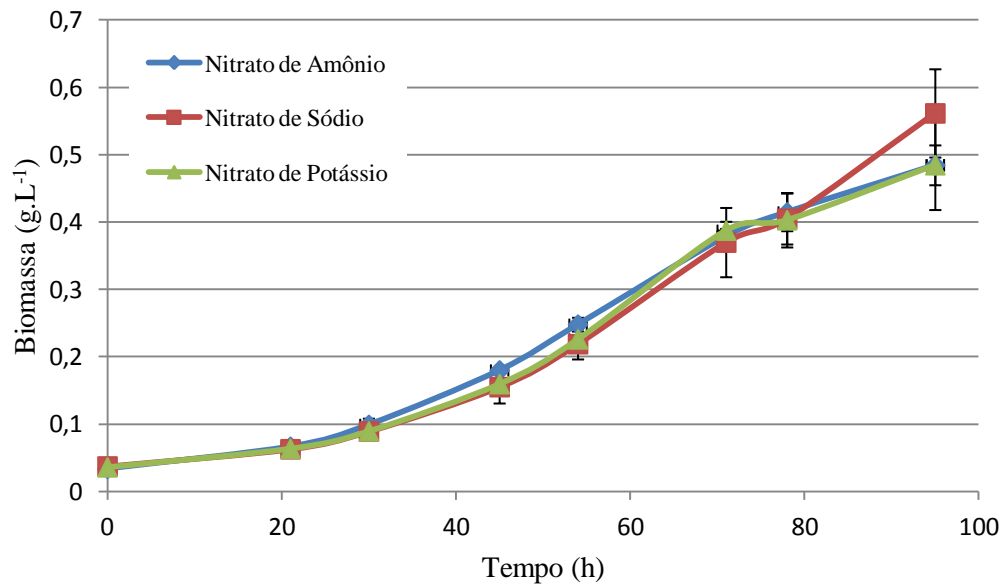


Figura 12: Curva de crescimento de biomassa versus tempo para a *D. tertiolecta*.

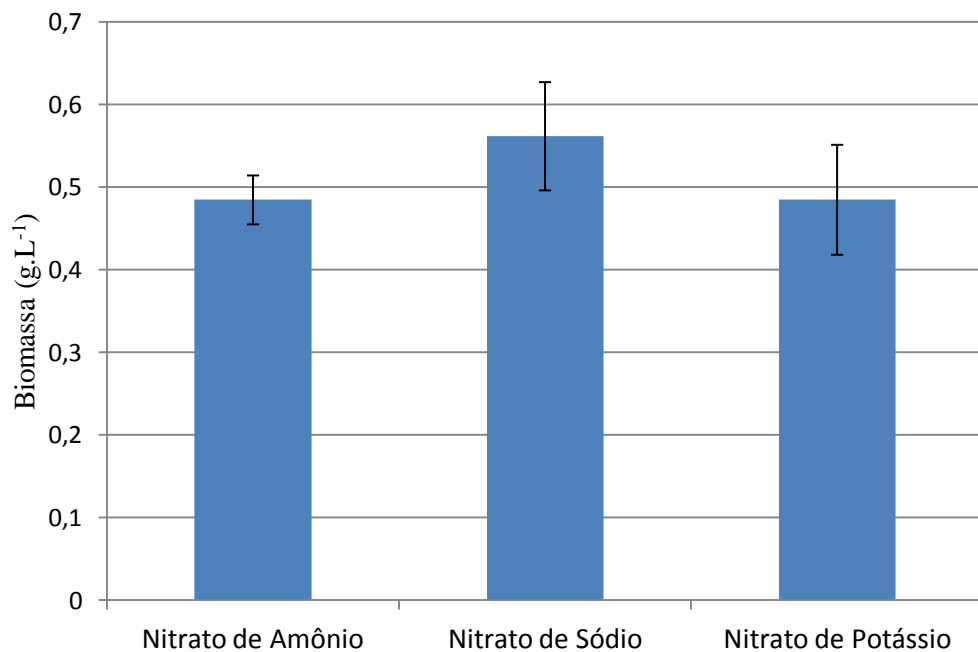


Figura 13: Biomassa total acumulada para a *D. tertiolecta*.

Pode-se observar que as microalgas que foram cultivadas com nitrato de sódio apresentaram uma maior biomassa final, tendo nas horas finais de cultivo um salto significativo no seu crescimento. Durante a maior parte do cultivo, porém, todos os reatores apresentaram crescimento semelhante.

Após realização de análise estatística de variância, foi constatado que não há diferença significativa entre os resultados de biomassa final dos três sais ($p=0,41$). Acredita-se que esta semelhança nos resultados deve-se a suplementação adicional de sal que foi realizada para a *D. tertiolecta*. A diferença nos três sais está principalmente em como eles afetam a pressão osmótica do sistema. Como neste meio já havia uma grande quantidade de sal, pode ser que, como a pressão osmótica do meio já era bastante alta, os sais de nitrato não influenciaram neste valor, por isto os resultados não diferiram entre si.

4.3 Pigmentos na *Chlorella* sp

O acúmulo de carotenoides e os carotenoides totais obtidos no cultivo das microalgas da espécie *Chlorella* sp estão representados na Figura 14 e na Figura 15, respectivamente.

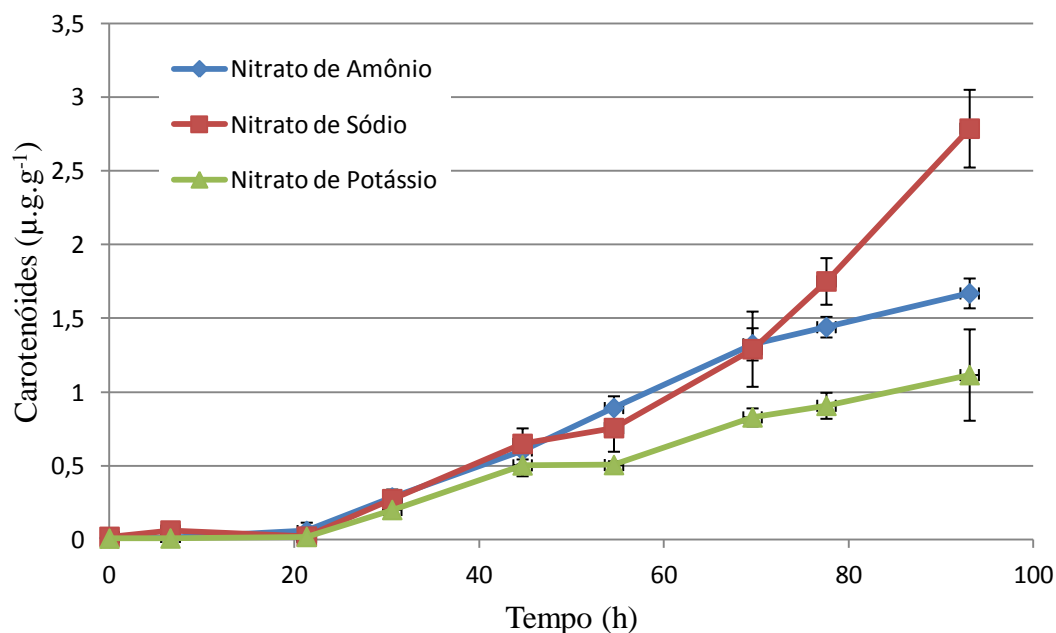


Figura 14: Curva de acúmulo de carotenoides no cultivo da *Chlorella* sp.

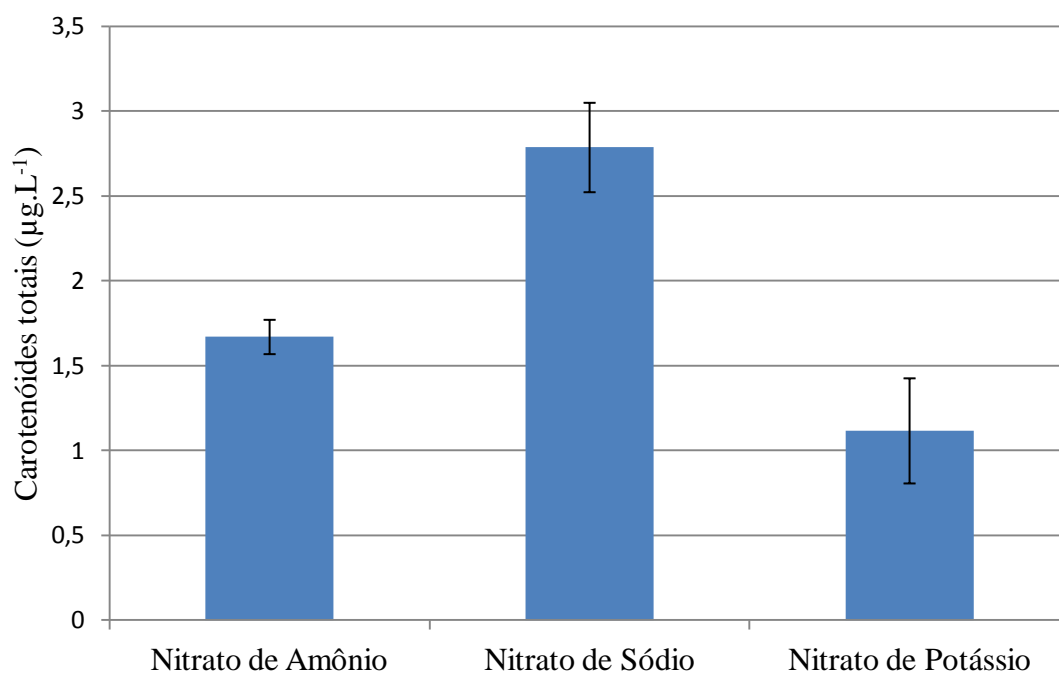


Figura 15: Carotenoides totais para o cultivo da *Chlorella* sp.

Após a realização de análise estatística de variância, comprovou-se que os três nitratos são diferentes entre si ($p=0,014$). Posteriormente, foi realizado o teste estatístico de Tukey e comprovou-se que o cultivo suplementado com nitrato de sódio apresentou maior acúmulo de carotenoides que os demais nitratos, de potássio e de amônio, que apresentaram resultados iguais entre si. Isto se deve principalmente ao maior crescimento de biomassa obtido no cultivo suplementado com nitrato de sódio para a *Chlorella* sp.

A *Chlorella* sp é uma espécie de microalga que geralmente não acumula grande quantidade de carotenóides. Caracteriza-se por ser uma espécie que acumula mais clorofilas. Dentre os carotenoides existentes, pode-se considerar a *Chlorella* sp rica em luteína.

5. Conclusões

A partir da revisão bibliográfica e do teste de três sais de nitrato como fontes de suplementação de nitrogênio, sendo eles o nitrato de amônio, o nitrato de sódio e o nitrato de potássio, realizados neste trabalho, foi possível chegar às seguintes conclusões:

- Para a espécie *Chlorella* sp, houve diferenciação entre os três sais de nitrato, sendo que o nitrato de sódio apresentou maior crescimento de biomassa que os demais sais, e o nitrato de potássio e o nitrato de amônio apresentaram resultados de crescimento iguais entre si.
- Para a espécie *Dunaliella tertiolecta* não foi possível observar diferença no crescimento de biomassa entre o três cultivos com os diferentes sais.
- Quanto ao acúmulo de carotenoides, para a espécie *Chlorella* sp, houve maior acúmulo no cultivo suplementado com nitrato de sódio, que apresentou resultado significativamente diferente dos outros sais, sendo que os outros dois, nitrato de amônio e nitrato de potássio apresentaram resultados de acúmulo de pigmentos semelhantes entre si.

6. Trabalhos Futuros

Para trabalhos futuros, recomenda-se o uso, durante o cultivo, de um antiespumante, visando à redução da formação de espuma nos reatores, o que pode concentrar biomassa e mascarar os resultados obtidos através da retirada de amostras. Como as amostras líquidas são retiradas com pipeta Pasteur, a biomassa que se concentra na espuma não é levada em consideração, e isso pode causar erros nos resultados.

No cultivo de microalgas com suplementação de nitrogênio, notou-se que mesmo após as habituais 96 horas de cultivo, continuava ocorrendo um crescimento de biomassa nos reatores. Assim, recomenda-se realizar cultivos mais longos, a fim de concentrar maior quantidade de biomassa.

Além disso, sabe-se que nitrogênio em altas concentrações no meio inibe a formação de lipídeos e carotenoides nas células das microalgas, então seria interessante realizar o cultivo em duas etapas, o chamado cultivo extensivo. A etapa de crescimento, utilizando uma suplementação de sais de nitrogênio, e uma etapa de acúmulo de produtos de interesse, que se daria durante a fase de crescimento estacionário. Nesta etapa seria fornecida uma quantidade limitada de nitrogênio (mínima para o crescimento), pois nestes ambientes de concentração limitada de nitrogênio há maior acúmulo de produtos de alto valor agregado.

7. Referências Bibliográficas

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, May-Jun 2007. ISSN 0734-9750. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000246134500007 >.

CONVERTI, A. et al. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing**, v. 48, n. 6, p. 1146-1151, Jun 2009. ISSN 0255-2701. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000274371800008 >.

DAYANANDA, C. et al. Autotrophic cultivation of *Botryococcus braunii* for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides in various media. **Biomass & Bioenergy**, v. 31, n. 1, p. 87-93, Jan 2007. ISSN 0961-9534. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000243709700010 >.

DEGEN, J. et al. A novel airlift photobioreactor with baffles for improved light utilization through the flashing light effect. **Journal of Biotechnology**, v. 92, n. 2, p. 89-94, Dec 28 2001. ISSN 0168-1656. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000173186800003 >.

DEMIRBAS, M. F. Biofuels from algae for sustainable development. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3473-3480, Oct 2011. ISSN 0306-2619. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000292808400029 >.

DERNER, R. B. et al. **Microalgas, produtos e aplicações**. *Ciência Rural*. 36 2006.

FRÉ, N. C. D. K., LUCE HELENA DIERINGS, TOBIAS ROMAN, GÉSSICA MARCHESI RECH, ROSANE MARCILIO, NILSON ROMEU. **Influência da temperatura e salinidade no cultivo da microalga *Dunaliella tertiolecta* em fotobiorreator airlift** 2011.

GUERIN, M.; HUNTLEY, M. E.; OLAIZOLA, M. Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 5, p. 210-216, May 2003. ISSN 0167-7799. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000183116600008 >.

KOH, L. P.; GHAZOUL, J. Biofuels, biodiversity, and people: Understanding the conflicts and finding opportunities. **Biological Conservation**, v. 141, n. 10, p. 2450-2460, Oct 2008. ISSN 0006-3207. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000260568300003 >.

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

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217-232, Jan 2010. ISSN 1364-0321. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000271279100012 >.

MEINERZ, L. I. **Influência da temperatura, salinidade e nutrientes dissolvidos (N e P) no cultivo de microalgas de água estuarina e costeira**. 2007.

MOLINA, E. et al. Tubular photobioreactor design for algal cultures. **Journal of Biotechnology**, v. 92, n. 2, p. 113-131, Dec 28 2001. ISSN 0168-1656. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000173186800006 >.

PHUKAN, M. M. et al. Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3307-3312, Oct 2011. ISSN 0306-2619. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000292808400007 >.

POSTEN, C. Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. **Engineering in Life Sciences**, v. 9, n. 3, p. 165-177, Jun 2009. ISSN 1618-0240. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000268818500004 >.

REDAELLI, C. et al. **Influencia da intensidade da luz sobre a biofixação de carbono em *Chlorella minutissima*** 2011.

SIERRA, E. et al. Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae. **Chemical Engineering Journal**, v. 138, n. 1-3, p. 136-147, May 1 2008. ISSN 1385-8947. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000255100300016 >.

VILCHEZ, C. et al. Marine Carotenoids: Biological Functions and Commercial Applications. **Marine Drugs**, v. 9, n. 3, p. 319-333, Mar 2011. ISSN 1660-3397. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000288892900003 >.

XU, L. et al. **Microalgal bioreactors: Challenges and opportunities**. *Engineering in Life Sciences*. 9 2009.

ZENG, X. et al. Microalgae bioengineering: From CO₂ fixation to biofuel production. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 6, p. 3252-3260, AUG 2011 2011. ISSN 1364-0321.

ZHANG, C. W. et al. An industrial-size flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp (Eustigmatophyceae). **Aquaculture**, v. 195, n. 1-2, p. 35-49, Apr 2 2001. ISSN 0044-8486. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000167571600004 >.

ZNAD, H.; BALES, V.; KAWASE, Y. Modeling and scale up of airlift bioreactor. **Computers & Chemical Engineering**, v. 28, n. 12, p. 2765-2777, NOV 15 2004 2004. ISSN 0098-1354.