

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

ESCOLA DE ENGENHARIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Estudo da produção e extração de lipídeos na  
microalga *Chlorella* sp.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ANDRÉ JARENKOW**

Porto Alegre, Março de 2014



Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Escola de Engenharia  
Departamento de Engenharia Química  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Estudo da produção e extração de lipídeos na microalga *Chlorella* sp.

André Jarenkow

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia.

Área de concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de Processos

**Orientadores:**

**Prof. Dr. Nilson Romeu Marcílio**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Rosane Rech**

Porto Alegre

2014



Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Escola de Engenharia  
Departamento de Engenharia Química  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação *Estudo da produção e extração de lipídeos na microalga Chlorella sp.*, elaborada por André Jarenkow, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia.

Comissão Examinadora:

---

Profa. Dra. Débora Jung Luvizetto Faccin – DEQUI / UFRGS

---

Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz - PPGCTA / UFRGS

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Aline Schilling Cassini – PPGEQ / UFRGS



## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (PPGEQ) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de fazer parte do curso de mestrado e desenvolver este trabalho.

Aos proffessores do PPGEQ-UFRGS, principalmente aos meus orientadores, Prof. Nilson Romeu Marcílio e Prof<sup>a</sup>. Rosane Rech, pelos ensinamentos e paciência.

Aos professores do ICTA-UFRGS, pelos ensinamentos e por permitirem a utilização da estrutura dos seus laboratórios: Prof. Alessandro Rios, Prof. Plinho Hertz e Prof. Marco Antônio Záchia Ayub.

À equipe do laboratório, que ajudou imensamente na realização do presente trabalho, além de criar um ambiente muito especial de se trabalhar: Géssica Roman, Tobias Dierings, Allan Morcelli, Arthur Lygeros, Eduardo Steckert e Cristiane Redaelli.

À minha família e aos meus amigos, que sempre me deram suporte durante a realização deste trabalho. Em especial, meus pais, Pedro Henrique Jarenkow e Norma Lima Jarenkow e meu irmão Carlos Jarenkow, pelo amor e apoio incondicionais.

À minha namorada, Marja de Sordi, por ser minha companheira e cúmplice, e me incentivar em todos os momentos.





## RESUMO

A busca por fontes renováveis de energia é uma das prioridades nas pesquisas na área de engenharia na atualidade, dando-se preferência principalmente para uma alternativa aos derivados de petróleo. A produção de biodiesel com lipídeos extraídos de microalgas é um assunto muito promissor, visto as inúmeras vantagens deste processo. Pesquisas apontam que a diminuição da concentração de nitrogênio presente no meio de cultivo aumenta o acúmulo de lipídeos pelas microalgas, mas a produção de biomassa fica prejudicada. Para mensurar a importância desse nutriente e melhorar a eficiência da extração de óleos, no presente trabalho, foi proposta a avaliação da influência do íon nitrato no cultivo de *Chlorella* sp., focando o estudo na concentração de biomassa e no acúmulo de lipídeos. Para tal, foram testadas diferentes concentrações iniciais de  $\text{NaNO}_3$ ; o melhor perfil de adição de  $\text{NaNO}_3$  no meio de cultivo (em etapas ou em uma dose única); o desempenho da microalga em um cultivo semicontínuo; e quatro tipos de tratamentos para a quebra da parede celular das microalgas *Chlorella minutissima* e *Chlorella* sp., a fim de realizar uma extração de lipídeos mais efetiva. A concentração inicial de  $300 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_3$  apresentou melhores resultados em relação à concentração final de biomassa ( $2,48 \text{ g L}^{-1}$ ) e acúmulo de lipídeos totais (12,0 % em peso seco). A adição de  $\text{NaNO}_3$  em apenas uma etapa obteve os resultados mais satisfatórios, com concentração final de biomassa de  $1,92 \text{ g L}^{-1}$  e 6,02 % de lipídeos totais em peso seco de biomassa. No cultivo semicontínuo, o melhor resultado para o acúmulo de lipídeos foi volume de corte de 1/6 a cada 24 h, resultando em 9,02 % de lipídeos em biomassa seca e produtividade lipídica de  $214 \text{ mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$ . Como pré-tratamento para quebra da parede celular da microalga *Chlorella minutissima*, não houve diferença significativa entre os métodos testados; para a *Chlorella* sp., as técnicas com resultados mais satisfatórios foram autoclave e micro-ondas.



## ABSTRACT

Nowadays, the search for renewable energy sources is a high priority topic in engineer research, with preference to an alternative to petroleum derived energy sources. Biodiesel production from microalga lipid is very promising, since the several advantages of this process. Many studies have shown that, to increase the microalga lipid accumulation, low nitrogen concentration is necessary; however, this condition has an opposite effect on biomass production. To measure the effect of this nutrient and improve oil extraction efficiency, in the present work, the nitrate ion influence was evaluated over the microalga *Chlorella* sp. cultivate, measuring biomass concentration and lipid accumulation. This work tested the effect of the initial  $\text{NaNO}_3$  concentration and different  $\text{NaNO}_3$  pulse feeding profiles along the culture. A semicontinuous culture was carried out with renewal rate of 1/3 and 1/6 (v/v) in 24 h and 48 h, to improve biomass and lipid productivity. It was also tested four pre-treatments in order to break the microalga (*Chlorella minutissima* and *Chlorella* sp.) cell wall: microwave, autoclave, bead beating and sonication. The highest biomass and lipid concentration were found when used initial  $\text{NaNO}_3$  concentration of  $300 \text{ mg L}^{-1}$ , with  $2,48 \text{ g L}^{-1}$  and  $12,04 \%$ , respectively. Adding  $\text{NaNO}_3$  all at once (one time at the culture start off) showed the best results for biomass concentration ( $1,92 \text{ g L}^{-1}$ ) and lipid accumulation ( $6,02 \%$ ). In semicontinuous culture, the microalga *Chlorella* sp. presented good results for lipid production ( $9,02 \%$ ) and lipid productivity ( $214 \text{ mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) at 1/6 renewal rate every 24 h, however. The best pre-treatment for cell wall tested for *Chlorella* sp were microwave and autoclave; for *Chlorella minutissima*, there was no difference between the tested pre-treatments and the ones without it.



## Sumário

1	Introdução .....	18
2	Revisão bibliográfica .....	19
2.1	Microalgas .....	19
2.1.1	Microalgas e biodiesel.....	20
2.1.2	Microalga <i>Chlorella</i> .....	22
2.2	Nutrição algácea .....	24
2.2.1	Carbono .....	24
2.2.2	Nitrogênio.....	25
2.2.3	Fósforo .....	27
2.3	Cultivos.....	27
2.3.1	Quanto à presença de nutrientes .....	28
2.3.1.1	Cultivo Autotrófico.....	28
2.3.1.2	Cultivo Heterotrófico .....	29
2.3.1.3	Cultivo Mixotrófico .....	30
2.3.2	Quanto à forma de condução do processo.....	30
2.3.2.1	Cultivo descontínuo .....	30
2.3.2.2	Cultivo semicontínuo .....	31
2.3.2.3	Cultivo contínuo .....	32
2.4	Colheita da biomassa .....	34
2.4.1	Centrifugação .....	34
2.4.2	Filtração.....	35
2.4.3	Sedimentação .....	36
2.5	Pré-tratamentos para extração .....	36
2.5.1	<i>Bead mill</i> .....	39
2.5.2	Micro-ondas .....	40
2.5.3	Autoclave .....	41

2.5.4	Ultrassom .....	42
2.6	Extração de lipídeos.....	45
2.6.1	Bligh n' Dyer.....	45
2.6.2	Soxhlet.....	46
2.6.3	Fluido Supercrítico .....	47
3	Metodologia .....	50
3.1	Microalga e meio de cultivo .....	50
3.2	Acompanhamento do crescimento das microalgas.....	50
3.3	Pré-inóculo .....	51
3.4	Cultivo em fotobiorreator .....	52
3.5	Estudo da influência do pré-tratamento para a extração de lipídeos .....	54
3.5.1	Ultrassom.....	54
3.5.2	Autoclave .....	54
3.5.3	<i>Bead mill</i> .....	54
3.5.4	Micro-ondas .....	54
3.6	Estudo da influência do íon nitrato.....	54
3.6.1	Influência da concentração de $\text{NaNO}_3$ no meio de cultivo.....	54
3.6.2	Influência da adição de $\text{NaNO}_3$ em etapas .....	55
3.7	Cultivo semicontínuo.....	55
3.8	Análises .....	55
3.8.1	Extração de lipídeos .....	56
3.8.1.1	Soxhlet .....	56
3.8.1.2	Bligh n' Dyer .....	56
3.8.2	Medida da concentração do íon nitrato .....	57
3.9	Análise estatística .....	57
3.10	Reagentes.....	57
4	Resultados e discussão.....	58

4.1	Pré-tratamento .....	58
4.2	Concentração de $\text{NaNO}_3$ .....	60
4.3	Adição de $\text{NaNO}_3$ em etapas .....	64
4.4	Cultivo semicontínuo.....	66
5	Conclusão.....	73
6	Referências.....	74

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Biscoitos amanteigados pigmentados com <i>Chlorella vulgaris</i> (Gouveia, Batista, Miranda, Empis, & Raymundo, 2007). .....	20
<b>Figura 2:</b> (a) Preparação de massa fresca enriquecida com <i>Isochrysis galbana</i> . (b) Efeito da concentração de biomassa de <i>Diatronema vlkianum</i> na coloração de massa fresca (FRADIQUE et al., 2013). .....	20
<b>Figura 3:</b> <i>Botryococcus braunii</i> , uma espécie forte candidata a ser fonte de biodiesel devido ao seu alto teor lipídico (“Protist Images: Botryococcus braunii”). .....	22
<b>Figura 4:</b> Microalga <i>Chlorella vulgaris</i> . Reproduzido de <i>Chlorella vulgaris</i> (2013). .....	23
<b>Figura 5:</b> <i>Chlorella</i> em cápsulas, vendida comercialmente como suplementação alimentar. ( <a href="http://corposuplemento.com.br/blog/nutricao/saiba-mais-sobre-chlorella/">http://corposuplemento.com.br/blog/nutricao/saiba-mais-sobre-chlorella/</a> )	23
<b>Figura 6:</b> : Influência do nitrato na produção de lipídeos e na concentração de biomassa para a microalga <i>Chlorococcum</i> sp. (HARWATI; WILLKE; VORLOP, 2012). .....	27
<b>Figura 7.</b> Esquema simplificado da fotossíntese da microalga (“Sustainable Green Technologies Inc. - Algae FAQ”). .....	28
<b>Figura 8:</b> Cinética genérica de cultivo semicontínuo. ....	31
<b>Figura 9:</b> Representação esquemática de um processo contínuo. Adaptado de Macintyre e Cullen . ....	33
<b>Figura 10:</b> Foto tirada de cima de uma esteira filtradora (“Innovation: A Lean, Green Machine   Inc.com”). .....	36
<b>Figura 11:</b> Influência do pré-tratamento na extração de lipídeos (LEE et al., 2010a) .....	37
<b>Figura 12:</b> Esquema dos principais métodos para o pré-tratamento da biomassa, adaptado de HALIM et al(2012). ....	38
<b>Figura 13:</b> Imagem de microscopia eletrônica mostrando células de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> (a) antes do tratamento, (b) após ultrassom durante 6 minutos, (c) após passagem por bead mill durante 6 minutos e (d) após um homogeneizador de alta pressão a 200 MPa (BURY et al, 2001) .....	39
<b>Figura 14:</b> Foto de microscopia de varredura eletrônica de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> após o tratamento com bead mill (GECIOVA et al, 2002). ....	40



<b>Figura 15:</b> Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de <i>Nannochloropsis</i> sp. mostrando a eficiência da destruição da parede celular com micro-ondas. Em (A), células intactas antes do pré-tratamento, (B) mostra as células após extração a 100 °C com etanol, e (C) após extração com uma mistura 1:2 (v/v) de clorofórmio e etanol (IQBAL; THEEGALA, 2013). ....	41
<b>Figura 16:</b> Imagem de microscopia eletrônica de varredura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (A) antes de pré-tratamento com ultrassom a quente e (B) após o procedimento (MARX et al, 2011).....	43
<b>Figura 17:</b> Imagem de microscopia eletrônica mostrando células de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> (a) antes do tratamento, (b) após ultrassom, (c) após passagem por bead mill (BURY et al, 2001) .....	44
<b>Figura 18:</b> Gráfico comparativo entre métodos de pré-tratamentos na <i>Synechocystis aquatilis</i> (KAIWAN-ARPORN et al., 2012).....	44
<b>Figura 19:</b> Comparação entre métodos para extração de lipídeos da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> ; adaptado de Araujo et al ( 2013).....	46
<b>Figura 20:</b> Aparelho Soxhlet, adaptado de De Castro & Priego-Capote (2010). ...	47
<b>Figura 21:</b> Diagrama de fases de um gás genérico (BRUNNER, 2005) .....	48
<b>Figura 22:</b> Relação entre biomassa e densidade ótica a 750 nm para <i>Chlorella</i> sp.	51
<b>Figura 23:</b> Estufa rotatória com os pré-inóculos das microalgas. ....	51
<b>Figura 24:</b> Vista lateral do fotobiorreator utilizado (KOCHEM et al., 2014) .....	53
<b>Figura 25:</b> Foto dos biorreatores em start-up. ....	53
<b>Figura 26:</b> Comparação de conteúdo lipídico em biomassa seca para <i>C. minutissima</i> extraído com Soxhlet e Bligh n Dyer. ....	58
<b>Figura 27:</b> Comparação de conteúdo lipídico em biomassa seca para <i>Chlorella</i> sp. extraído com Soxhlet. ....	59
<b>Figura 28:</b> Curva de crescimento da <i>Chlorella</i> sp. com diferentes concentrações iniciais de $\text{NaNO}_3$ . ....	60
<b>Figura 29:</b> Curva de consumo do íon nitrato em <i>Chlorella</i> sp. com diferentes concentrações iniciais de $\text{NaNO}_3$ . ....	61
<b>Figura 30:</b> Quantidade de lipídeos em biomassa seca de <i>Chlorella</i> sp. com diferentes concentrações iniciais de $\text{NaNO}_3$ . ....	61
<b>Figura 31:</b> Cultivo de <i>Chlorella</i> sp. em diferentes concentrações de $\text{NaNO}_3$ em duplicata: (a) 75 mg L <sup>-1</sup> ; (b) 300 mg L <sup>-1</sup> ; (c) 600 mg L <sup>-1</sup> ; (d) 900 mg L <sup>-1</sup> .....	63

<b>Figura 32:</b> Curva de crescimento da <i>Chlorella</i> sp. com adição de $\text{NaNO}_3$ em etapas. .....	64
<b>Figura 33:</b> Curva de consumo do íon nitrato em <i>Chlorella</i> sp. com adição de $\text{NaNO}_3$ em etapas. ....	64
<b>Figura 34:</b> Quantidade de lipídeos em biomassa seca de <i>Chlorella</i> sp. com adição de $\text{NaNO}_3$ em etapas.....	65
<b>Figura 35:</b> Curvas de crescimento da <i>Chlorella</i> sp. para diferentes cortes do cultivo semicontínuo.....	67
<b>Figura 36:</b> Quantidade de lipídeos em biomassa seca de <i>Chlorella</i> sp. no cultivo semicontínuo.....	67
<b>Figura 37:</b> Produtividade de biomassa da microalga <i>Chlorella</i> sp. em função do tempo para diferentes cortes no cultivo semicontínuo. ....	68
<b>Figura 38:</b> Superfície de resposta relacionando o tempo e o volume de corte com os lipídeos no cultivo semicontínuo.....	68
<b>Figura 39:</b> Superfície de resposta relacionando o tempo e o volume de corte com a produtividade de lipídeos no cultivo semicontínuo.....	69
<b>Figura 40:</b> Curva de consumo do íon nitrato em <i>Chlorella</i> sp para diferentes cortes no cultivo semicontínuo. ....	69

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Teor lipídico de algumas microalgas (Chisti Y. , 2007 ).....	21
<b>Tabela 2:</b> Comparação entre fontes de biodiesel ( CHISTI, 2007 ) .....	21
<b>Tabela 3:</b> Comparação entre as características do fotobiorreator e do fermentador (BEHRENS, 2005). .....	29
<b>Tabela 4:</b> Composição química de células de <i>Chlorella vulgaris</i> em cultivo autotrófico e heterotrófico (XU; MIAO; WU, 2006). .....	29
<b>Tabela 5:</b> Planejamento experimental para adição de NaNO <sub>3</sub> .....	55
<b>Tabela 6:</b> Planejamento experimental para o cultivo semicontínuo. ....	55
<b>Tabela 7:</b> Comparação de conteúdo lipídico em biomassa seca para <i>C. minutissima</i> extraído com Soxhlet e Bligh n Dyer submetida a diferentes pré-tratamentos .....	58
<b>Tabela 8:</b> Conteúdo lipídico em biomassa seca para <i>Chlorella</i> sp. extraído com Soxhlet. ....	59
<b>Tabela 9:</b> Produção de biomassa e lipídeos por <i>Chlorella</i> sp. em diferentes concentrações iniciais de NaNO <sub>3</sub> . ....	62
<b>Tabela 10:</b> Produtividade de lipídeos e biomassa de <i>Chlorella</i> sp. com adição de NaNO <sub>3</sub> em etapas.....	65
<b>Tabela 11:</b> Produtividade de lipídeos e biomassa de <i>Chlorella</i> sp. em cultivo semicontínuo.....	67

## 1 Introdução

É sabido que ao passo que a humanidade evolui, as emissões de gases e poluentes na atmosfera aumentam na mesma medida. Novas tecnologias estão sendo testadas para tentar diminuir o impacto ambiental da extração de bens da Terra, uma delas é a utilização de microalgas como mecanismo de sequestro de CO<sub>2</sub> da atmosfera, redução de poluentes de efluentes industriais e produção de biodiesel.

As microalgas têm alta capacidade de absorção de CO<sub>2</sub> e de nitrogênio e fósforo dissolvidos em água, tornando-as ideais para tratamento biológico de efluentes industriais. Elas podem se tornar bastante rentáveis, pois algumas espécies produzem compostos de alto valor agregado, como pigmentos, lipídeos, vitaminas e minerais. Muitas já são comercializadas como suplemento alimentar, sendo produzidas em larga escala em reatores abertos. Mais recentemente, elas têm sido alvo de pesquisas visando a produção de óleos que podem ser utilizados como fonte de energia. Porém, de acordo com as condições de crescimento, tais como, salinidade do meio de cultivo, temperatura, pH e aeração, as microalgas podem variar os produtos do seu metabolismo, além de crescerem mais ou menos rapidamente.

Cultivos em sistemas abertos são a alternativa mais utilizada durante a década de 2000, pois são de uso prático e barato. Porém, tal sistema apresenta uma produtividade baixa e um alto risco de contaminação. O uso de sistemas fechados, como fotobiorreatores, tem uma maior produtividade e controle de parâmetros, porém, são inviáveis economicamente por enquanto. Muitos trabalhos estão focados em tornar este tipo de cultivo rentável, procurando melhores espécies e parâmetros otimizados de crescimento.

No presente trabalho, foi utilizado um fotobiorreator fechado do tipo *airlift* tendo como objetivo estudar as diferentes condições de cultivo em relação ao macronutriente nitrogênio e sua influência no metabolismo da microalga *Chlorella* sp., caracterizando suas mudanças em relação à biomassa produzida e ao acúmulo de lipídeos totais. A melhor forma de extração dos lipídeos na microalga também foi avaliada, sendo testadas duas técnicas muito utilizadas para tal procedimento. A microalga foi submetida a um cultivo semicontínuo com diferentes tempos e volumes de renovação do meio a fim de aumentar sua produtividade de biomassa.

## 2 Revisão bibliográfica

### 2.1 Microalgas

Microalgas são seres uni ou multicelulares que possuem a capacidade de crescer com pouca água, poucos nutrientes e dióxido de carbono, absorvendo a energia solar e utilizando fotossíntese como mecanismo para adquirir energia (AHMAD et al., 2011). São encontradas principalmente em oceanos, lagos, mas também podem ser encontradas na superfície em diversos tipos de solo (TOMASELLI, 2004). São seres procariontes (cianobactérias) ou eucariontes (algas verdadeiras) (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

As microalgas mantêm direta ou indiretamente praticamente toda a vida marinha, uma vez que são parte do fitoplâncton (SUBBA RAO, 2006). Segundo Tomaselli (2004), elas podem possuir diferentes formas de organização celular: unicelular, colonial e filamentosa; sendo a maior parte das cianobactérias não móvel.

Existem diversas aplicações potenciais para as microalgas (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; WANG et al., 2008):

- Remoção de CO<sub>2</sub> de efluentes gasosos industriais pela biofixação, reduzindo a emissão dos gases causadores do efeito estufa liberados na queima de combustíveis;
- 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;
- Após a extração do óleo, a biomassa restante pode ser processada para obtenção de etanol, metano, alimentação na pecuária, fertilizante, devido ao seu alto teor de N e P, ou simplesmente queimada para cogeração de energia;

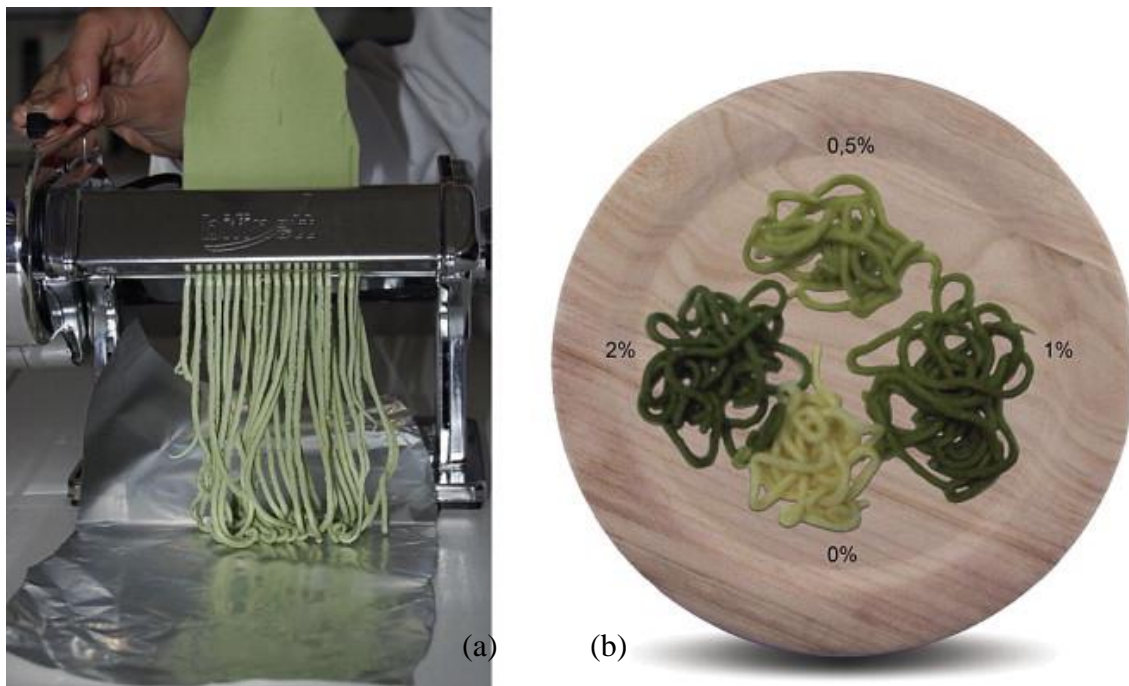
A habilidade de crescer em condições adversas e a necessidade reduzida de nutrientes fazem com que as áreas não cultiváveis, independente da mudança climática, possam ser utilizadas para o cultivo de microalgas, não concorrendo com a agricultura, além de poderem aproveitar águas residuárias.

Além disso, as microalgas são alvo de muitas pesquisas na alimentação humana, pois possuem em sua composição antioxidantes, fibras, ácidos graxos e oligoelementos (GOUVEIA et al., 2007a). Também pode ser usada como corante, agregando ao alimento

as características citadas (GOUVEIA et al., 2007b). As Figura 1 e Figura 2 mostram exemplos de alimentos pigmentados com microalgas:



**Figura 1:** Biscoitos amanteigados pigmentados com *Chlorella vulgaris* (Gouveia, Batista, Miranda, Empis, & Raymundo, 2007).



**Figura 2:** (a) Preparação de massa fresca enriquecida com *Isochrysis galbana*. (b) Efeito da concentração de biomassa de *Diacronema vlkianum* na coloração de massa fresca (FRADIQUE et al., 2013).

### 2.1.1 Microalgas e biodiesel

As microalgas têm sido sugeridas como potenciais candidatas para a produção de biodiesel, devido à eficiência fotossintética, maior produção de biomassa e maior taxa de crescimento, comparadas a outras fontes (HUANG et al., 2009). Os teores lipídicos das microalgas, como mostra a Tabela 1, comumente ficam entre valores de 20 % a 50 % (HUANG et al., 2009), o que mostra um enorme potencial para as microalgas se tornarem

a principal fonte de biodiesel. As principais fontes de biodiesel atualmente são grãos oleaginosos, como soja, canola, milho, além de outras fontes de gordura, como gordura animal e óleo de cozinha reutilizado (CHISTI, 2007). No entanto, a quantidade necessária de área de plantio é muito maior se comparada a quanto é necessário para produzir microalgas, assumindo que essas tenham apenas 30 % do peso seco em óleo. A Tabela 2 mostra essa comparação.

**Tabela 1:** Teor lipídico de algumas microalgas (CHISTI Y., 2007).

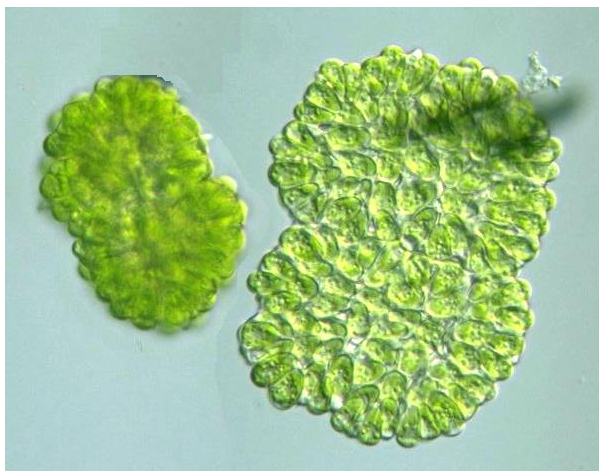
Espécie de microalga	Teor lipídico (% em peso seco)
<i>Botryococcus braunii</i>	25–75
<i>Chlorella sp.</i>	28–32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16–37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis sp.</i>	25–33
<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Nannochloris sp.</i>	20–35
<i>Nannochloropsis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

**Tabela 2:** Comparação entre fontes de biodiesel (CHISTI, 2007)

Fonte de biodiesel	Rendimento de óleo (L/ha)	Área necessária para abastecer 50 % do combustível utilizado nos EUA (Mha)	Porcentagem da área cultivável dos EUA (%)
<b>Milho</b>	172	1540	846
<b>Soja</b>	446	594	326
<b>Canola</b>	1190	223	122
<b>Jatropha</b>	1892	140	77
<b>Côco</b>	2689	99	54
<b>Azeite de dendê</b>	5950	45	24
<b>Microalga com 30 % de óleo em peso</b>	58700	4,5	2,5

As microalgas precisam de características importantes para que possam ser fonte de biodiesel: ter parede celular fina, alto teor de lipídeos e alta produtividade (BANERJEE et al., 2002; CHISTI, 2007; RODOLFI et al., 2009). Um exemplo que atende tais

condições é a *Botryococcus braunii* (Figura 3), que possui alto teor de hidrocarbonetos, incluindo lipídeos, que chegam à porcentagem de 75 % de biomassa seca (BANERJEE et al., 2002).



**Figura 3:** *Botryococcus braunii*, uma espécie forte candidata a ser fonte de biodiesel devido ao seu alto teor lipídico (“Protist Images: *Botryococcus braunii*”).

Porém, é importante ressaltar que o custo de produção da microalga ainda é muito alto. Segundo Chisti (2007), o preço do biodiesel proveniente de microalgas gira em torno de US\$ 2,80 por litro, enquanto que derivados de petróleo custam US\$ 0,49 por litro.

Uma maneira de reduzir o custo é estudando melhores condições de cultivo das microalgas, direcionando a rota metabólica para a produção de lipídeos e de subprodutos de alto valor agregado, como pigmentos, para tornar rentável a produção de microalgas.

### 2.1.2 Microalga *Chlorella*

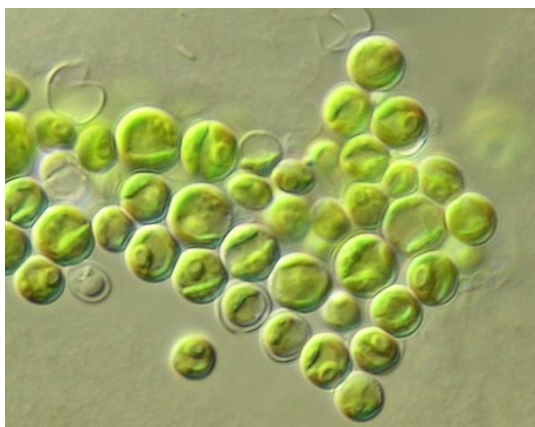
Uma das espécies de microalgas mais utilizadas é a *Chlorella* (Figura 4), sendo cultivada desde 1960 no Japão, sendo que, em 1980, já existiam aproximadamente 26 fábricas de grande escala na Ásia, produzindo cerca de 1000 kg de biomassa por mês (SPOLAORE et al., 2006). Ela foi a primeira espécie a ser cultivada em grande escala, em 1961, no Japão pela empresa Nihon Chlorella, para ser comercializada como suplemento alimentar (LOURENÇO, 2006). A *Chlorella* é amplamente usada para cadeia alimentar artificial fitoplancton – zooplancton – peixe, devido a sua composição de ácidos graxos, que é importantíssima para o sucesso da aquicultura (PETKOV; GARCIA, 2007).

É uma alga unicelular, com formato esférico, globular ou elipsoidal, não móvel (não possui flagelos) que pode atingir diâmetros entre 2,0 µm e 10,0 µm. Algumas espécies de



*Chlorella* são marinhas e outras são dulcícolas. Sua composição média é de aproximadamente 20 % de gordura, 45 % de proteína, 20 % de carboidrato e 10 % de minerais e vitaminas (PHUKAN et al., 2011).

Muitas pesquisas em relação às propriedades nutricionais e até mesmo medicinais das *Chlorellas* estão sendo feitas: Gouveia *et al.* (2007) utilizaram a microalga para dar coloração esverdeada a biscoitos amanteigados, Lee *et al* (2010b) utilizaram suplementação alimentar de *Chlorella* em homens fumantes no combate a radicais livres oriundos do hábito de fumar e recomendam a utilização para uma dieta saudável, além de outras pesquisas envolvendo doenças ligadas à idade, tanto em animais quanto em humanos (OKAMOTO et al., 1978; TSUCHIDA et al., 2003).



**Figura 4:** Microalga *Chlorella vulgaris*. Reproduzido de *Chlorella vulgaris* (2013).

Atualmente, as *Chlorellas* são comercializadas como suplementação alimentar (Figura 5), mas também são muito utilizadas para pesquisas em biodiesel (RASOUL-AMINI et al., 2011).



**Figura 5:** *Chlorella* em cápsulas, vendida comercialmente como suplementação alimentar. (<http://corposuplemento.com.br/blog/nutricao/saiba-mais-sobre-chlorella/>)

Uma das características da *Chlorella* é a sua capacidade de se adaptar às condições do cultivo, podendo crescer autotrófica, heterotrófica e mixotroficamente (XU; MIAO; WU, 2006).

## 2.2 Nutrição algácea

Como qualquer microrganismo, as microalgas alteram o seu metabolismo de acordo com a disponibilidade de nutrientes presentes no meio de cultivo. Microalgas da mesma espécie podem possuir diferentes composições químicas, de acordo com o meio de cultivo utilizado (XIN et al., 2010b).

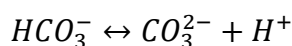
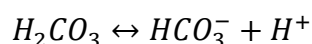
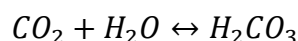
Os principais elementos para o crescimento algal são: carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio, fósforo, magnésio, cobre, zinco, molibdênio e ferro (LOURENÇO, 2006). Neste trabalho, apenas carbono, nitrogênio e fósforo foram estudados.

### 2.2.1 Carbono

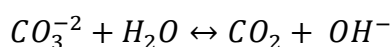
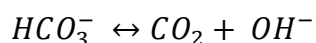
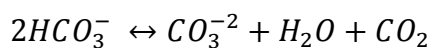
Carbono é o elemento mais abundante na estrutura de qualquer molécula orgânica, tais como proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, vitaminas, lipídeos, entre outros, os quais são sintetizados pelas células das microalgas. Devido a esse fator, o carbono é considerado essencial para as microalgas (LOURENÇO, 2006).

As principais fontes de carbono autotrófico são fontes inorgânicas: o CO<sub>2</sub> dissolvido no próprio meio de cultivo através de aeração do ar atmosférico, cuja concentração é de aproximadamente 0,03 % (também pode ser enriquecido de 1 % a 5 % em CO<sub>2</sub>); ou sais carbonatos e bicarbonatos. Tais enriquecimentos do ar atmosféricos são necessários para que o cultivo tenha alto rendimento de biomassa por autotrofismo (RICHMOND, 2004).

Quando o CO<sub>2</sub> é injetado no meio de cultivo, ele pode ser encontrado na forma de 4 espécies: CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, e segue as seguintes equações de equilíbrio:



Como pode-se perceber, existe um acúmulo de íons H<sup>+</sup>, fazendo com que o pH do meio de cultivo diminua (LEKANG, 2007). No entanto, o consumo do dióxido de carbono pelas microalgas é dado pelas seguintes reações (RICHMOND, 2004):



É possível ver que há, no decorrer do cultivo, uma acumulação de íons  $OH^-$ , levando a um aumento gradual do pH. Caso não haja biomassa suficiente para absorver o  $CO_2$  injetado no meio de cultivo, o pH ficará mais ácido.

Em qualquer um dos casos, a melhor maneira é controlar o pH do meio de cultivo com o uso de tampões, como TRIS (2-amino-2-[hidroximetil]-1-3-propanediol) (LOURENÇO, 2006).

Para cultivos mixotróficos ou heterotróficos, a fonte de carbono é orgânica: glicose, ácidos orgânicos (ácido acético, ácido láctico), alcoóis ou amino ácidos (LEE, 2004).

### 2.2.2 Nitrogênio

O nitrogênio é um componente essencial para muitas substâncias presentes na estrutura celular e proteínas funcionais das microalgas, sendo de extrema importância sua disponibilidade no meio de cultivo (LOURENÇO, 2006). A porcentagem de nitrogênio na biomassa seca pode variar de 7 % até 10 %.

O nitrogênio pode estar presente no meio de cultivo de diversas maneiras, como na forma do íon nitrato ( $NO_3^-$ ), amônia ( $NH_3$ ) e íon amônio ( $NH_4^+$ ). Para tal, solubilizam-se sais de nitrato ( $NaNO_3$ ,  $KNO_3$ ) e de amônio ( $NH_4Cl$ ,  $(NH_4)_2SO_4$ ) e uréia no meio de cultura (XIN et al., 2010a). O uso de qualquer um destes compostos como única fonte de nitrogênio pode acarretar mudança de pH durante o cultivo; quando amônia é usada, o pH fica mais ácido devido à liberação de  $H^+$  no meio; já o uso de  $NO_3^-$  deixa o pH mais elevado. Não há diferença significativa na produção de microalgas entre as duas fontes de nitrogênio (RICHMOND, 2004).

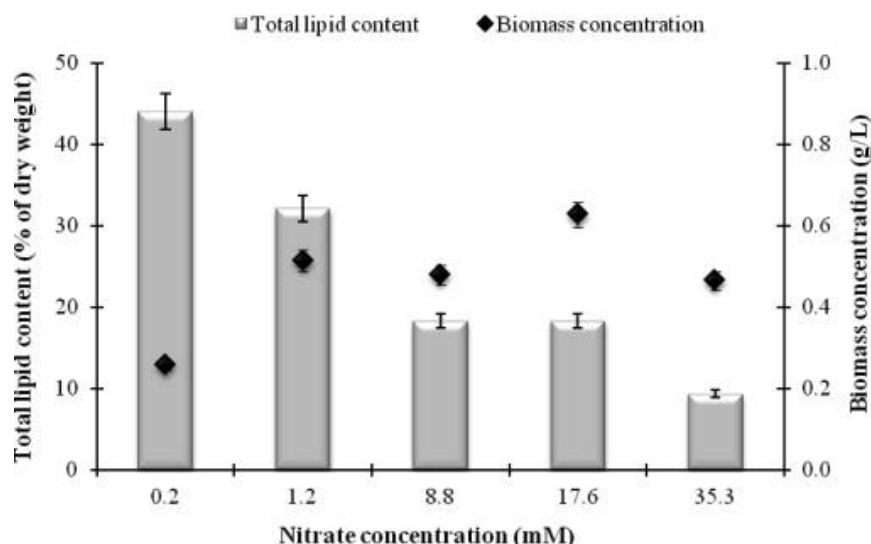
Como é um nutriente muito importante, muitas formulações de meio de cultivo são feitas com o propósito de não deixar o nitrogênio como agente limitante de crescimento. Condições nas quais o nitrogênio é escasso, a microalga tende a fazer reservas de energia, acumulando lipídeos (RICHMOND, 2004). A natureza do lipídio também é diferenciada, dependendo da disponibilidade do nutriente no meio de cultivo: são polares quando há nitrogênio disponível, e neutros em sua ausência. Algumas espécies são capazes de

aumentar a sua produção de carboidratos, ao invés de lipídeos nas condições de limitação de nitrogênio disponível, como a *Dunaliella*, que acumula grandes quantidades de glicerol e polissacarídeos (BOROWITZKA; BOROWITZKA, 1988).

Outra característica de um cultivo com ausência de nitrogênio é a produção de carotenoides secundários, ao mesmo tempo em que diminui a quantidade de clorofila nas células. Tal característica é observada na espécie *Dunaliella*, cujo cultivo tende a ficar da cor amarela, pelo acúmulo de  $\beta$ -caroteno, na limitação do nutriente no meio de cultivo (LOURENÇO, 2006).

Gao *et al.* (2013) mostraram a influência da limitação ou ausência de nutrientes sobre duas espécies de microalgas, *Chaetoceros muelleri* e *Dunaliella salina*, analisando a performance fotossintética, composição da biomassa e produção de lipídeos. Foi mostrado que o maior conteúdo de lipídeos para a *C. muelleri* (46,32 %) ocorreu na ausência de nitrogênio; para a *D. salina* (54,15 %), a privação de todos os nutrientes fez com que atingisse esse percentual.

Harwati *et al.* (2012) também realizaram experimentos estudando a influência do nitrato no crescimento de biomassa e na produção de lipídeos da microalga *Chlorococcum* sp.. Foi verificado que, quando a concentração de nitrato é baixa, o acúmulo de lipídeos é alto e a concentração de biomassa cai, entretanto, o contrário acontece também, como é mostrado na Figura 6. Mostrou-se que uma baixa concentração de nitrato pode levar, em alguns casos, a um valor de produtividade lipídica menor do que o ideal.



**Figura 6:** Influência do nitrato na produção de lipídeos e na concentração de biomassa para a microalga *Chlorococcum* sp. (HARWATI; WILLKE; VORLOP, 2012).

### 2.2.3 Fósforo

O fósforo é o componente primário de ácidos nucleicos, ATP, membranas celulares na forma de fosfolipídeos, açúcares fosfatados e fosfoenzimas. O fósforo está presente em todos os processos que envolvem trocas energéticas nas células (LOURENÇO, 2006).

A forma preferencial na qual as microalgas absorvem o fósforo é íon ortofosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). As fontes de fosfato nos meios de cultivo são normalmente sais de sódio ou potássio. Um fato característico do fósforo em relação às microalgas é que elas realizam um *consumo luxuriante* (RICHMOND, 2004); a microalga é capaz de acumular de 8 a 16 vezes a quantidade mínima necessária, tendo disponível mesmo que o nutriente não esteja mais presente no meio de cultivo.

Segundo Xin *et al.* (2010b), a baixa disponibilidade de fósforo ou nitrogênio levou a um acúmulo de lipídeos, mas a produtividade de biomassa foi baixa. Bem-Amotz *et al.* (1982) perceberam acúmulo de  $\beta$ -caroteno na microalga *Dunaliella* quando o fósforo era esgotado, porém não tão fortemente quando comparado à falta de nitrogênio.

### 2.3 Cultivos

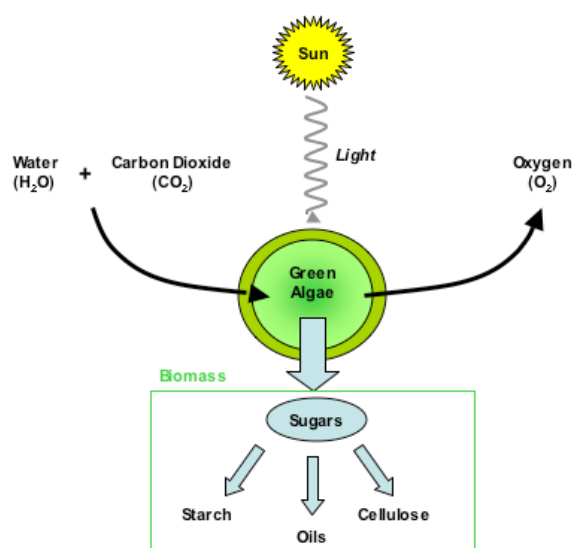
Os cultivos de microalgas podem ser classificados quanto à presença de alguns nutrientes essenciais, dos quais existem três grandes grupos: autotrófico, heterotrófico e mixotrófico; e também quanto à forma de condução do processo: descontínuo, semicontínuo, descontínuo alimentado e contínuo.

A maioria das microalgas é autotrófica obrigatória, não crescendo na ausência de luz e dióxido de carbono (PEREZ-GARCIA et al., 2011). No entanto, algumas espécies são capazes de utilizar diversas fontes de carbono para se desenvolverem (CHEN; CHEN, 2006).

### 2.3.1 Quanto à presença de nutrientes

#### 2.3.1.1 Cultivo Autotrófico

O cultivo autotrófico é característico de seres vivos que possuem a capacidade de realizar fotossíntese, utilizando como fonte de carbono o  $\text{CO}_2$ . A Figura 7 mostra o mecanismo utilizado pela microalga durante essa forma de cultivo:



**Figura 7.** Esquema simplificado da fotossíntese da microalga (“Sustainable Green Technologies Inc. - Algae FAQ”).

Este cultivo é o mais apropriado para ser utilizado como capturador de  $\text{CO}_2$  na atmosfera. Assim, é possível também utilizar um biorreator na saída de gases de um processo de tratamento de efluentes, a fim de capturar o  $\text{CO}_2$  para o crescimento de microalgas (CHIU et al., 2011).

A grande desvantagem deste tipo de sistema é o fato de que a luz acaba sendo um fator limitante quando a concentração se torna muito alta. O meio de cultivo torna-se denso o suficiente para que a luz não chegue ao centro do biorreator, incapacitando as células de obterem uma produtividade maior (GARCIA et al., 2005).

### 2.3.1.2 Cultivo Heterotrófico

O cultivo heterotrófico diferencia-se do autotrófico pelo fato da microalga utilizar uma fonte de carbono orgânica e não necessitar mais da luz para produzir energia.

As fontes de carbono podem ser diversas, tais como glicose, gliceróis ou acetatos (PEREZ-GARCIA et al., 2011). O cultivo é realizado em fermentadores escuros, tal como é utilizado para cultivar outros microrganismos, como bactérias.

O cultivo heterotrófico é uma alternativa a ser considerada para o crescimento de microalgas, visto que possuem algumas vantagens em relação ao cultivo autotrófico, como mostra a Tabela 3:

**Tabela 3:** Comparação entre as características do fotobiorreator e do fermentador (BEHRENS, 2005).

Característica	Fotobiorreator	Fermentador
fonte de energia	luz	carbono orgânico
densidade celular	baixa	alta
fator limitante de crescimento	luz	oxigênio
colheita	diluído, maior dificuldade	denso, menor dificuldade
geometria do vaso	depende da penetração da luz	independe da fonte de energia
controle de parâmetros	alto	alto
esterilidade	normalmente higienizado	pode ser esterilizado
disponibilidade dos vasos	feito sob medida	disponível comercialmente
tecnologia	relativamente nova	consolidada
custo de construção	alto por unidade de volume	baixo por unidade de volume
custo de operação	alto por unidade de biomassa	baixo por unidade de biomassa
microalga utilizada	alga fotossintética	alga heterotrófica

Além disso, a composição química das microalgas varia se cultivada em diferentes condições, como mostra a Tabela 4.

**Tabela 4:** Composição química de células de *Chlorella vulgaris* em cultivo autotrófico e heterotrófico (XU et al; 2006).

Componente (%)	Autotrófico	Heterotrófico
Proteína	52,64 ± 0,26	10,28 ± 0,10
Lipídio	14,57 ± 0,16	55,20 ± 0,28
Carboidrato	10,62 ± 0,14	15,43 ± 0,17
Cinzas	3,36 ± 0,05	5,93 ± 0,04
Umidade	5,39 ± 0,04	1,96 ± 0,02
outros	10,42 ± 0,65	11,20 ± 0,61

A desvantagem deste tipo de cultivo é o custo da fonte orgânica de carbono, que corresponde geralmente a 80 % do custo total do meio de cultivo (BHATNAGAR et al., 2011).

#### **2.3.1.3 Cultivo Mixotrófico**

A síntese de alguns produtos, como pigmentos, só é possível de maneira autotrófica, no entanto, a baixa produtividade inviabiliza a produção em larga escala. O cultivo mixotrófico pode simultaneamente ter características de ambos os metabolismos a altas taxas de produção (GARCIA et al., 2005).

De acordo com Garcia *et al.* (2005), a produção de biomassa nesse tipo de cultivo aumenta em comparação com o cultivo autotrófico, sendo que a iluminação necessária também é menor, diminuindo assim os custos energéticos para manter o cultivo.

Os resultados de Abreu *et al.* (2012) foram semelhantes, pois houve maior produção de biomassa nos cultivos mixotróficos nos quais foi adicionado soro de queijo. No mesmo trabalho, a produtividade de lipídeos também foi maior em cultivo mixotrófico com adição de soro de queijo do que num cultivo autotrófico.

### **2.3.2 Quanto à forma de condução do processo**

As técnicas de processamento, manipulação e colheita de microalgas é derivada de processos fermentativos genéricos, visto que são solidamente conhecidos e estudados há mais tempo. Obviamente, alguns parâmetros, tanto no biorreator, quanto no cultivo de microalgas foram modificados para a otimização do processo.

#### **2.3.2.1 Cultivo descontínuo**

O sistema descontínuo, ou em batelada, é a maneira mais simples de cultivar microalgas, ou até mesmo outros microrganismos. O cultivo possui um tempo determinado e existe uma variação na concentração de biomassa algal. Essa maneira é caracterizada por não haver retirada de meio de cultivo durante o tempo do processo, somente pequenas amostras para controle.

No início do cultivo, o meio de cultura é adicionado ao biorreator juntamente com o inóculo de microalga. O inóculo é a quantidade inicial de células que irão se reproduzir para formar a biomassa final de microalga. Após a inoculação do biorreator, as células possuem uma cinética típica de crescimento de microrganismos.

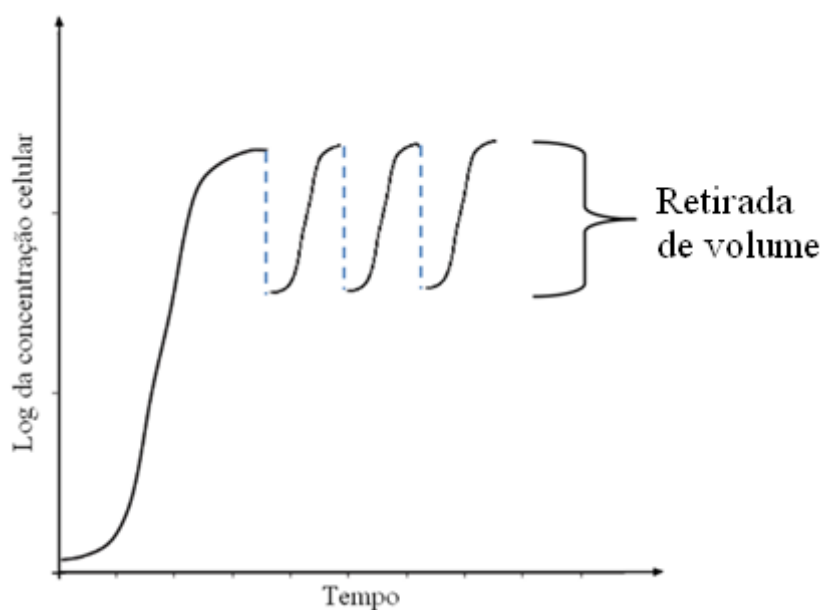


Existem muitas vantagens em cultivar microalgas dessa maneira, tais como: simplicidade de manutenção e versatilidade do biorreator, sendo possível alterar as condições do crescimento facilmente a fim de estudos cinéticos.

Por outro lado, a maior desvantagem é a baixa eficiência que o cultivo possui, além de possuir tempos mortos (preparo do biorreator, esterilização, preparo do inóculo), onde não há real uso do biorreator. Outro problema existente é o efeito “auto-sombreamento”, que ocorre quando a densidade celular cresce muito e dificulta a penetração da luz no interior do cultivo (LOURENÇO, 2006).

### 2.3.2.2 Cultivo semicontínuo

O processo semicontínuo é caracterizado pela retirada parcial do meio de cultivo com algas e a reposição por um meio de cultura sem células. Esse procedimento é normalmente realizado quando as microalgas ainda estão na sua fase inicial de crescimento e estão propícias a crescer de maneira exponencial, colocando o cultivo em um reciclo teoricamente sem limites (BORZANI, 2001). Essa maneira de cultivo possui uma curva característica de crescimento, mostrada na Figura 8:



**Figura 8:** Cinética genérica de cultivo semicontínuo.

É essencial que as condições do cultivo, assim como a concentração de nutrientes no meio novo após o corte (retirada do volume) sejam mantidas iguais, para que a microalga não passe de novo pela fase *lag*. Com esse procedimento, consegue-se obter um produto

do mesmo inóculo por um tempo muito maior. Não há tempos mortos, além do início do cultivo, entre um ciclo e outro.

A repetição de diluições em dias consecutivos permite remover grande biomassa algácea, e, no dia seguinte, dispor da mesma quantidade teoricamente para colher. Isso torna os cultivos semicontínuos muito produtivos e uma das melhores formas para obter biomassa constantemente. Existem produções de microalgas em grande porte para as espécies *Arthrospira*, *Dunaliella* e *Chlorella* (LOURENÇO, 2006).

A desvantagem desse tipo de cultivo é a alta possibilidade de contaminação devido às manipulações constante. Em laboratórios de pesquisa, isso pode ser algo muito desfavorável, mas existe a possibilidade de controle um pouco maior; em escala industrial, a contaminação é presente, exceto em biorreatores especiais. Além disso, células mais velhas permanecem no meio de cultivo, assim como substâncias excretadas anteriormente pelas células já presentes (BORZANI, 2001). Essas duas características podem comprometer a eficiência e produtividade do cultivo, sendo mais favorável o reinício do cultivo do que a manutenção prolongada do reciclo.

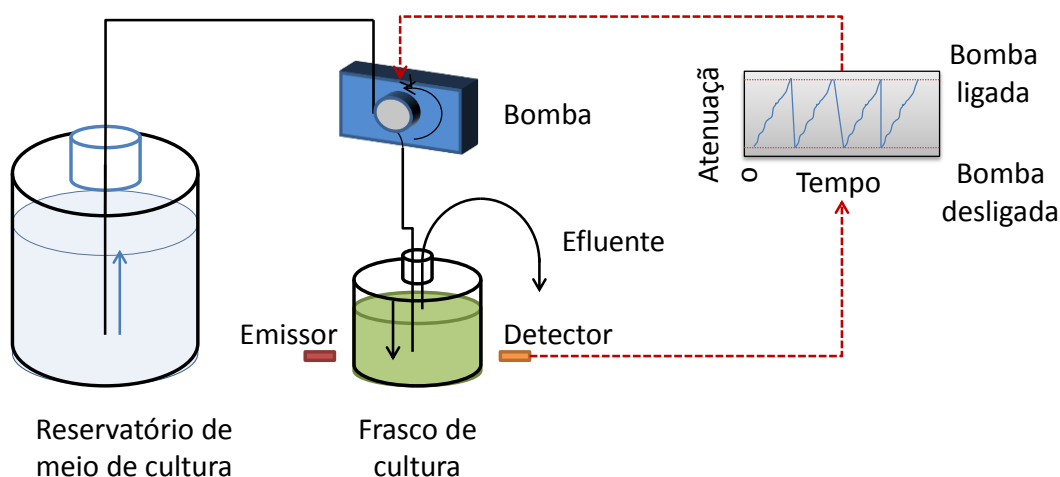
Henrard *et al.* (2011) mostraram que a microalga *Cyanobium* sp. apresenta a melhor resposta cinética a taxas de renovação entre 30 % e 50 %, com valores de taxa específica de crescimento, produtividade e número de ciclos de respectivamente  $0,127 \text{ d}^{-1}$ ,  $71 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  e 10.

Travieso *et al.* (2001) estudaram o cultivo semicontínuo da microalga *Spirulina platensis* e obtiveram melhores resultados de produtividade, com valor de  $400 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  a taxas de renovação de 20 %, onde as células não foram danificadas.

### **2.3.2.3 Cultivo contínuo**

Esta metodologia consiste em uma contínua retirada de cultura com células e reposição de meio de cultivo fresco. A composição do meio de cultivo, a irradiância da luz e a densidade da cultura são mantidas constantes durante todo o período do processo. As células ficam permanentemente na fase exponencial de crescimento, e podem ficar durante muito mais tempo do que em outras formas de cultivo.

A medição do crescimento é feita por sensores óticos, que regulam a vazão de entrada do meio de cultivo fresco, e saída da biomassa. Um esquema é representado na Figura 9 para melhor compreensão:



**Figura 9:** Representação esquemática de um processo contínuo. Adaptado de Behrens, P. W (2005).

No esquema, o emissor manda um sinal, que passa pelo meio de cultura e chega no detector; caso a turbidez do cultivo esteja fora do limite superior pré-estabelecido de atenuação, a bomba é ligada e manda meio de cultivo fresco para o biorreator. Após atingido o limite inferior de turbidez, a bomba é desligada. O volume é mantido constante devido à constante saída de meio de cultura que é drenado passivamente para fora do biorreator.

Esse tipo de cultivo fornece biomassa homogênea, com maior padronização e qualidade do que cultivos em batelada ou semicontínuos.

No entanto, o cultivo não pode permanecer operando por longo tempo, podendo ocorrer contaminação de outros microrganismos, mesmo problema encontrado no cultivo semicontínuo. Custos com automação e manutenção das condições de temperatura e iluminação são outros problemas presentes (MATA *et al*, 2010).

Reis *et al.* (1996) mantiveram um mecanismo de baixo custo operando continuamente durante 6 meses sem nenhum tipo de contaminação com um cultivo da microalga *Phaeodactylum tricornutum*. Para valores baixos de taxa de diluição, foram encontrados os maiores valores de biomassa e produtividade de lipídeos.

Mirón *et al.* (2003) conduziram experimentos de *Phaeodactylum tricornutum* em estado quase estacionário em fotobiorreatores ao ar livre a uma taxa de diluição de  $0,03 \text{ h}^{-1}$ . Os resultados obtidos nos biorreatores foram uma concentração de aproximadamente 1

g L<sup>-1</sup>, e produtividade de 300 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Como o experimento ocorreu ao ar livre, a fonte de luz era a irradiação solar, que variava de acordo com o dia, isso trouxe como consequências variação no perfil de produtos: em situações onde havia menos luminosidade, o acúmulo de pigmentos, clorofilas e carotenoides era favorecido; quando havia mais luz, a quantidade de carboidratos era maior, sendo que 20 % desses carboidratos eram consumidos durante a noite.

## 2.4 Colheita da biomassa

Um dos grandes impasses na comercialização das microalgas é o alto custo da colheita da biomassa, chegando a 30 % do custo em algumas vezes (GUDIN; THERPENIER, 1986). Por isso, é importante que existam pesquisas cujo foco é justamente esta parte do processamento.

A colheita é basicamente uma separação sólido-líquido, biomassa e meio de cultivo, respectivamente, que pode ser realizada através de sedimentação, centrifugação ou filtração (RICHMOND, 2004). Ainda pode ser feita também a floculação e flotação da biomassa (KIM et al., 2005).

O critério para seleção de qual método utilizar é basicamente a qualidade do produto de interesse. Para o tratamento de esgotos e efluentes, é mais aconselhável sedimentação; para microalgas com fins alimentícios, centrifugação (RICHMOND, 2004).

A seguir, cada um dos métodos será abordado, demonstrando suas vantagens e desvantagens.

### 2.4.1 Centrifugação

A centrifugação é uma operação unitária de grande uso na microbiologia, ela é basicamente uma sedimentação forçada.

A maioria das culturas de microalgas pode ser recuperada utilizando este método, sendo o mais aconselhável para o procedimento segundo Heasman *et al.* (2000). As eficiências de recuperação variam de acordo com, dentre outros fatores, a força centrífuga aplicada à biomassa. Há maneiras de melhorar a separação do meio de cultivo da biomassa a partir da equação (1) que mostra a velocidade terminal da partícula no processo de centrifugação ( $u_c$ ):

$$u_c = \frac{(\rho_p - \rho_f)d_p^2\omega^2r}{18\mu_f} \quad (1)$$

Onde  $\rho_p$  é a densidade da partícula,  $\rho_f$  é a densidade do meio de cultivo,  $d_p$  é o diâmetro da partícula,  $\omega$  é a velocidade angular da centrífuga,  $r$  é o raio do tambor da centrífuga e  $\mu_f$  é a viscosidade do meio de cultivo. A velocidade terminal está diretamente relacionada à eficiência da centrifugação, pois, quanto maior a velocidade terminal, menor o tempo de residência do cultivo dentro da centrífuga e maior a separação sólido-líquido.

De maneira a aumentar a velocidade terminal, pode-se utilizar microalgas com diâmetro maior, aumentando a diferença entre as densidades da partícula e do meio de cultivo, diminuindo a viscosidade do meio e aumentando a velocidade angular da centrifugação. Este último parâmetro é o mais comumente utilizado. A velocidade angular é mais usualmente comparada à velocidade da partícula somente sob ação da gravidade, denotando essa razão como  $Z$ , de acordo com a equação (2):

$$Z = \frac{\omega^2 r}{g} \quad (2)$$

onde  $g$  é a aceleração da gravidade. Assim, a força centrífuga é  $Z$  vezes a força da gravidade.

De acordo com Heasman *et al.* (2000), com uma força equivalente a  $13\,000 \times g$ , a eficiência de recuperação de biomassa é de 95 %, diminuindo para 60 % em  $6\,000 \times g$  e 40 % em  $3\,000 \times g$ .

A desvantagem desta operação é que ela é energeticamente muito cara, apesar de ser relativamente rápida.

#### 2.4.2 Filtração

A filtração também pode ser empregada no processo de colheita da biomassa de microalgas, sendo utilizado comumente em grande escala para microalgas relativamente grandes (GRIMAA *et al.*, 2003). Porém, para microalgas cujo tamanho celular é menor, a filtração não se mostra muito eficiente.

Conforme Mohn (1980), a espécie *Spirulina plantesis*, cujo tamanho celular é relativamente grande, obteve uma separação via filtração efetiva, enquanto que espécies menores, como *Chlorella* e *Dunaliella* demonstraram dificuldade no processo, pois passam pelo filtro, tornando-o inviável.

Embora ainda com suas desvantagens, a filtração é uma das melhores opções para a colheita e recuperação de uma biomassa microalgal com menor umidade do que a centrifugação. A Figura 10 mostra o processo de filtração em uma esteira visto de cima.



**Figura 10:** Foto tirada de cima de uma esteira filtradora (“Innovation: A Lean, Green Machine | Inc.com”).

### 2.4.3 Sedimentação

A sedimentação permite a deposição das células no fundo do tanque de sedimentação. Porém, isso não é natural para a maioria das espécies de microalgas, uma vez que elas são naturalmente adaptadas para permanecer em suspensão para receber luz.

Para espécies esféricas, como a *Chlorella*, a taxa de assentamento das células é dada pela Lei de Stokes (SHELEF; SUKENIK; GREEN, 1984):

$$V = \frac{gd^2(\rho_f - \rho_p)}{18\eta} \quad (3)$$

Onde  $V$  é a velocidade da partícula,  $g$  é a força da gravidade,  $d$  é o diâmetro da partícula,  $\rho_f$  e  $\rho_p$  são a densidade do meio de cultivo e da partícula, respectivamente e  $\eta$  é a viscosidade do meio.

O método é aplicável para espécies de alta densidade celular, porém, não é eficiente, nem rápido. Uma possível melhora no processo de sedimentação seria utilizar flocculantes para a colheita (KWIETNIEWSKA et al., 2012).

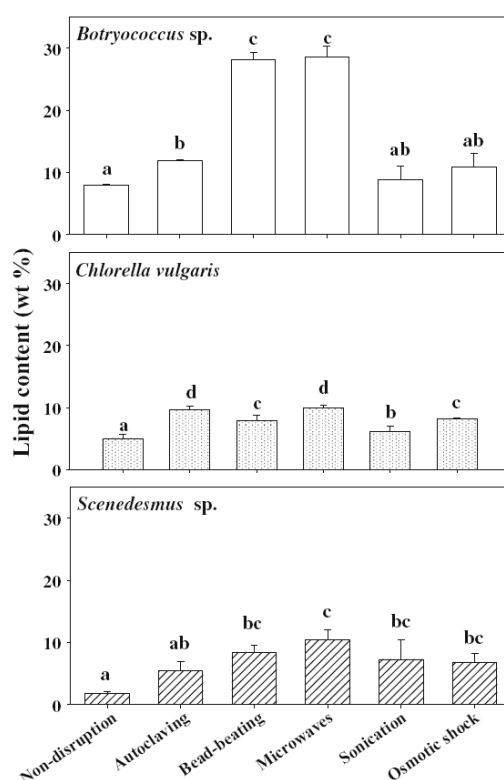
## 2.5 Pré-tratamentos para extração

Durante a etapa de extração de lipídeos da microalga, é possível expor os metabólitos

intracelulares ao meio a fim de facilitar a extração dos mesmos, rompendo a parede celular através de pré-tratamentos nas células da microalga. A eficiência da extração de lipídeos, por exemplo, está diretamente ligada ao pré-tratamento correto realizado na biomassa (HALIM *et al.*, 2012).

O mecanismo que explica a maior facilidade para a extração é a exposição dos produtos do metabolismo que não são excretados de dentro da célula para o meio. Assim, na extração, o solvente pode interagir diretamente com os produtos sem ter que penetrar na célula, resultando em um processo mais eficiente e menos demorado (HALIM *et al.*, 2012).

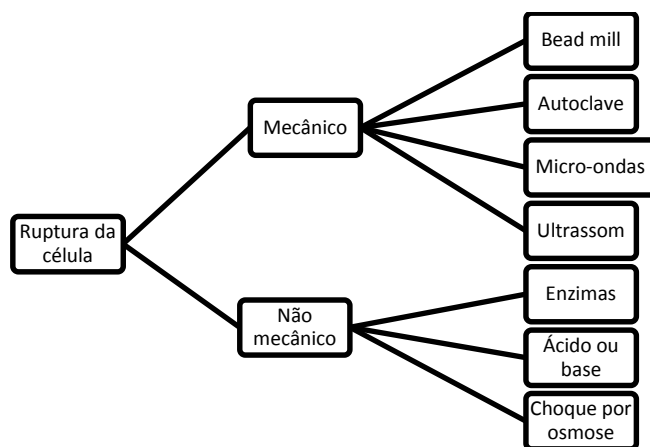
Lee *et al.* (2010a) realizaram experimentos com diferentes pré-tratamentos (autoclave, *bead-beating*, micro-ondas, sonicação e choque osmótico) seguido de extração de lipídeos via solvente em três espécies diferentes de microalgas: *Botryococcus sp.*, *Scenedesmus sp.*, *Chlorella vulgaris*, como mostra a Figura 11. Os melhores resultados obtidos com todas as espécies foram com a utilização do pré-tratamento com micro-ondas.



**Figura 11:** Influência do pré-tratamento na extração de lipídeos (LEE et al., 2010a)

Os métodos para a ruptura da parede celular podem ser classificados em dois grandes grupos: processos mecânicos e não mecânicos. Dentre os mecânicos, estão o *bead mill*,

autoclavagem, micro-ondas, ultrassom, entre outros; não mecânicos incluem a quebra da parede celular por enzimas, por ação de ácidos ou bases e um choque osmótico. A Figura 12 mostra um esquema simplificado para melhor compreensão dos métodos:

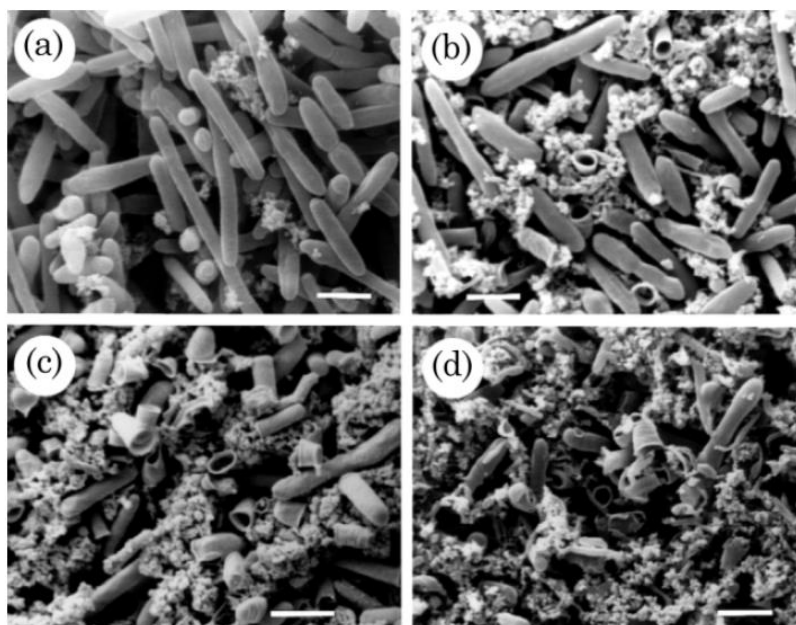


**Figura 12:** Esquema dos principais métodos para o pré-tratamento da biomassa, adaptado de HALIM *et al.* (2012).

A escolha de cada método varia de acordo com o produto que se deseja extrair das microalgas e a resistência oferecida pela parede celular (RICHMOND, 2004).

A Figura 13 mostra uma comparação entre pré-tratamentos em *Lactobacillus delbrueckii* SSP, evidenciando que o conteúdo intracelular fica exposto ao meio. Nota-se que, na Figura 13(b), apenas uma parte das células ficam com o conteúdo intracelular exposto, evidenciando que o tratamento com ultrassom não é muito efetivo para este tipo de microrganismo. Nas Figuras 13(c) e 13(d), a quebra celular foi muito mais efetiva, pois quase não há células inteiras na imagem; evidenciando que o tratamento com *bead mill* e homogeneização de alta pressão são muito mais eficientes para o *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*.





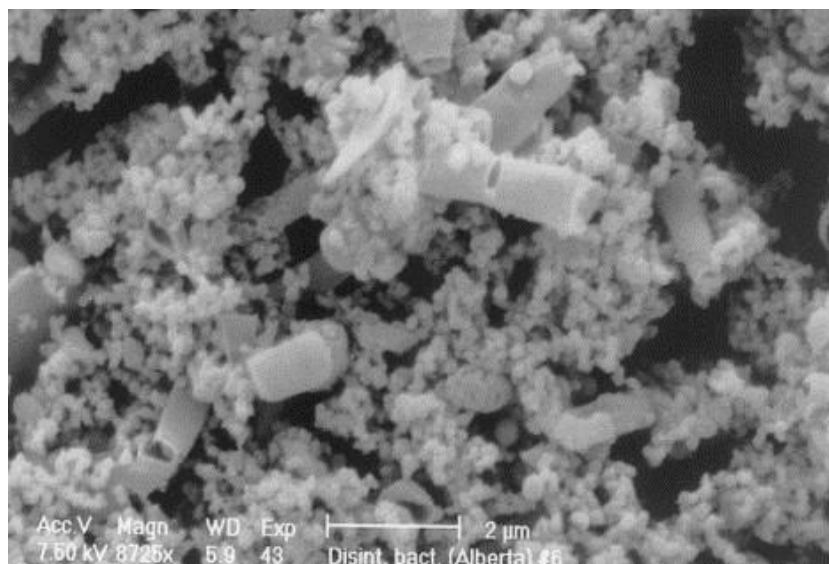
**Figura 13:** Imagem de microscopia eletrônica mostrando células de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (a) antes do tratamento, (b) após ultrassom durante 6 minutos, (c) após passagem por bead mill durante 6 minutos e (d) após um homogeneizador de alta pressão a 200 MPa (BURY *et al.*, 2001)

### 2.5.1 *Bead mill*

*Bead mill* é a técnica onde a biomassa é colocada junto a esferas muito pequenas (até 700 µm de diâmetro) de vidro, ou algum outro material, dentro de um agitador. O choque físico entre as pérolas e as células resulta em uma ruptura da parede celular, expondo todo o material celular ao meio.

Os principais fatores que influenciam a eficiência do processo são a velocidade de agitação, densidade celular, tamanho e quantidade de pérolas em suspensão (RICCI-SILVA *et al.*, 2000). A grande vantagem do *bead mill* é que pode ser operado em processo contínuo e em grande escala. Esta técnica já é usada em escala laboratorial para obtenção de metabólitos intracelulares em outros microrganismos, tais como bactérias (MAYERHOFFA *et al.*, 2008) e leveduras (SCHÜTTE *et al.*, 1983).

A Figura 14 mostra o microrganismo *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* cultivado em leite desnatado após o tratamento com *bead mill*.



**Figura 14:** Foto de microscopia de varredura eletrônica de *Lactobacillus delbrueckii* após o tratamento com bead mill (GECIOVA *et al.*, 2002).

### 2.5.2 Micro-ondas

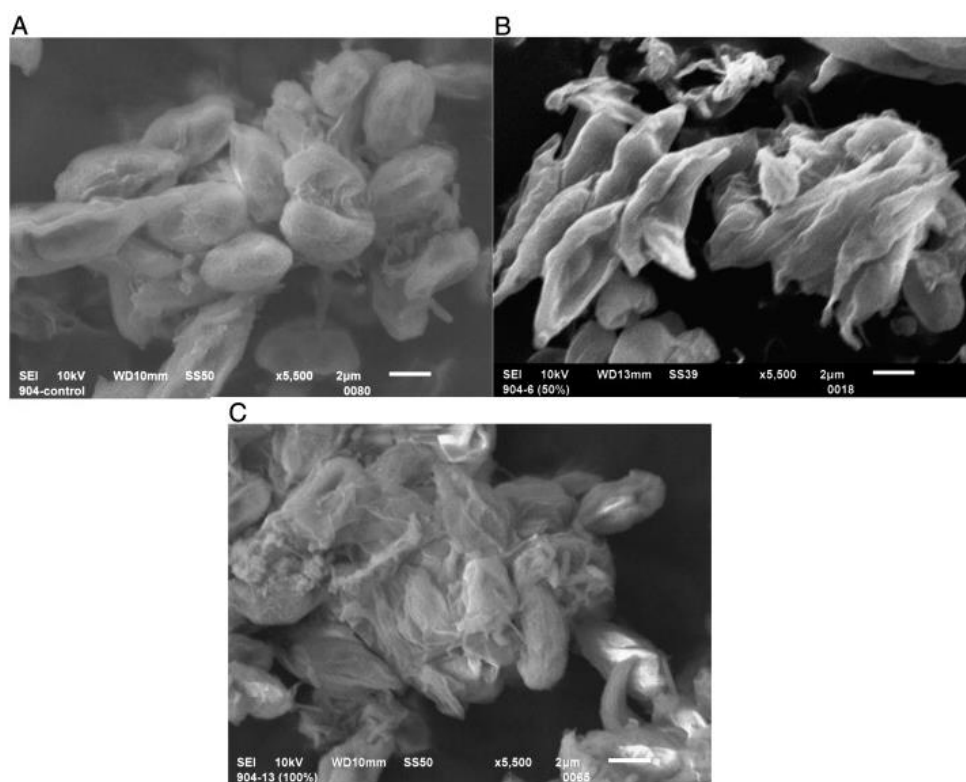
Micro-ondas são radiações pertencentes ao espectro eletromagnético na faixa de 300 MHz a 300 GHz. Para o uso doméstico e industrial de aquecimento via micro-ondas, duas frequências são mais utilizadas: 0,915 GHz e 2,45 GHz (THOSTENSON; CHOU, 1999).

Quando a biomassa é atingida pelas micro-ondas, a água presente dentro da célula é aquecida, virando vapor que quebra a parede celular de dentro para fora (LEE *et al*, 2012).

Lee *et al.* (2010a) fizeram comparações entre métodos para ruptura celular e verificaram que o pré-tratamento com micro-ondas foi o que apresentou melhor resultado. Dentre as espécies testadas, todas apresentaram maior porcentagem de extração de lipídeos utilizando esta técnica. Também foi observado que ela é, dentre as testadas, a mais simples, fácil e eficiente para a proposta do trabalho.

A Figura 15 mostra os resultados do pré-tratamento com micro-ondas em *Nannochloropsis* sp. após a extração. Nas Figuras 15(B) e 15(C) as células da microalga estão completamente destruídas e muito diferentes do formato inicial na Figura 15(A). Na Figura 15(B), a ruptura da parede celular é bastante evidente, com células totalmente expostas. O tratamento com micro-ondas expôs o conteúdo celular ao meio, tornando a extração de lipídeos mais fácil e efetiva. Iqbal e Theegala (2013) utilizaram este pré-tratamento para melhorar a extração, testando solventes diferentes para determinar a

quantidade de lipídeos da microalga *Nannochloropsis* sp. Foram testados B20 , B40, contendo 20 % e 40 % de biodiesel em etanol, respectivamente, e a mistura clorofórmio e etanol.



**Figura 15:** Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de *Nannochloropsis* sp. mostrando a eficiência da destruição da parede celular com micro-ondas. Em (A), células intactas antes do pré-tratamento, (B) mostra as células após extração a 100 °C com etanol, e (C) após extração com uma mistura 1:2 (v/v) de clorofórmio e etanol (IQBAL; THEEGALA, 2013).

### 2.5.3 Autoclave

O método de ruptura da célula via autoclave inclui utilizar uma câmara onde a água é aquecida até 121 °C e fica pressurizada a aproximadamente 101,35 kPa manométrica. O mecanismo é semelhante ao utilizado na técnica de micro-ondas, porém, na autoclave o calor que é transmitido para a célula é de fora para dentro do microrganismo, enquanto que no método utilizando micro-ondas, é o oposto (LEE *et al.*, 2012).

Lee *et al.* (2010), em seus experimentos, chegaram a bons resultados para ruptura da célula com o uso da autoclave, mas apenas com uma das espécies testadas. No entanto, Lee *et al.* (2012) afirmam que a efetividade do método é baixa por causa da parede celular, que é mais facilmente rompida de dentro para fora, como ocorre no tratamento com micro-ondas.

Alguns experimentos foram realizados para testar a eficiência do método (VISWANATHAN *et al.*, 2012), mas não houve diferença significativa o uso ou não da técnica não para as microalgas testadas.

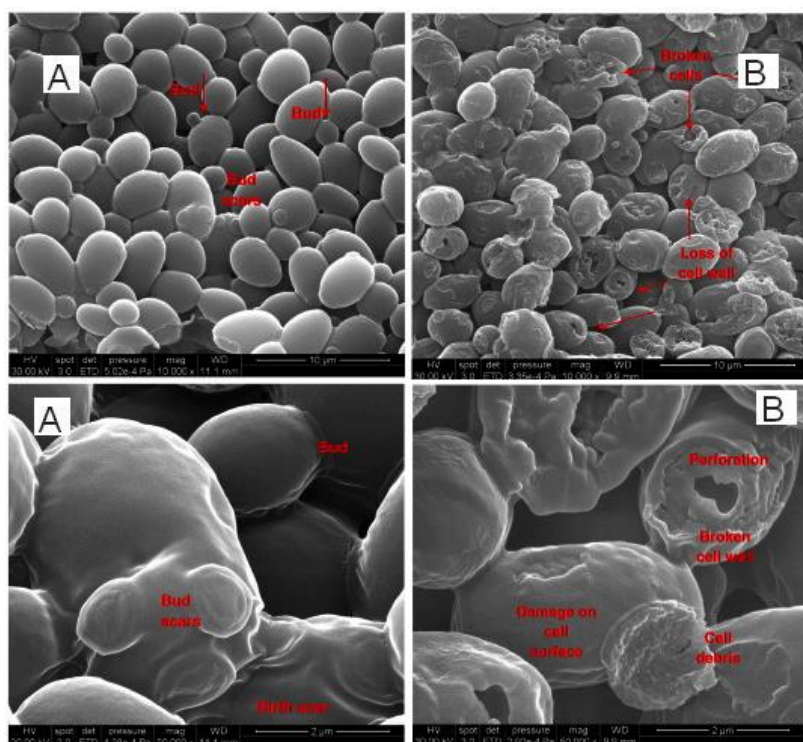
#### 2.5.4 Ultrassom

O ultrassom é um dos métodos mais utilizados em laboratório para ruptura celular (GECIOVA *et al.*, 2002). Ele consiste basicamente na geração de ondas sonoras com frequência de 25 kHz num volume de 1 mL até 2,0 L de amostra (LEE *et al.*, 2012).. A célula é rompida por causa da cavitação provocada pela ruptura das bolhas criadas pelas ondas diretamente na parede celular da microalga.

O método é utilizado em banhos ultrassônicos, que são preenchidos com água, onde o equipamento emite ondas na frequência desejada. Existem fatores que influenciam a eficiência da ruptura celular, sendo eles: temperatura do banho, tempo de exposição, adição de pérolas de vidro e viscosidade da suspensão de biomassa (LEE *et al.*, 2012):

- Quanto menor a temperatura do banho, menor a pressão de vapor do líquido, aumentando as chances de uma bolha mais rápida colidir com uma célula, causando maior cisalhamento;
- Quanto maior o tempo de exposição, maior o número de células que serão rompidas;
- A adição de pérolas de vidro promove uma maior força de colisão;
- Uma viscosidade baixa permite uma ação mais efetiva das bolhas.

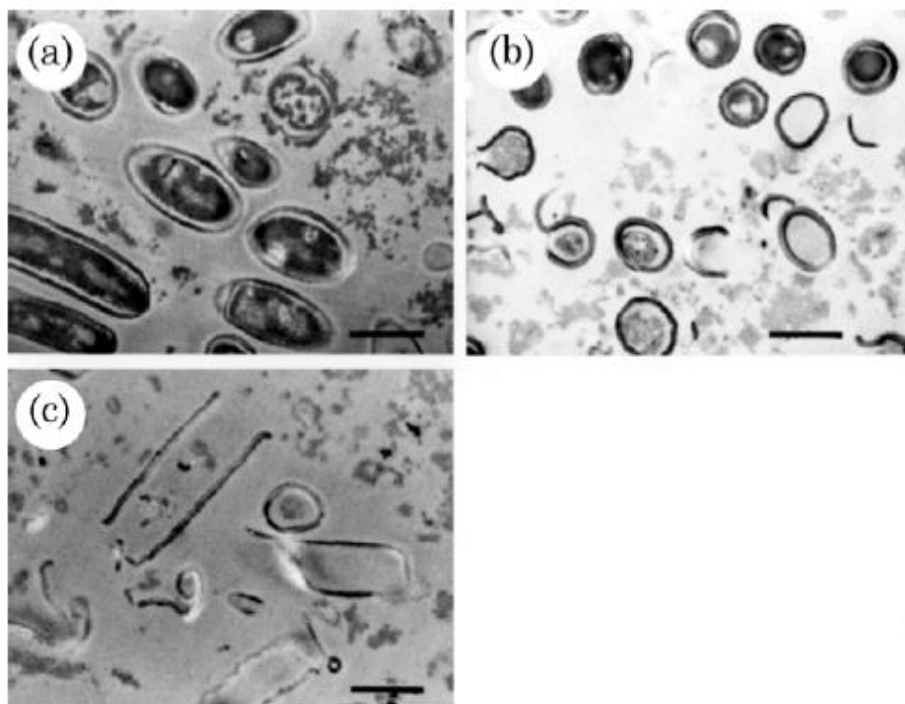
A Figura 16 mostra os efeitos do pré-tratamento de ultrassom a quente em uma imagem de microscopia eletrônica de varredura da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Nota-se que as células em (A) estão intactas, sem nenhuma ruptura; porém, após passarem pelo pré-tratamento, pequenos orifícios na superfície da célula aparecem, sendo alguns mais profundos do que outros.



**Figura 16:** Imagem de microscopia eletrônica de varredura de *Saccharomyces cerevisiae* (A) antes de pré-tratamento com ultrassom a quente e (B) após o procedimento (MARX *et al.*, 2011)

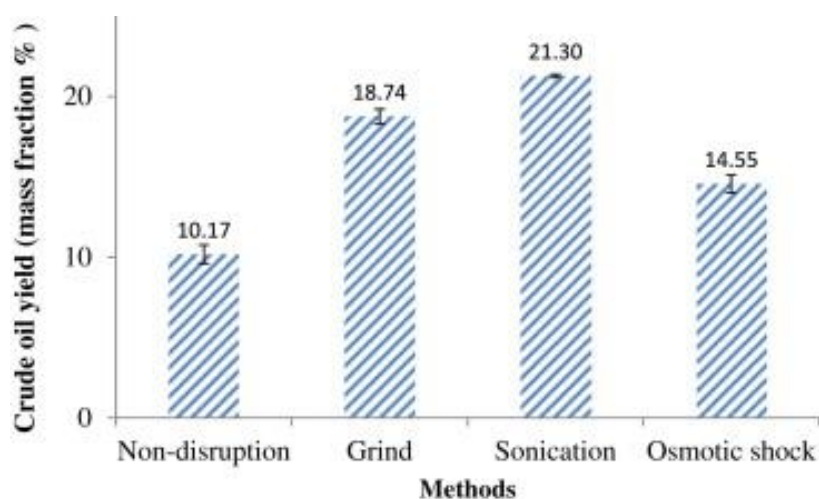
As conclusões sobre o uso de ultrassom como pré-tratamento são diferenciadas, Prabakaran *et al.* (2011) concluíram que este método é o melhor dentre os testados e possui maior chance de ser aplicado industrialmente, contudo Lee *et al.* (2010a) não obtiveram resultados tão bons para esta técnica quanto para outras testadas.

Uma diferença que pode ser percebida entre os métodos é mostrada na Figura 17, onde se observa em (a) a célula intacta, em (b) a célula após ultrassom, sendo que há células com a parede celular parcialmente rompida, com algumas partes ainda inteiras contendo citoplasma, e, em (c), células totalmente rompidas via *bead mill*, mostrando somente fragmentos de paredes celulares. Tal efeito observado por Bury *et al.* (2001) foi a explicação para a diminuição da atividade de  $\beta$ -galactosidase associada às células que não se romperam totalmente utilizando a técnica de ultrassom.



**Figura 17:** Imagem de microscopia eletrônica mostrando células de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (a) antes do tratamento, (b) após ultrassom, (c) após passagem por bead mill (BURY et al, 2001)

Kaiwan *et al.* (2012) realizaram experimentos com a microalga *Synechocystis aquatilis*, sendo que os resultados mostraram que há uma extração mais eficiente quando é utilizado algum tipo de pré-tratamento, como mostra a Figura 18:



**Figura 18:** Gráfico comparativo entre métodos de pré-tratamentos na *Synechocystis aquatilis* (KAIWAN-ARPORN et al., 2012).

É possível perceber que o método mais eficiente avaliado é o de ultrassom, e que houve maior extração quando algum pré-tratamento foi aplicado.

## **2.6 Extração de lipídeos**

### **2.6.1 Bligh n' Dyer**

A técnica criada por Bligh e Dyer é antiga (1959), ela consiste em misturar 100 mL de metanol e 100 mL clorofórmio a uma amostra de 100 g, agitando durante 3 min. O sistema formado então é monofásico e tem como objetivo inicial extrair totalmente para o meio os lipídeos presentes na amostra. Adiciona-se então, mais 100 mL de clorofórmio à mistura para aumentar ainda mais a solubilidade de lipídeos (BLIGH; DYER, 1959).

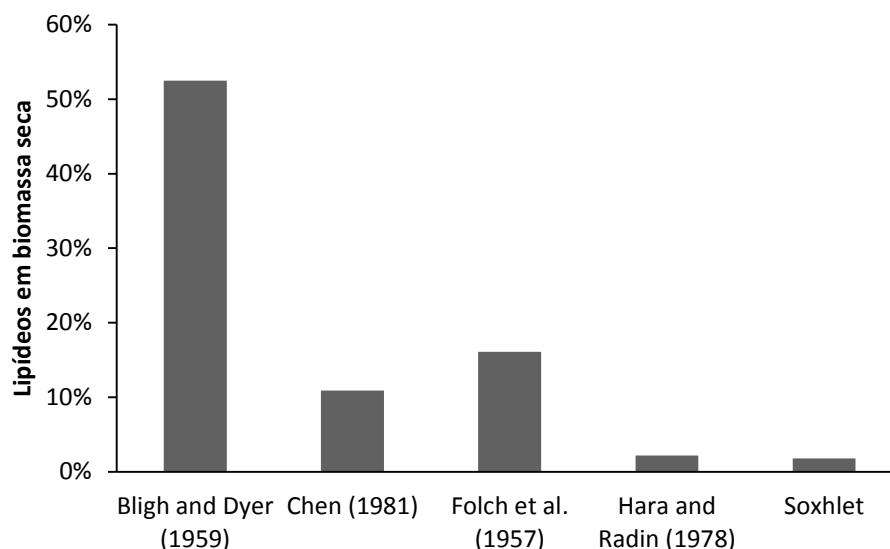
Então, água é adicionada ao sistema, formando um ternário bifásico, onde há a fase orgânica, formada pelo clorofórmio e pelos lipídeos, e a fase aquosa, constituída por água e metanol. As duas fases são então separadas em um funil de decantação e a fase orgânica é evaporada. Por análise gravimétrica, é possível avaliar a quantidade de lipídeos presente na amostra (SMEDES; THOMASEN, 1996).

O objetivo da adição de metanol e clorofórmio à amostra é dissolver tanto gorduras polares (fosfolipídeos e ácidos graxos livres), quanto apolares (triglicerídios). Após a adição da água, somente a fase com clorofórmio mantém a solubilidade dos lipídeos (SMEDES; THOMASEN, 1996).

A técnica de *Bligh n' Dyer* era originalmente usada em amostras de mamíferos, mas atualmente é utilizada em diversos tipos de materiais (EWALD *et al.* , 1998), como microalgas, peixes, plantas, entre outros.

Uma desvantagem do método é que ele carrega, na extração, outros materiais solúveis no solvente orgânico, como constatou Archanaa *et al.* (2012), que sugeriu um tratamento primário a fim de eliminar a interferência de clorofila nas amostras com dimetilsulfóxido (DMSO).

A Figura 19 mostra a comparação entre diferentes métodos feita por Araujo *et al.* (2013) em seu estudo com a microalga *Chlorella vulgaris*. É possível observar que o método *Bligh n' Dyer* é bastante superior a qualquer um dos outros analisados, porém, o método Soxhlet não foi realizado com o solvente comumente utilizado (hexano), e sim com acetona. Isso pode afetar bastante no resultado final.



**Figura 19:** Comparação entre métodos para extração de lipídeos da microalga *Chlorella vulgaris*; adaptado de Araujo *et al* ( 2013).

### 2.6.2 Soxhlet

A extração com solvente orgânico em escala laboratorial é, em sua maioria, realizada em batelada, com a utilização de grandes volumes de solvente, para lavar o extrato quantas vezes forem necessárias. Uma maneira de aumentar a eficiência foi proposta por Franz von Soxhlet em 1879, um aparato que permitia o refluxo de solvente a uma temperatura relativamente elevada, aumentando a eficiência da extração.

A Figura 20 mostra um esquema simplificado do aparelho Soxhlet. O solvente orgânico é aquecido até a evaporação e condensado na parte de cima. Então, ele entra em contato com a amostra assim que volta ao estado líquido, extraindo os lipídeos e outros compostos solúveis. Quando a quantidade de solvente presente no compartimento da amostra excede o nível máximo, o sifão retorna o solvente contendo os compostos solúveis para o frasco onde ele estava inicialmente. O ciclo é repetido durante o tempo que for necessário para que a extração se complete (DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010).

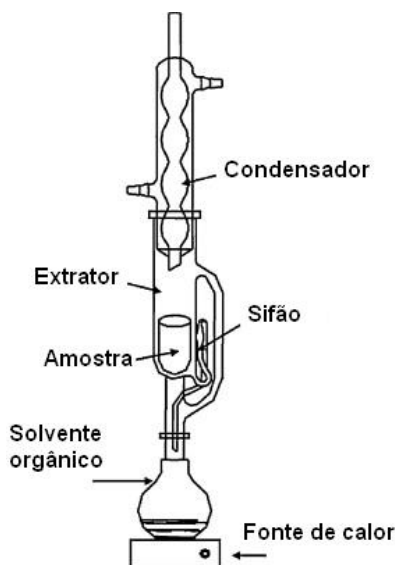
A vantagem de manter o solvente puro em contato com a amostra facilita a extração devido ao deslocamento do equilíbrio de transferência de massa, além de poder manter o processo funcionando continuamente. Tais vantagens levam a técnica de Soxhlet a ser uma das mais utilizadas na extração de lipídeos e outros compostos. As principais



desvantagens do Soxhlet são a alta temperatura utilizada, que pode decompor compostos termolábeis, e a falta de agitação, que poderia aumentar a eficiência do processo (DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010).

Existem aparelhos que realizam a técnica com o mesmo princípio básico do Soxhlet, porém com automação e maior quantidade de extrações simultâneas, como Soxtec (ZYGLER *et al.*, 2012). Existem muitas variações da técnica, como extração Soxhlet assistida por ultrassom, assistida por micro-ondas, sob alta pressão, entre outras mais (DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010). Existe ainda a possibilidade de misturar solventes para uma maior eficiência (HALIM *et al.*, 2012).

Ramluck (2014) avaliou o melhor solvente dentre 13 ou combinação deles para a extração de lipídeos via Soxhlet. Os solventes que conduziram aos melhores resultados foram clorofórmio, etanol e hexano; a mistura de 1:1 clorofórmio: etanol foi a mais eficiente dentre todas, chegando a 11,76 % de conteúdo lipídico em biomassa seca. Também foram estudados quais parâmetros devem ser limitados para que esse método seja viável em grande escala, como um tempo máximo para a extração (3 h) e apenas o uso de 2 solventes em uma mistura.

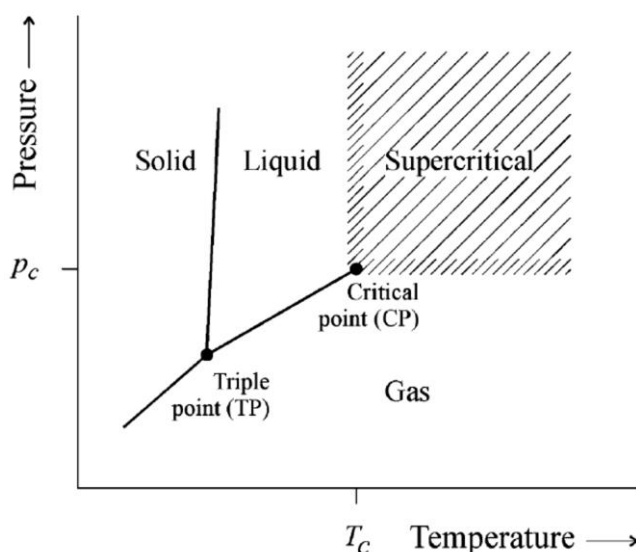


**Figura 20:** Aparelho Soxhlet, adaptado de De Castro & Priego-Capote (2010).

### 2.6.3 Fluido Supercrítico

O princípio básico do método com fluido supercrítico é pressurizar um gás, normalmente CO<sub>2</sub>, além do ponto crítico, formando um fluido que possui características

tanto de líquido quanto de gás (HALIM *et al.*, 2012). A Figura 21 mostra o diagrama *Temperatura x Pressão* para um gás genérico, onde, a partir do ponto CP, o fluido torna-se supercrítico.



**Figura 21:** Diagrama de fases de um gás genérico (BRUNNER, 2005)

O  $\text{CO}_2$  é normalmente escolhido devido à sua pressão crítica moderada, além de sua baixa temperatura crítica não decompor compostos termolábeis de interesse na extração (HALIM *et al.*, 2012).

O modo de operação deste método é bastante simples: uma estação pressuriza o  $\text{CO}_2$ , e este é bombeado até um vaso de extração, onde a temperatura já está adequada para manter o fluido no estado supercrítico. Dentro do vaso, há a microalga misturada a terras diatomáceas, que aumentam consideravelmente a superfície de contato da pasta microalgal, aumentando a eficiência do processo. Em seguida, o fluido supercrítico é transferido através de uma válvula micrométrica para descomprimir o  $\text{CO}_2$ , que evapora, precipitando os lipídeos no vaso de recolhimento (HALIM *et al.*, 2012).

Halim *et al.* (2012) concluíram em seu trabalho que a eficiência da extração variava muito mais com o aumento da pressão do que com o aumento da temperatura, obtendo maior teor lipídico a uma pressão de 30 MPa. O aumento da pressão aumenta a densidade do fluido, elevando o poder de solubilidade do mesmo. Porém, o custo de operação aumenta bastante e leva a uma menor seletividade.

A utilização de solvente supercrítico é uma técnica com potencial para a substituição de solventes orgânicos, visto que é menos agressivo ao meio ambiente (CHENG et al., 2011). Em comparação com solventes orgânicos, o uso de fluido supercrítico leva vantagens em tempo de operação, não necessita uma pós separação entre solvente e lipídeos e não é tóxico ou inflamável (HALIM *et al.*, 2012).

### **3 Metodologia**

#### **3.1 Microalga e meio de cultivo**

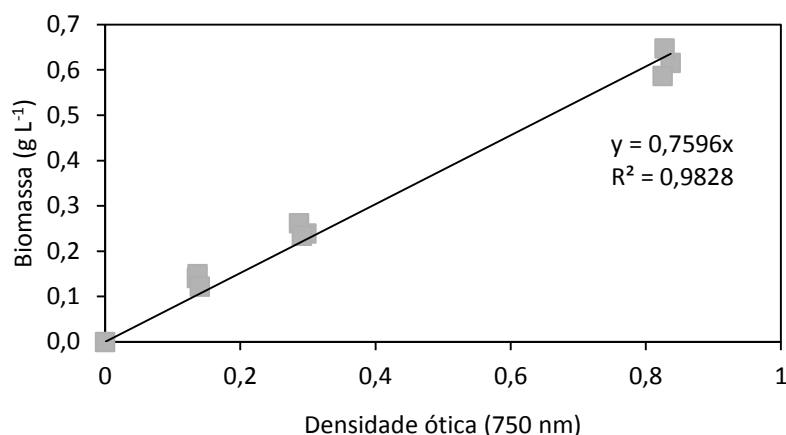
Neste trabalho, foram utilizadas as microalgas *Chlorella minutissima* e *Chlorella* sp, cujas cepas foram cedidas pelo professor Sérgio Lourenço do Laboratório de Fisiologia e Cultivo de Algas do Departamento de Biologia Marinha da Universidade Federal Fluminense.

O meio de cultivo base utilizado é o meio Guillard - “f1/2” (Lourenço, 2006) modificado, utilizando água do mar artificial contendo (por litro): 34 g de sal marinho (Red Sea), 1 mL de solução de fosfato de sódio ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ), 1 mL de solução de silicato de sódio ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ), 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 (por litro): 9,8 mg de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 22 mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 mg de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 180 mg de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 6,3 mg de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 4,36 g de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  e 3,15 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . A solução de vitaminas contém (por litro): 100 mg de tiamina, 0,5 mg de cianocobalamina e 0,5 mg de biotina. Em cada cultivo adicionou-se  $\text{NaNO}_3$  conforme a quantidade definida para cada experimento. 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.

O meio foi esterilizado em autoclave e as soluções estoque foram adicionadas depois para evitar precipitação ou degradação térmica.

#### **3.2 Acompanhamento do crescimento das microalgas**

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. A curva padrão, da biomassa relacionada com a densidade ótica para *Chlorella* sp está mostrada na Figura 22.



**Figura 22:** Relação entre biomassa e densidade ótica a 750 nm para *Chlorella* sp.

Alíquotas de aproximadamente 2 mL para a medida de crescimento eram coletadas duas vezes ao dia em duplicata pela manhã e início da noite, totalizando 12 pontos.

### 3.3 Pré-inóculo

A microalga foi pré-inoculada em frascos Erlenmeyer de 500 mL, sendo utilizados 10 mL de cultura estoque da microalga e 100 mL de meio de cultivo, e colocadas em estufa rotatória (Figura 23) com agitação de 90 rpm e temperatura e 30 °C com iluminação constante por lâmpadas eletrônicas totalizando 64 W (aproximadamente 2,5 klx). Após 7 dias, foram adicionados mais 100 mL de meio de cultivo e o cultivo foi mantido por mais 7 dias. Para a inoculação dos biorreatores, o conteúdo dos frascos Erlenmeyer foi homogeneizado em um recipiente estéril, a fim de erradicar variações devido à diferença no crescimento entre as microalgas na estufa rotatória.



**Figura 23:** Estufa rotatória com os pré-inóculos das microalgas.

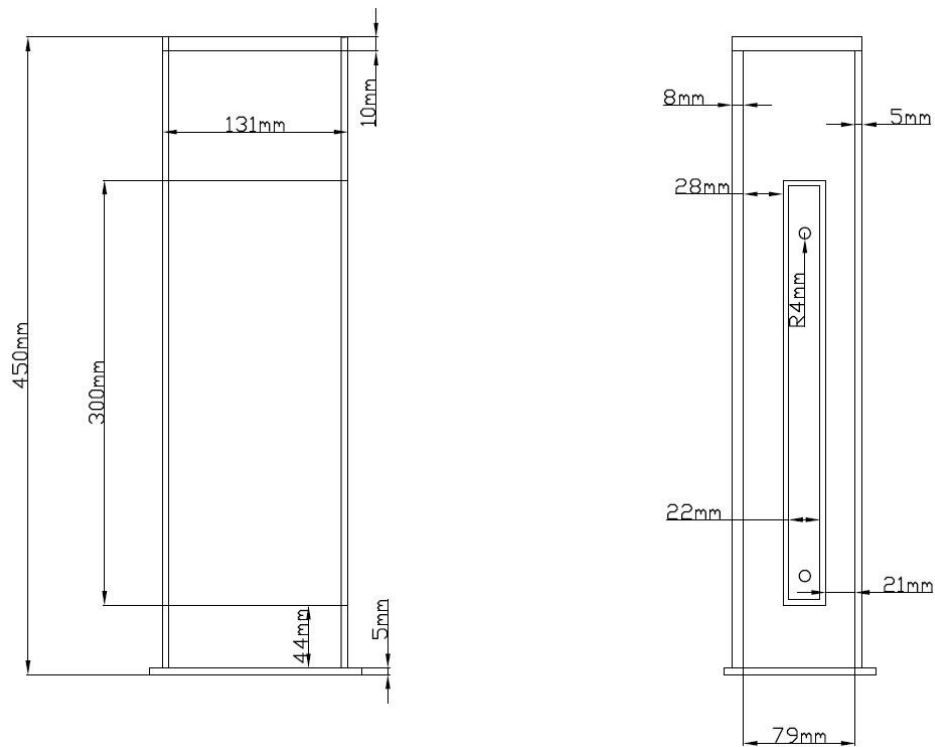
### 3.4 Cultivo em fotobiorreator

Neste trabalho, foram realizados experimentos em fotobiorreatores do tipo *air-lift* com *loop* externo feitos de acrílico, cujo volume útil é de 2,50 L; também possuem uma camisa interna para a troca de calor com o banho termostático para o controle da temperatura do fotobiorreator, mantida a 28 °C para o cultivo. As dimensões úteis externas do reator são as seguintes: altura, 450 mm; largura, 150 mm; profundidade, 79 mm; como mostra a Figura 24.

A assepsia dos biorreatores foi realizada com uma solução comercial de 5 mL L<sup>-1</sup> de hipoclorito de sódio. Após 15 min, o cloro ativo foi neutralizado com 2,5 mL de solução de tiosulfato de sódio 250 g L<sup>-1</sup>. Essa água de lavagem foi descartada e os meios de cultivo foram colocados nos reatores.

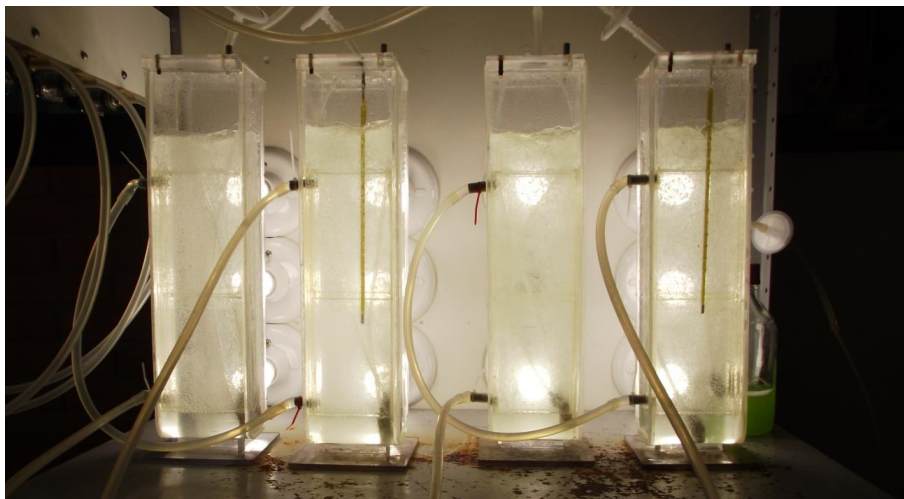
Uma corrente de ar comprimido filtrado com membrana de 0,22 µm (Midisart®2000 da Sartorius Stedim Biotech) foi distribuída e medida por rotâmetros individuais para cada reator com vazão de 1,0 L min<sup>-1</sup>. Os filtros de ar foram usados para que possíveis sujeiras presentes na tubulação não contaminassem o cultivo. Nos cultivos de *C. sp* para diferentes concentrações iniciais de NaNO<sub>3</sub>, a corrente de ar foi enriquecida com CO<sub>2</sub> por um cilindro do gás a uma vazão de 1,0 L min<sup>-1</sup>, dividida uniformemente nas entradas de ar de cada reator, a partir do dia em que foi atingida uma concentração mínima de biomassa de 0,40 g L<sup>-1</sup>.

Todos os cultivos foram suplementados com 1,0 mL L<sup>-1</sup> de cada uma das soluções estoque de nutrientes (fosfato, silicato, solução de metais-traço e vitaminas) diariamente para garantir que não haveria limitação do crescimento devido à falta dos mesmos.



**Figura 24:** Vista lateral do fotobiorreator utilizado (KOCHEM et al., 2014)

A Figura 25 mostra os biorreatores no primeiro dia de cultivo. Ainda bastante diluídas, com um verde claro, as microalgas encontram-se na fase de adaptação ao meio de cultivo.



**Figura 25:** Foto dos biorreatores em start-up.

Após o término dos cultivos, o conteúdo dos fotobiorreatores foi centrifugado a aproximadamente  $5\,000 \times g$  durante 10 min para separar a biomassa do meio de cultivo. A biomassa foi então liofilizada por 48 h a uma temperatura de  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A liofilização garante um armazenamento melhor da biomassa para que não haja degradação.

### **3.5 Estudo da influência do pré-tratamento para a extração de lipídeos**

Foram realizadas quatro técnicas para avaliar a eficácia do pré-tratamento na quebra da parede celular das células. Todos ensaios foram realizados em duplicata.

#### **3.5.1 Ultrassom**

Cerca de 1,0 g de biomassa seca foi pesada em um tubo falcon de plástico e foram adicionados 3 mL de água destilada. A mistura foi colocada em um banho de ultrassom durante 10 min, a uma potência de 150 W e frequência de ultrassom de 40 kHz.

#### **3.5.2 Autoclave**

Aproximadamente 1,0 g de biomassa seca foi hidratada com 3 mL de água destilada e colocada na autoclave. A amostra ficou durante 10 min a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e em seguida retirada (FLORENTINO DE SOUZA SILVA et al., 2014).

#### **3.5.3 *Bead beating***

Cerca de 1,0 g de biomassa seca foi hidratada com 3 mL de água destilada, adicionando 1 mL de pérolas de vidro de 0,5 mm de diâmetro. A mistura foi agitada em *vortex* durante 10 min (MIRANDA; PASSARINHO; GOUVEIA, 2012).

#### **3.5.4 Micro-ondas**

Aproximadamente 1,0 g de biomassa seca foi hidratada com 3 mL de água destilada e colocada em um forno de micro-ondas. A amostra ficou durante 10 min na potência de 100 W.

### **3.6 Estudo da influência do íon nitrato**

A fim de avaliar a diferença de alimentação do nutriente nitrato no cultivo, foram realizados dois experimentos:

#### **3.6.1 Influência da concentração de $\text{NaNO}_3$ no meio de cultivo**

Quatro diferentes condições de cultivo foram testadas em duplicata, diferenciando-se entre elas a concentração inicial de  $\text{NaNO}_3$ :  $300\text{ mg L}^{-1}$ ,  $600\text{ mg L}^{-1}$ ,  $900\text{ mg L}^{-1}$  e  $75\text{ mg L}^{-1}$  (meio Guillard f/2).



### 3.6.2 Influência da adição de NaNO<sub>3</sub> em etapas

Foram escolhidos quatro tempos diferentes de adição do sal NaNO<sub>3</sub>, de acordo com a Tabela 5. A adição de NaNO<sub>3</sub> foi realizada através da adição de um volume adequado de solução-padrão de NaNO<sub>3</sub> (75 g L<sup>-1</sup>). Os experimentos foram realizados em duplicata.

**Tabela 5:** Planejamento experimental para adição de NaNO<sub>3</sub>.

	Tempo (h)					Concentração adicionada de NaNO <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )
	0	24	48	72	96	
<b>1 × 300 mg L<sup>-1</sup></b>	300	0	0	0	0	
<b>2 × 150 mg L<sup>-1</sup></b>	150	0	0	150	0	
<b>3 × 100 mg L<sup>-1</sup></b>	100	0	100	0	100	
<b>5 × 60 mg L<sup>-1</sup></b>	60	60	60	60	60	

### 3.7 Cultivo semicontínuo

Foi avaliado a viabilidade de produção da microalga *Chlorella* sp. em cultivo semicontínuo, uma vez que a produtividade desse método de cultivo é muito maior do que em batelada. As condições foram testadas em duplicata. Para essa experiência, foi realizado o seguinte planejamento:

**Tabela 6:** Planejamento experimental para o cultivo semicontínuo.

ID	Volume de Corte	Tempo de Corte
<b>1/6 - 24 h</b>	1/6	24 h
<b>1/6 - 48 h</b>	1/6	48 h
<b>1/3 - 24 h</b>	1/3	24 h
<b>1/3 - 48 h</b>	1/3	48 h

O volume do cultivo foi retirado, de acordo com a quantidade e tempo mostrados na Tabela 6, e substituído por meio de cultivo novo, com nutrientes adicionados normalmente.

### 3.8 Análises

Durante os cultivos, uma alíquota de aproximadamente 2 mL foi retirada diariamente de cada um dos reatores e centrifugada a aproximadamente 5 000 × g durante 5 min. O sobrenadante foi guardado e congelado, assim como o as microalgas precipitadas.

### 3.8.1 Extração de lipídeos

A extração de lipídeos foi realizada pós-colheita, com a biomassa liofilizada. Duas técnicas foram utilizadas para a operação:

#### 3.8.1.1 Soxhlet

A análise de lipídeos totais foi realizada através de equipamento Soxhlet (Foss /Soxtec 2055™).

Foi realizado um ciclo de extração a 135 °C com duração de 70 min, utilizando 100 mL de éter de petróleo para amostras de algas liofilizadas de aproximadamente 0,10 g pesadas em balança analítica dentro do cartucho do equipamento.

Os copos de solvente foram inicialmente secos em estufa, permaneceram por 30 min dentro de dessecador e após foram pesados em balança analítica. No final da extração, os copos foram novamente colocados em estufa por 15 min, colocados 30 min no dessecador e pesados em balança analítica. A diferença encontrada entre o peso final e inicial dos cartuchos é a massa de lipídeos presente na amostra.

#### 3.8.1.2 Bligh n' Dyer

Pesou-se aproximadamente 1,0 g de amostra liofilizada de microalga, e, em um vidro fechado, colocou-se também 20 mL de metanol, 10 mL de clorofórmio e 8 mL de água. A solução foi agitada por 20 min em agitador magnético. Após, adicionou-se mais 10 mL de metanol e uma solução 10 % em peso de sulfato de sódio e água e a agitação é continuada por mais 2 min. A solução foi então vertida em um funil de separação, dentro do qual, as duas fases (clorofórmio contendo lipídeos e metanol e água) são separadas. A parte de baixo constitui o clorofórmio coletado e, a ele, foram adicionados mais 1 g de sulfato de sódio anidro. A solução foi então filtrada, sendo que 5 mL foram colocados em um béquer previamente tarado sendo a solução evaporada em estufa. As análises foram feitas em duplicata. Por diferença analítica é calculado o teor de lipídeos na amostra, segundo a equação (4):

$$\% \text{ lipídeos} = 100 \frac{m \times 4}{g} \quad (4)$$

Onde:  $p$  é o peso dos lipídeos (g) contido em 5 mL, e  $m$  é a massa da amostra (g).

### **3.8.2 Medida da concentração do íon nitrato**

A análise de nitrogênio foi realizada conforme a metodologia desenvolvida por Cataldo *et al* (1975).

Uma alíquota de 0,25 mL de amostra do sobrenadante do fotobiorreator foi colocada em um frasco âmbar, junto com 0,8 mL de uma solução 5 % de ácido salicílico em ácido sulfúrico concentrado. Após 20 min, foram adicionados 19 mL de uma solução 2 M de NaOH para elevar o pH acima de 12. Em temperatura ambiente, as amostras foram medidas em espectrofotômetro a 410 nm e comparadas a uma curva padrão realizada diariamente com uma solução de concentração conhecida de N-NO<sub>3</sub>.

### **3.9 Análise estatística**

A análise dos dados foi realizada através de regressão linear múltipla, teste de Tukey e análise de variância pelo *software* Statistica 7.0 (StatSoft Inc.).

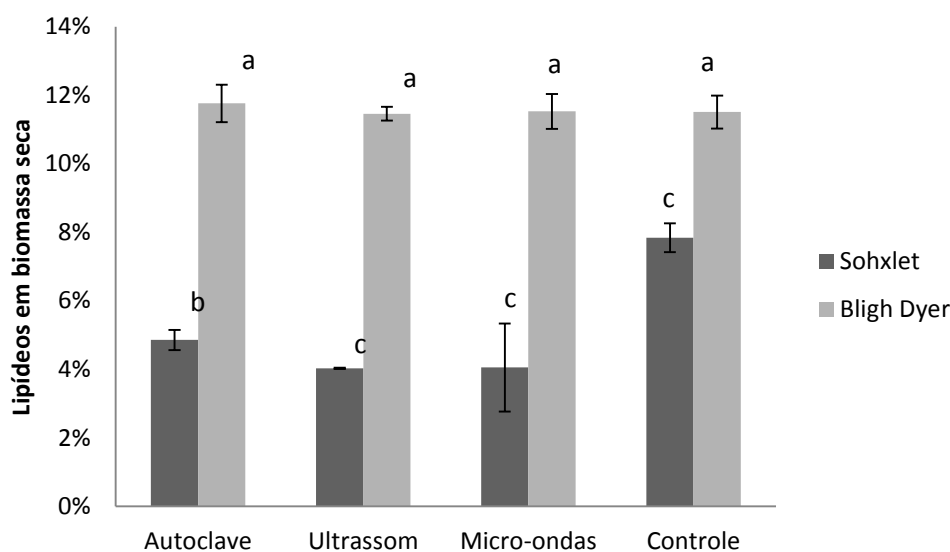
### **3.10 Reagentes**

Todos os reagentes utilizados no trabalho experimental desta dissertação de mestrado foram de grau analítico das seguintes marcas: Sigma-Aldrich, Dinamica, Nuclear, Synth, Vetec e Proton.

## 4 Resultados e discussão

### 4.1 Pré-tratamento

Dois cultivos com microalgas diferentes foram realizados para a determinação da eficiência de um pré-tratamento para melhor extração dos lipídeos. A Figura 26 e a Tabela 7 mostram os resultados da extração de lipídeos da *Chlorella minutissima*, obtidos utilizando duas técnicas de extração e submetidas a diferentes pré-tratamentos. A Figura 27 e a Tabela 8 indicam os resultados para a *Chlorella* sp.

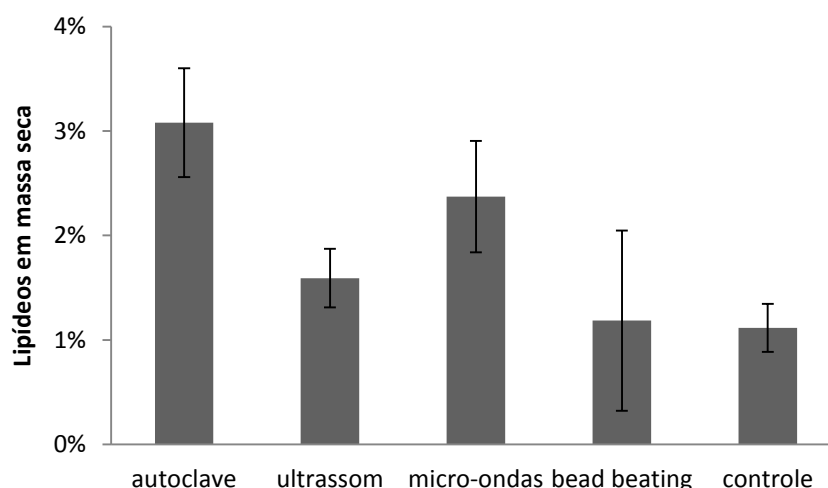


**Figura 26:** Comparação de conteúdo lipídico em biomassa seca para *C. minutissima* extraído com Soxhlet e Bligh n Dyer.

**Tabela 7:** Comparação de conteúdo lipídico em biomassa seca para *C. minutissima* extraído com Soxhlet e Bligh n Dyer submetida a diferentes pré-tratamentos

Pré-tratamento	Lipídeos (%) <sup>*</sup>	
	Bligh Dyer	Soxhlet
Controle	11,5 ± 0,6 <sup>a</sup>	7,84 ± 0,30 <sup>b</sup>
Micro-ondas	11,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	4,06 ± 0,02 <sup>c</sup>
Autoclave	11,8 ± 0,5 <sup>a</sup>	4,86 ± 1,29 <sup>c</sup>
Ultrassom	11,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	4,03 ± 0,42 <sup>c</sup>

<sup>\*</sup> Letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 27:** Comparação de conteúdo lipídico em biomassa seca para *Chlorella* sp. extraído com Soxhlet.

**Tabela 8:** Conteúdo lipídico em biomassa seca para *Chlorella* sp. extraído com Soxhlet.

Pré-tratamento	Lipídeos (%) <sup>*</sup>
Controle	1,12 ± 0,23 <sup>a</sup>
Micro-ondas	2,37 ± 0,53 <sup>a</sup>
Autoclave	3,08 ± 0,52 <sup>a</sup>
Ultrassom	1,59 ± 0,28 <sup>a</sup>
Bead beating	1,19 ± 0,86 <sup>a</sup>

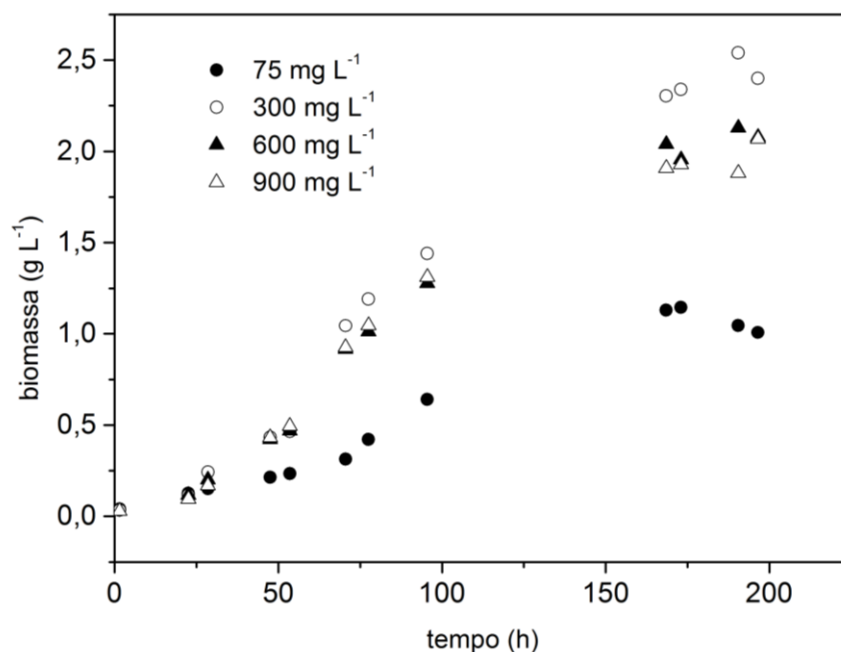
<sup>\*</sup> Letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

A comparação das médias pelo teste de Tukey mostra que não há diferença significativa entre os pré-tratamentos quando a extração é realizada via Bligh n' Dyer, onde todos os valores alcançam aproximadamente o mesmo patamar (11,5 %). Em comparação, na técnica de Soxhlet, o maior valor é aquele onde não há nenhum tipo de pré-tratamento realizado, chegando a 8,0 % de lipídeos. A comparação das médias mostrou que existe diferença significativa somente para a extração onde não houve pré-tratamento na biomassa. A partir desse resultado, nota-se também a diferença entre as técnicas de extração de lipídeos, sendo Bligh n' Dyer a mais eficiente para extração entre as duas, sendo utilizado como método principal para as extrações seguintes.

O experimento envolvendo pré-tratamentos na microalga *Chlorella* sp., representado na Figura 27, mostrou resultados diferentes. No entanto, não houve diferença significativa entre elas. Lee *et al.* (2010a) concluíram que, para *Chlorella* sp., autoclave e micro-ondas são os melhores métodos de quebra da parede celular.

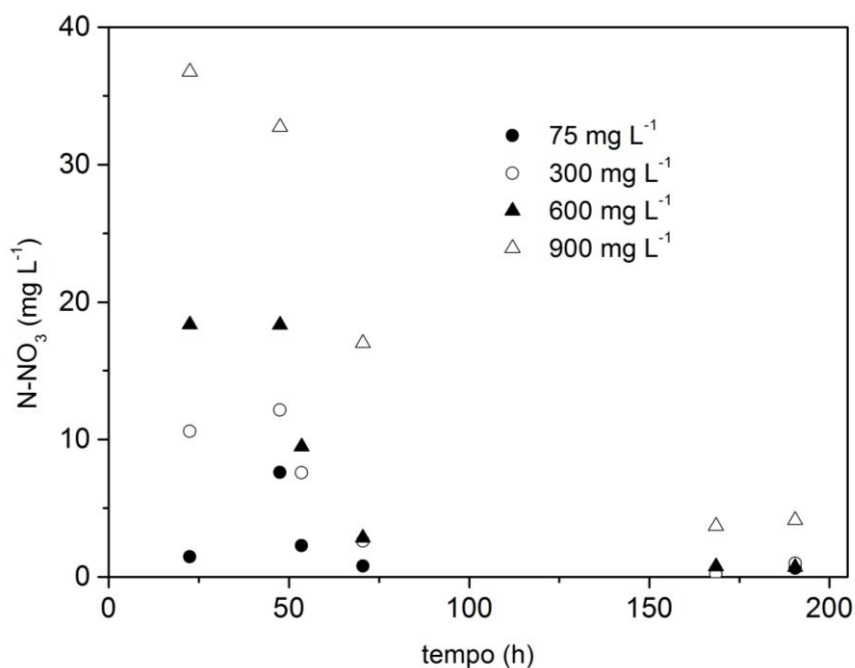
## 4.2 Concentração de $\text{NaNO}_3$

Os experimentos envolvendo diferentes concentrações iniciais apresentaram resultados bastante satisfatórios no estudo da microalga *Chlorella* sp. A Figura 28 mostra a curva de crescimento da *Chlorella* sp. para diferentes concentrações iniciais de  $\text{NaNO}_3$ .

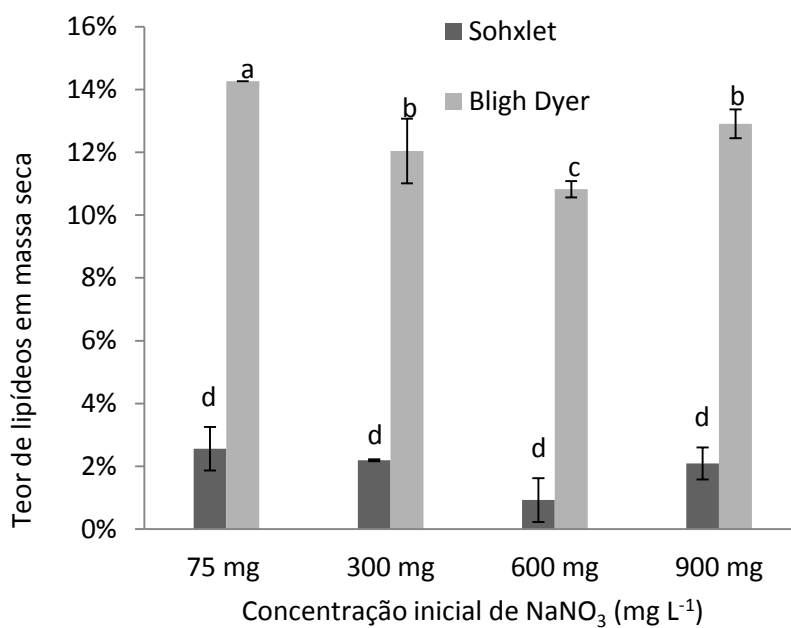


**Figura 28:** Curva de crescimento da *Chlorella* sp. com diferentes concentrações iniciais de  $\text{NaNO}_3$ .

A Figura 29 a seguir mostra o consumo do íon nitrato pela microalga *Chlorella* sp. com diferentes concentrações iniciais de  $\text{NaNO}_3$ . A Figura 30 apresenta a quantidade de lipídeos em biomassa seca de *Chlorella* sp. para diferentes concentrações iniciais de  $\text{NaNO}_3$ .



**Figura 29:** Curva de consumo do íon nitrato em *Chlorella* sp. com diferentes concentrações iniciais de  $\text{NaNO}_3$ .



**Figura 30:** Quantidade de lipídeos em biomassa seca de *Chlorella* sp. com diferentes concentrações iniciais de  $\text{NaNO}_3$ .

Na Tabela 9, tem-se a produção de biomassa e lipídeos por *Chlorella* sp. em diferentes concentrações iniciais de  $\text{NaNO}_3$ .

**Tabela 9:** Produção de biomassa e lipídeos por *Chlorella* sp. em diferentes concentrações iniciais de NaNO<sub>3</sub>.

Concentração inicial de nitrato (mg L <sup>-1</sup> )	Biomassa final (g L <sup>-1</sup> )	Lipídeos (%)	Produtividade de lipídeos (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Produtividade de biomassa (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
<b>900</b>	2,14 ± 0,03 <sup>b</sup>	12,9 ± 0,01 <sup>b</sup>	33,7 ± 0,05 <sup>a</sup>	260 ± 3,63 <sup>b</sup>
<b>600</b>	2,15 ± 0,11 <sup>b</sup>	10,8 ± 1,03 <sup>c</sup>	28,5 ± 3,01 <sup>b</sup>	262 ± 14,0 <sup>b</sup>
<b>300</b>	2,48 ± 0,07 <sup>a</sup>	12,0 ± 0,30 <sup>b</sup>	36,5 ± 0,66 <sup>a</sup>	302 ± 9,54 <sup>a</sup>
<b>75</b>	1,04 ± 0,18 <sup>c</sup>	14,3 ± 0,46 <sup>a</sup>	18,1 ± 1,15 <sup>c</sup>	127 ± 23,3 <sup>c</sup>

\* Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Nota-se que as curvas apresentam formas e fases semelhantes, mas aquelas com adição de NaNO<sub>3</sub> tiveram concentração de biomassa muito maior. Apenas com a pequena quantidade de nitrato presente no meio Guillard f/2 (75 mg L<sup>-1</sup>), a microalga *Chlorella* sp não cresce eficientemente, tornando-se necessário o uso de um reforço nutritivo em relação ao nitrato.

A curva de consumo do nitrato, representada na Figura 29, mostra padrões semelhantes da metabolização deste pela microalga *Chlorella* sp, independente da concentração inicial. Os valores de concentração finais também são aproximadamente os mesmos, com exceção do cultivo com 900 mg L<sup>-1</sup> de NaNO<sub>3</sub> iniciais. Nota-se que o nitrato é quase todo consumido em aproximadamente 70 h para os cultivos, com exceção daquele com a concentração inicial de 900 mg L<sup>-1</sup>. Porém, a concentração de biomassa continua aumentando por mais tempo até entrar na fase estacionária.

Na Figura 30, são comparados os percentuais de lipídeos em biomassa seca nos cultivos. Nota-se uma relação inversamente proporcional com a produção de lipídeos e a concentração inicial de nitrato, com exceção de 900 mg L<sup>-1</sup>. O resultado é o mesmo do que aquele encontrado na literatura (GAO et al, 2013; HARWATI et al, 2012; RICHMOND, 2004), uma vez que a microalga tende a acumular lipídeos na ausência ou escassez de nitrato. De acordo com o teste de Tukey ( $p > 0,05$ ), o meio padrão Guillard f/2, com apenas 75 mg L<sup>-1</sup> de NaNO<sub>3</sub> alcançou um acúmulo de lipídeos significativamente maior do que os demais, cuja concentração de nitrogênio disponível era no mínimo quatro vezes maior. O resultado esperado para o cultivo com 900 mg L<sup>-1</sup> de NaNO<sub>3</sub> mostrou uma tendência não reportada na literatura, no qual a produção de lipídeos pela célula aumentou com mais nitrogênio disponível no meio de cultivo.



A técnica Bligh Dyer é muito mais eficiente do que a extração via Soxhlet com éter de petróleo, muito provavelmente por causa da polaridade dos solventes utilizados, visto que a primeira usa solventes polares (água e metanol) e apolares (clorofórmio), enquanto que outra, apenas apolar.

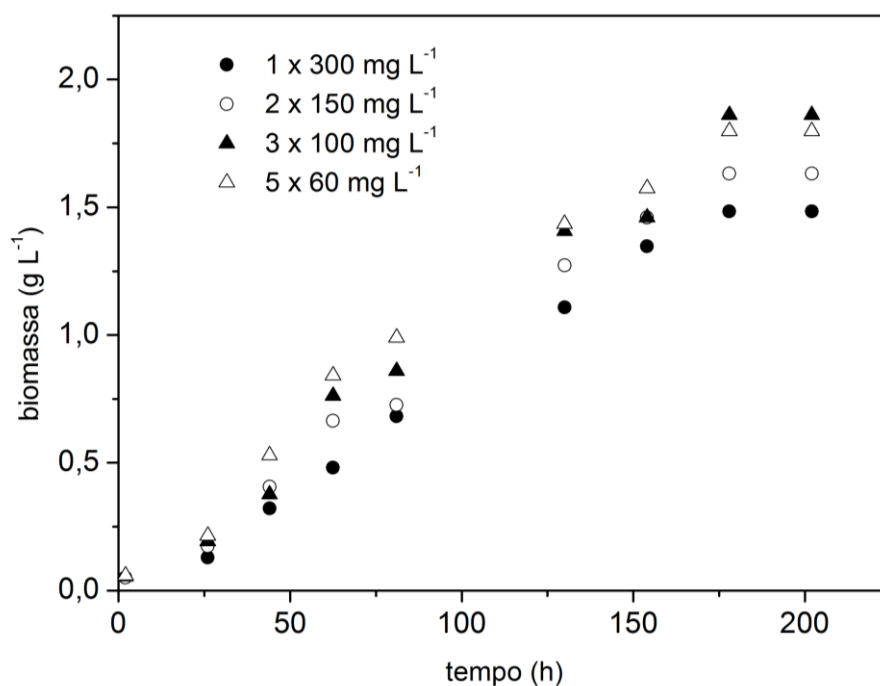
Como é possível notar a partir da Tabela 9, a produtividade de lipídeos é aproximadamente duas vezes maior nos cultivos onde houve suplementação de  $\text{NaNO}_3$  no meio f/2. A baixa concentração de nitrato aumenta o acúmulo de lipídeos, mas deixa o cultivo deficiente em relação à produção de biomassa, que implica diretamente na baixa produção lipídica. A comparação de médias mostrou que não existe diferença significativa para a produtividade de lipídeos entre as condições com  $300 \text{ mg L}^{-1}$  e  $900 \text{ mg L}^{-1}$ . A Figura 31 mostra a diferença de crescimento que existe entre as diferentes condições de cultivo.



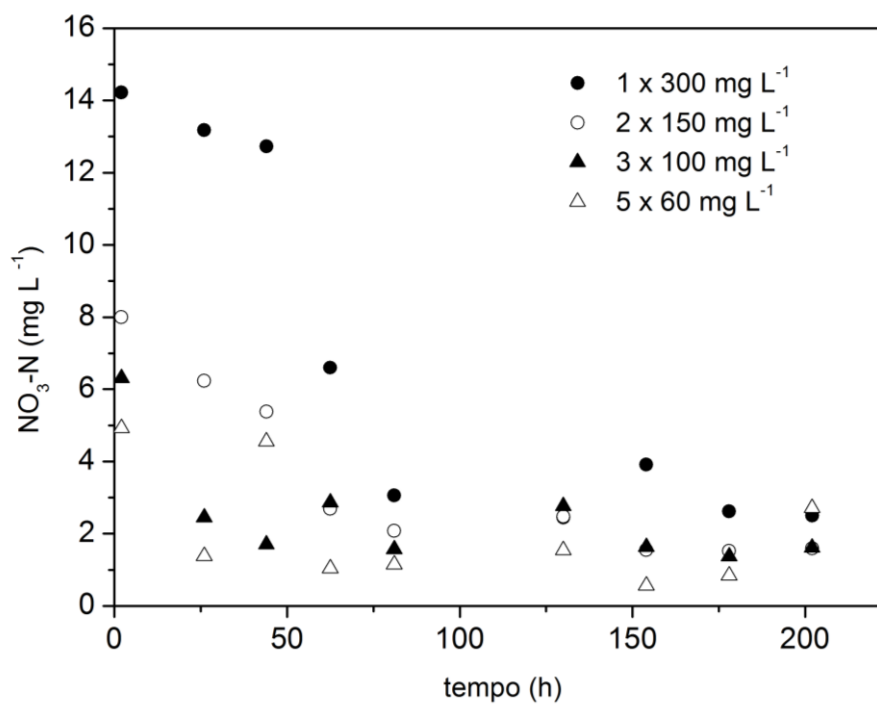
**Figura 31:** Cultivo de *Chlorella* sp. em diferentes concentrações de  $\text{NaNO}_3$  em duplicata: (a)  $75 \text{ mg L}^{-1}$ ; (b)  $300 \text{ mg L}^{-1}$ ; (c)  $600 \text{ mg L}^{-1}$ ; (d)  $900 \text{ mg L}^{-1}$ .

### 4.3 Adição de $\text{NaNO}_3$ em etapas

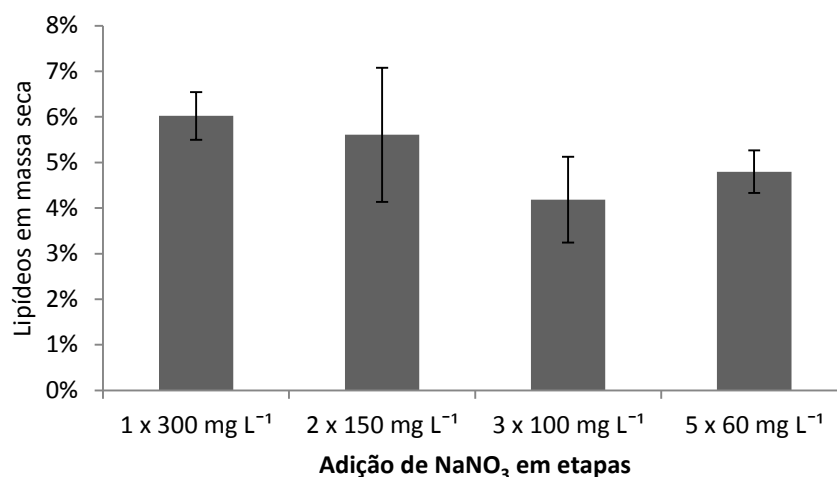
Escolhida a condição de  $300 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_3$  iniciais, foi proposto um novo experimento para adicionar este nutriente em etapas (Tabela 5). A seguir, são mostrados os resultados obtidos a partir do experimento.



**Figura 32:** Curva de crescimento da *Chlorella* sp. com adição de  $\text{NaNO}_3$  em etapas.



**Figura 33:** Curva de consumo do íon nitrato em *Chlorella* sp. com adição de  $\text{NaNO}_3$  em etapas.



**Figura 34:** Quantidade de lipídeos em biomassa seca de *Chlorella* sp. com adição de NaNO<sub>3</sub> em etapas extraídos via *Bligh n' Dyer*.

**Tabela 10:** Produtividade de lipídeos e biomassa de *Chlorella* sp. com adição de NaNO<sub>3</sub> em etapas.

Adição de nitrato	Biomassa final (g L <sup>-1</sup> )	Lipídeos (%)	Produtividade de lipídeos (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Produtividade biomassa (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
1 × 300 mg L <sup>-1</sup>	1,53 <sup>a</sup>	6,02 ± 0,52 <sup>a</sup>	11,0 ± 0,9 <sup>a</sup>	182 ± 24,8 <sup>a</sup>
2 × 150 mg L <sup>-1</sup>	1,68 <sup>a</sup>	5,61 ± 1,47 <sup>a</sup>	11,2 ± 2,9 <sup>a</sup>	200 ± 61,2 <sup>a</sup>
3 × 100 mg L <sup>-1</sup>	1,92 <sup>a</sup>	4,18 ± 0,94 <sup>a</sup>	9,6 ± 2,1 <sup>a</sup>	228 ± 34,8 <sup>a</sup>
5 × 60 mg L <sup>-1</sup>	1,86 <sup>a</sup>	4,80 ± 0,47 <sup>a</sup>	10,6 ± 1,0 <sup>a</sup>	220 ± 31,2 <sup>a</sup>

\* Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Na Figura 32, são mostradas as curvas de crescimento para essas condições. Todas as curvas apresentaram comportamentos muito semelhantes, entrando em estado estacionário em aproximadamente 175 h, e com maior concentração final de biomassa naquelas condições em que o NaNO<sub>3</sub> foi adicionado em mais vezes. Porém, não houve diferença significativa entre eles segundo o teste das médias de Tukey (Tabela 10).

A Figura 33 mostra as curvas de consumo do nitrato para o experimento. Analogamente à Figura 29, as curvas têm um comportamento semelhante, com algumas alterações devido à adição de NaNO<sub>3</sub>, que eleva a concentração, durante o cultivo. Os valores de concentração de nitrato são próximos no final, estabilizando na fase estacionária de crescimento da microalga.

A Figura 34 apresenta os valores de quantidade de lipídeos em biomassa seca dos diferentes cultivos do experimento. Nota-se que existe uma pequena diminuição da quantidade de lipídeos quando o NaNO<sub>3</sub> é adicionado em mais etapas, porém, sem

diferença significativa entre os resultados (Tabela 10). Este comportamento pode ser explicado pela mesma razão do acúmulo de lipídeos no experimento anterior; a microalga tende a produzir substâncias de armazenamento de energia, como lipídeos. Quando o  $\text{NaNO}_3$  é adicionado em várias vezes, a taxa de absorção de nitrato permanece constante, não alterando o metabolismo da microalga, porém, quando o nutriente é totalmente consumido e não há reposição, o acúmulo de lipídeos ocorre.

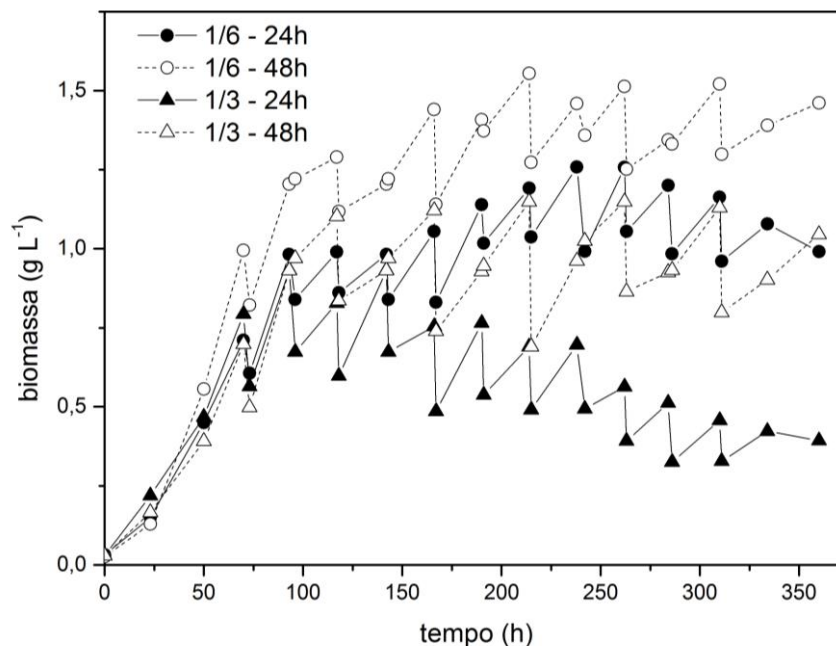
Feng *et al* (2011) realizaram um trabalho no qual  $\text{NaNO}_3$  era repostado em intervalos diferentes ao cultivo de *Isochrysis zhangjiangensis*, a fim de avaliar como isso afetaria o crescimento e a produção de lipídeos na microalga. Seus resultados foram diferentes dos obtidos nesse trabalho, uma vez que a quantidade de lipídeos aumentava à medida que aumentava a frequência de adição de  $\text{NaNO}_3$ . Os autores concluíram que a microalga em questão é uma exceção à regra. No mesmo trabalho, foi realizado um experimento com a microalga *Chlorella pyrenoidosa*, nas mesmas condições, e o resultado foi similar ao obtido neste experimento.

A Tabela 10 mostra os valores de produtividade lipídica das condições de cultivo utilizadas no experimento. Percebe-se que existe um equilíbrio nas proporções de concentração de biomassa e quantidade de lipídeos, uma relação inversamente proporcional, como anteriormente vista nos experimentos.

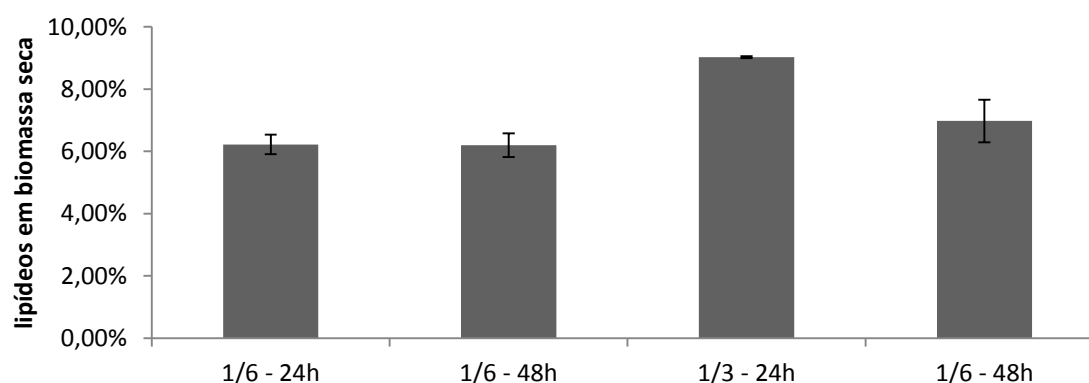
Comparando os valores de produtividade lipídica da Tabela 9 com os valores da Tabela 10, nota-se uma expressiva diferença entre eles. O fato é explicado pelo uso de enriquecimento de  $\text{CO}_2$  na vazão de entrada de ar no experimento anterior. Este fator mostrou influência tanto na produção de lipídeos, quanto de biomassa; embora o objetivo do trabalho não tenha sido esse.

#### **4.4 Cultivo semicontínuo**

Com o objetivo de estudar o comportamento da *Chlorella* sp. em cultivo semicontínuo, realizou-se um experimento variando-se o volume de corte (1/3 ou 1/6 do volume do fotobiorreator) e o intervalo dos cortes (24 h ou 48 h). Os resultados obtidos estão mostrados nas Figuras 35 a 40 e na Tabela 11.



**Figura 35:** Curvas de crescimento da *Chlorella* sp. para diferentes cortes do cultivo semicontínuo.

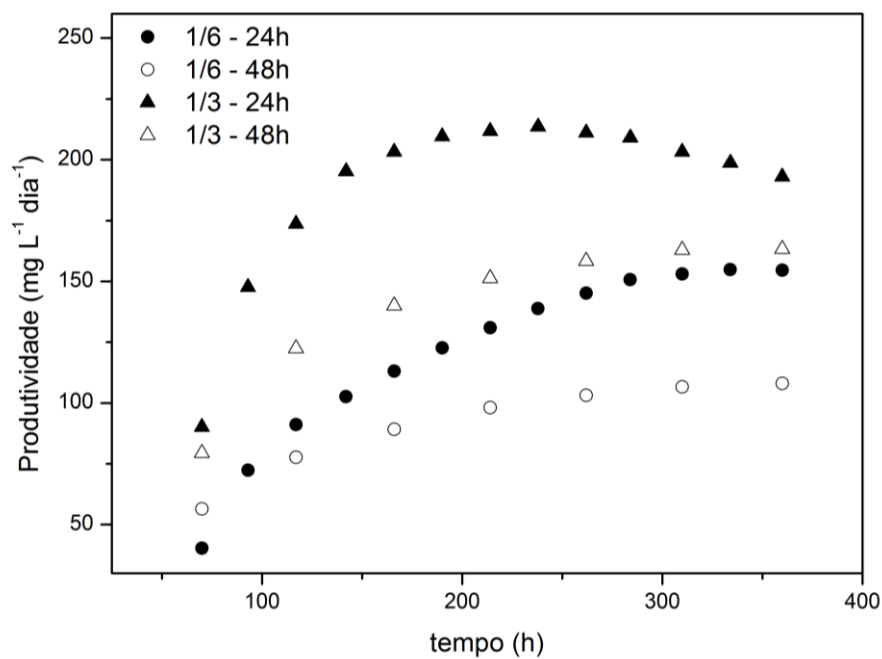


**Figura 36:** Quantidade de lipídeos em biomassa seca de *Chlorella* sp. no cultivo semicontínuo.

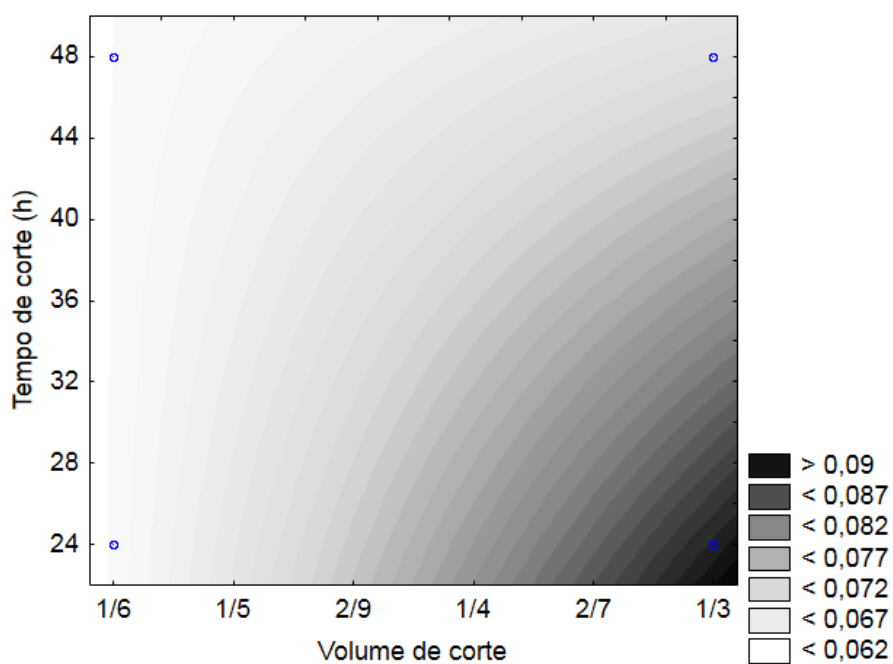
**Tabela 11:** Produtividade de lipídeos e biomassa de *Chlorella* sp. em cultivo semicontínuo

Reator	Lipídeos %	Produtividade de lipídeos (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Produtividade máxima de biomassa (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
1/6 – 24 h	6,22 ± 0,32 <sup>b</sup>	9,64 ± 1,56 <sup>b</sup>	155 ± 25 <sup>b</sup>
1/6 – 48 h	6,20 ± 0,38 <sup>b</sup>	6,70 ± 0,14 <sup>c</sup>	108 ± 2,2 <sup>c</sup>
1/3 – 24 h	9,02 ± 0,03 <sup>a</sup>	19,3 ± 0,56 <sup>a</sup>	214 ± 6,2 <sup>a</sup>
1/3 – 48 h	6,98 ± 0,68 <sup>b</sup>	11,4 ± 0,78 <sup>b</sup>	163 ± 11 <sup>b</sup>

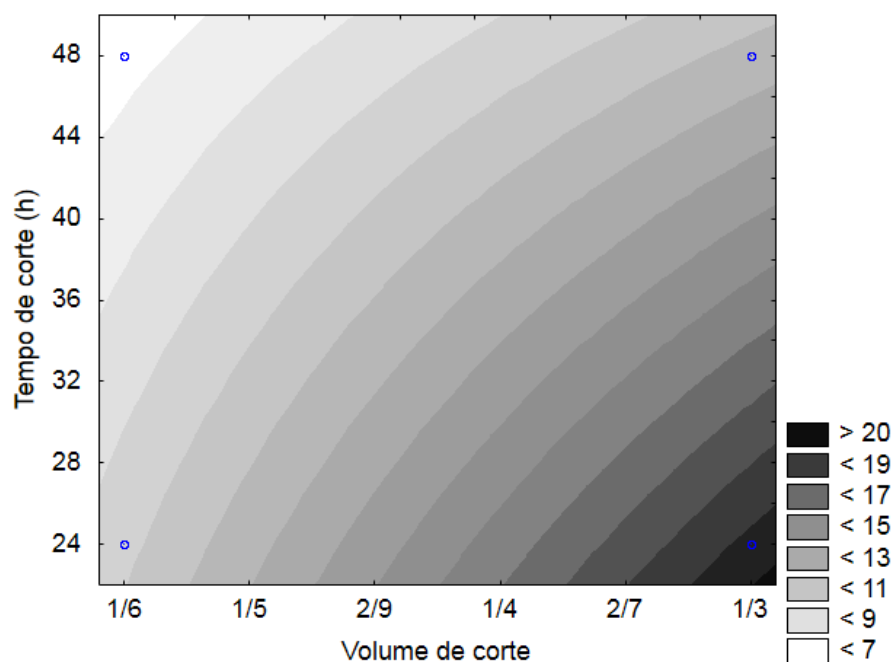
\* Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).



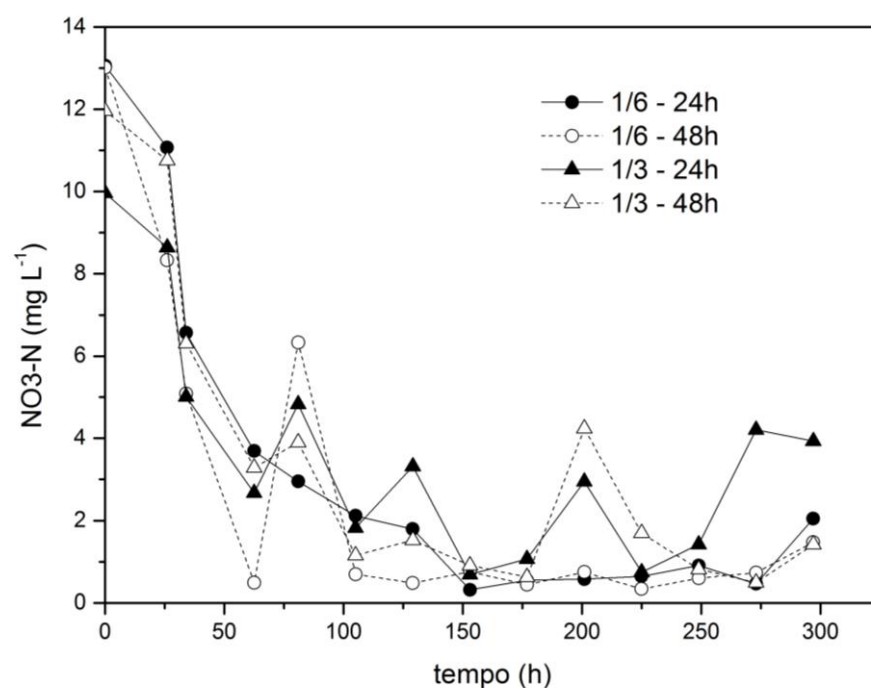
**Figura 37:** Produtividade de biomassa da microalga *Chlorella* sp. em função do tempo para diferentes cortes no cultivo semicontínuo.



**Figura 38:** Superfície de resposta relacionando o tempo e o volume de corte com os lipídeos no cultivo semicontínuo.



**Figura 39:** Superfície de resposta relacionando o tempo e o volume de corte com a produtividade de lipídeos no cultivo semicontínuo.



**Figura 40:** Curva de consumo do íon nitrato em *Chlorella* sp para diferentes cortes no cultivo semicontínuo.

A partir da Figura 35, percebe-se que apenas os reatores cultivados na condição de volume de corte de 1/3 (33,3 %) a cada 24 h não foram capazes de repor a biomassa

retirada de maneira adequada, sendo a biomassa gradativamente “lavada” (*wash-out*). Isso acontece porque a velocidade de crescimento da microalga não é suficiente para compensar a renovação do meio, fazendo com que a curva seja decrescente. Os demais cultivos mantiveram comportamentos similares entre si, e alcançaram uma biomassa final bastante elevada.

Na Figura 36, são apresentados os teores de lipídeos para as diferentes condições no cultivo semicontínuo. Percebe-se que o cultivo 1/3 – 24 h produziu uma quantidade de lipídeos maior do que os demais (9,02 %). Há diferença significativa, segundo o teste de Tukey, entre este cultivo e os demais, porém, foi verificado que os cultivos 1/6 – 24 h, 1/6 – 48 h e 1/3 – 48 h não são estatisticamente diferentes entre si. O resultado é explicado pela concentração de biomassa no reator: para os cultivos onde não houve lavagem de células, a penetração da luz no cultivo é menor, afetando a produção de lipídeos. O cultivo 1/3 – 24 h, devido à baixa concentração de biomassa, havia uma disponibilidade maior de luz por célula, aumentando assim a o acúmulo de lipídeos. Nota-se também que a produtividade de lipídeos ( $19,3 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) é maior para este cultivo também, reforçando ainda mais a eficiência dos parâmetros escolhidos. São valores que se aproximam daqueles encontrados na literatura.

Münkel *et al.* (2013) realizaram estudos a fim de avaliar a relação da concentração de biomassa com a produção de lipídeos para a microalga *C. vulgaris*. Eles verificaram que, quanto maior for a concentração de biomassa, menor será a disponibilidade de luz para as células e menor será a produção de lipídeos. Su *et al.* (2010) realizaram outros trabalhos envolvendo a microalga *Nannochloropsis oculata* e foi verificado que a intensidade da luz afeta diretamente na produção de lipídeos: foi realizado um experimento variando a intensidade de luz de 100 a 500  $\mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a uma salinidade constante de 35  $\text{g L}^{-1}$ . Verificou-se que, quanto maior a iluminação, maior é a produção de lipídeos, provavelmente por causa da maior energia disponível para a realização de fotossíntese, chegando a 44,5 % de lipídeo em biomassa seca a uma iluminação de 500  $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Na Figura 37 é mostrada a produtividade de biomassa durante o cultivo semicontínuo. Percebe-se que existe um aumento da produtividade em função do tempo para todos os parâmetros testados. Entretanto, o cultivo 1/3 – 24 h obteve uma produtividade máxima de biomassa bastante superior aos demais ( $214 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ), uma



vez que uma quantidade muito grande de biomassa era colhida em um intervalo de tempo curto. Comparando com a produtividade máxima do cultivo 1/6 – 48 h ( $108 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ), cuja biomassa era retirada em menor quantidade e em um intervalo de tempo maior, nota-se que o cultivo se torna muito mais efetivo para produção de lipídeos quando a frequência de corte é maior.

É possível perceber também que os valores de produtividade seguem uma tendência a estabilizar após 300 h, com exceção do cultivo 1/3 – 24 h, que alcança o valor máximo em aproximadamente 200 h e depois diminui. Esse fato ocorre porque, como mostra a Figura 35, a concentração de biomassa também diminui, assim, retira-se menos biomassa em cada corte. Nota-se também que a soma dos volumes retirados dos cultivos 1/6 – 24 h e 1/3 – 48 h é o mesmo, contudo, o cultivo 1/3 – 48 h mostrou-se mais produtivo, pois a microalga crescia mais no intervalo de cada corte. Conclui-se que, para um cultivo semicontínuo mais eficiente, uma pequena diminuição de volume de corte, quando a produtividade de biomassa alcançasse o valor máximo, seria o suficiente para manter o valor alto e não lavar as células.

Henrard *et al* (2011) realizaram cultivo semicontínuo com a microalga *Cyanobium* sp. em fotobiorreator tubular vertical, porém, com parâmetros de corte diferentes: quando a concentração de biomassa atingisse  $0,8 \text{ g L}^{-1}$ ,  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  ou  $1,2 \text{ g L}^{-1}$ , eram realizados os cortes de 30 %, 40 % e 50 %. O experimento durou 55 dias. Seus resultados foram satisfatórios, obtendo maior taxa máxima de crescimento de  $0,127 \text{ d}^{-1}$ , com a concentração de corte de  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  e taxa de renovação de 50 %. No entanto, não foi observado o fenômeno de *wash out*, pois o corte era realizado após a recuperação da biomassa do cultivo. A máxima produtividade de biomassa obtida foi de  $71 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ .

Soares (2010) obteve resultados em cultivo semicontínuo para a microalga *Phaeodactylum tricornutum* semelhantes ao deste trabalho. Foram realizados estudos de retirada volume de 10 %, 20 % e 30 % e tempos de corte de 7 h, 14 h e 21 h respectivamente. Para a produtividade de lipídeos, o maior valor foi de  $21,8 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ , para a retirada de volume de 20 %, valor um pouco menor que a produtividade do cultivo em batelada realizado no mesmo trabalho ( $22,4 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ).

Outro trabalho (TRAVIESO *et al.*, 2001) foi realizado usando cortes diários, aumentando o volume de corte em etapas. Eles utilizaram taxas de renovação diária de 5 % durante 9 dias, 10 % durante 7 dias, 20 % durante 7 dias, e 25 % nos 7 últimos dias.

Foi observado que a produtividade aumentou com a taxa de renovação até 20 %, mas diminuiu quando foi utilizado 25 % de volume de corte. A máxima produtividade de biomassa obtida foi de  $40 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  utilizando 20 % de taxa de renovação.

As Figuras 38 e 39 mostram a superfície de resposta relacionando os parâmetros estudados no cultivo semicontínuo e os valores atingidos de lipídeos e produtividade de lipídeos. De acordo com análise estatística, o tempo de corte mostrou-se significativo em relação tanto para a concentração de lipídeos ( $p = 0,0015$ ) quanto para a produtividade lipídica ( $p < 0,0001$ ); influenciando inversamente ambas variáveis de resposta. O volume de corte também possui significância para lipídeos ( $p < 0,0001$ ) e produtividade lipídica ( $p < 0,0001$ ), aumentando as duas variáveis quanto maior for a taxa de renovação do meio. Nota-se que os gráficos indicam a tendência do cultivo da microalga ser mais eficiente quanto menor for o intervalo de corte e maior for o volume retirado de meio de cultivo.

Comparando-se os maiores valores de produtividade de lipídeos do cultivo semicontínuo ( $19,28 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) com os maiores daqueles obtidos em cultivos em batelada ( $36,47 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  com  $\text{CO}_2$  e  $11,24 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), percebe-se que, onde houve injeção de  $\text{CO}_2$ , a produtividade de lipídeos foi muito superior às demais, mostrando a importância de enriquecer o ar injetado com gás carbônico. Porém, analisando os cultivos onde apenas ar atmosférico era fornecido às microalgas, o cultivo semicontínuo obteve quase o dobro de produtividade lipídica, evidenciando que o este método de crescimento é mais eficiente em relação ao cultivo em batelada.

Hsieh e Wu (2009) compararam diferentes tipos de cultivo para otimizar a produção de lipídeos na microalga *Chlorella* sp. Os resultados com o cultivo semicontínuo, com 25 % de volume de corte por dia após a cultura chegar ao estado estacionário, foram melhores tanto em produtividade lipídica quanto para produtividade de biomassa:  $139 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  e  $451 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  respectivamente.

A Figura 40 mostra a curva de consumo de nitrato durante o cultivo semicontínuo. O comportamento da curva é similar a de outros experimentos, havendo picos devido à colocação de meio de cultivo novo nos reatores. Ao contrário do que foi verificado no experimento anterior, todos os cultivos possuíam nitrogênio disponível, e aquele que sofreu as maiores variações na curva acumulou mais lipídeos.

## 5 Conclusão

Após a realização do trabalho, pode-se concluir que:

- Tanto para a *Chlorella minutissima*, quanto para a *Chlorella* sp., os pré-tratamentos utilizados não se mostraram uma etapa satisfatória para a extração mais eficiente dos lipídeos via *Bligh n' Dyer*, uma vez que não foi verificada diferença significativa entre os valores obtidos realizando ou não o pré-tratamento;
- A melhor técnica para extração de lipídeos dentre as testadas é a *Bligh n' Dyer*, mostrando-se mais eficiente do que *Sohxlet*;
- A melhor concentração inicial de  $\text{NaNO}_3$  testada foi  $300 \text{ mg L}^{-1}$ , obtendo concentração de biomassa final de  $2,54 \text{ g L}^{-1}$ , concentração de lipídeos em biomassa seca de 12,04 % e produtividade lipídica de  $35,29 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ;
- Ao adicionar  $\text{NaNO}_3$  em etapas, não houve diferença significativa entre os parâmetros testados, tanto no crescimento, quanto no acúmulo de lipídeos; no entanto, para futuros experimentos, é indicado que a suplementação de nitrato seja feita em apenas uma vez, visto que torna a manutenção do cultivo mais simples;
- No cultivo semicontínuo, o melhor resultado para o acúmulo de lipídeos foi retirando 1/3 do volume a cada 24 h, resultando em 9,02 % de lipídeos em biomassa seca e produtividade de biomassa e lipídeos de  $214 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  e  $19,28 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , respectivamente. Porém, esses parâmetros resultaram no declínio da concentração de biomassa no biorreator.

A fim de dar continuidade ao trabalho realizado durante este mestrado, sugere-se:

- Estudar a influência de fatores combinados para aumentar ainda mais a produção de lipídeos;
- Realizar a identificação dos lipídeos produzidos;
- Testar concentrações menores de  $\text{NaNO}_3$ , a fim de aumentar a produção de lipídeos e diminuir o uso do reagente.

## 6 Referências

- ABREU, A. P. et al. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 61–66, 2012.
- AHMAD, A. L. et al. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, p. 584 – 596, jan. 2011.
- ARAÚJO, G. S. et al. Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 1, p. 95–98, jan. 2013.
- BANERJEE, A. et al. *Botryococcus braunii* : A Renewable Source of Hydrocarbons and Other Chemicals. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 245–279, jan. 2002.
- BEHRENS, P. W. Photobioreactors and Fermentors: the dark side of growing algae. In: **Algal Culturing Techniques**. [s.l.] Elsevier Academic Press, 2005.
- BEN-AMOTZ, A.; KATZ, A.; AVRON, M. Accumulation of beta-carotene in halotolerant algae: purification and characterization of beta-carotene-rich globules from *dunaliella bardawil* (chlorophyceae). **Journal of Phycology**, v. 18, n. 4, p. 529–537, dez. 1982.
- BHATNAGAR, A. et al. Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. **Applied energy**, v. 88, n. 10, p. 3425–3431, 2011.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911–917, 1959.
- BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. (EDS.). **Micro-algal biotechnology**. Cambridge [Cambridgeshire] ; New York: Cambridge University Press, 1988.
- BORZANI, W. **Biotecnologia industrial / [coordenação de] W. Borzani ... [et al.]**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.
- BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 1-2, p. 21–33, mar. 2005.
- BURY, D.; JELEN, P.; KALÁB, M. Disruption of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842 cells for lactose hydrolysis in dairy products: a comparison of sonication, high-pressure homogenization and bead milling. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Volume 2, Issue 1, March 2001, Pages 23–29, v. 2, n. 1, p. 23–29, 2001.
- CATALDO, D. A. et al. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, n. 1, p. 71–80, jan. 1975.

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

CHENG, C.-H. et al. Comparative study of lipid extraction from microalgae by organic solvent and supercritical CO<sub>2</sub>. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 21, p. 10151–10153, nov. 2011.

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

CHIU, S.-Y. et al. Microalgal biomass production and on-site bioremediation of carbon dioxide, nitrogen oxide and sulfur dioxide from flue gas using *Chlorella* sp. cultures. **Bioresource Tecnology**, v. 102, p. 9135–9142, 2011.

**Chlorella vulgaris.** Disponível em: <[http://botany.natur.cuni.cz/algo/CAUP/H1955\\_Chlorella\\_vulgaris.htm](http://botany.natur.cuni.cz/algo/CAUP/H1955_Chlorella_vulgaris.htm)>. Acesso em: 31 jul. 2013.

DE CASTRO, M. D. L. DE; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2383–2389, 2010.

EWALD, G.; BREMLE, G.; KARLSSON, A. Differences between Bligh and Dyer and Soxhlet extractions of PCBs and lipids from fat and lean fish muscle: Implications for data evaluation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 36, n. 3, p. 222–230, 1998.

FENG, D. et al. Increased lipid production of the marine oleaginous microalgae *Isochrysis zhangjiangensis* (Chrysophyta) by nitrogen supplement. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 12, p. 6710–6716, jun. 2011.

FLORENTINO DE SOUZA SILVA, A. P. et al. Comparison of pretreatment methods for total lipids extraction from mixed microalgae. **Renewable Energy**, v. 63, p. 762–766, mar. 2014.

FRADIQUE, M. et al. *Isochrysis galbana* and *Diatrypa v. vlkianum* biomass incorporation in pasta products as PUFA's source. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 312–319, 2013.

GAO, Y.; YANG, M.; WANG, C. Nutrient deprivation enhances lipid content in marine microalgae. **Bioresource Technology**, v. 147, n. 0, p. 484–491, nov. 2013.

GARCIA, M. C. C. et al. Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*: Influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 297–305, 2005.

GECIOVA, J.; BURY, D.; JELEN, P. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry—a review. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 6, p. 541–553, 2002.

GOUVEIA, L. et al. Functional food oil coloured by pigments extracted from microalgae with supercritical CO<sub>2</sub>. **Food Chemistry**, v. 101, n. 2, p. 717–723, 2007a.

GOUVEIA, L. et al. Chlorella vulgaris biomass used as colouring source in traditional butter cookies. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 8, n. 3, p. 433–436, 2007b.

GRIMAA, E. M. et al. Recovery of microalgal biomass and metabolites: **Biotechnology Advances**, n. 20, p. 491–515, 2003.

GUDIN, C.; THERPENIER, C. Bioconversion of solar energy. **Advances in Biotechnological**, v. 6, p. 73–110, 1986.

HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. **Biotechnology Advances**, 2012.

HARWATI, T. U.; WILLKE, T.; VORLOP, K. D. Characterization of the lipid accumulation in a tropical freshwater microalgae Chlorococcum sp. **Bioresource Technology**, v. 121, n. 0, p. 54–60, out. 2012.

HEASMAN, M. et al. Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve mollusc. **Aquaculture Research**, v. 31, p. 637–659, 2000.

HENRARD, A. A.; DE MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Vertical tubular photobioreactor for semicontinuous culture of Cyanobium sp. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 7, p. 4897–4900, abr. 2011.

HSIEH, C.-H.; WU, W.-T. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 17, p. 3921–3926, set. 2009.

HUANG, G. et al. Biodiesel production by microalga biotechnology. **Appl Energy**, 2009.

**Innovation: A Lean, Green Machine | Inc.com.** Disponível em: <<http://www.inc.com/magazine/20100501/innovation-a-lean-green-machine.html>>. Acesso em: 31 jul. 2013.

IQBAL, J.; THEEGALA, C. Microwave assisted lipid extraction from microalgae using biodiesel as co-solvent. **Algal Research**, v. 2, n. 1, p. 34–42, jan. 2013.

KAIWAN-ARPORN, P. et al. Cultivation of cyanobacteria for extraction of lipids. **Biomass and Bioenergy**, v. 44, n. 0, p. 142–149, set. 2012.

KIM, S.-G. et al. Harvesting of Spirulina platensis by cellular flotation and. **Letters in Applied Microbiology**, n. 40, p. 190–194, 2005.

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.

KWIETNIEWSKA, E. et al. Microalgae - Cultivation and applicatoin of biomass as a source of energy: A Review. **Acta Agrophysica Monographiae**, p. 1–108, 2012.

- LEE, A. K.; LEWIS, D. M.; ASHMAN, P. J. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. **Biomass and Bioenergy**, 2012.
- LEE, J.-Y. et al. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, p. S75–S77, 2010a.
- LEE, S. H. et al. Six-week supplementation with Chlorella has favorable impact on antioxidant status in Korean male smokers. **Nutrition**, v. 26, n. 2, p. 175–183, 2010b.
- LEE, Y.-K. Algal Nutrition: Heterotrophic Carbon Nutrition. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and applied Phycology**. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2004. p. 116–124.
- LEKANG, O.-I. **Aquaculture engineering**. Oxford ; Ames, Iowa: Blackwell Pub, 2007.
- LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. São Carlos, SP: RiMa, 2006.
- MARX, G.; MOODY, A.; BERMÚDEZ-AGUIRRE, D. A comparative study on the structure of *Saccharomyces cerevisiae* under nonthermal technologies: High hydrostatic pressure, pulsed electric fields and thermo-sonication. **International Journal of Food Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 327–337, 2011.
- 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, p. 217–232, 2010.
- MAYERHOFFA, Z. D. V. L.; FRANCO, T. T.; ROBERTO, I. C. A study of cell disruption of *Candida mogii* by glass bead mill for the recovery of xylose reductase. **Separation and Purification Technology**, v. 63, p. 706–709, 2008.
- MIRANDA, J. R.; PASSARINHO, P. C.; GOUVEIA, L. Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 342–348, jan. 2012.
- MIRÓN, A. S. et al. Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, n. 3, p. 287–297, dez. 2003.
- MOHN, F. Experiences and strategies in the recovery of biomass from mass cultures of microalgae. In: **Algae biomass**. Amsterdam: [s.n.]. p. 547–571.
- MÜNKEL, R. et al. Optimization of outdoor cultivation in flat panel airlift reactors for lipid production by *Chlorella vulgaris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 11, p. 2882–2893, 1 nov. 2013.
- OKAMOTO, K. et al. Effects of Chlorella alkali extract on blood pressure in SHR. **Japanese Heart Journal**, v. 19, p. 622–623, 1978.
- PEREZ-GARCIA, O. et al. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potencial products. **Ware Research**, n. 45, p. 11–36, 2011.

PETKOV, G.; GARCIA, G. Which are fatty acids of the green alga *Chlorella*? **Biochemical systematics and ecology**, v. 35, p. 281–285, 2007.

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.

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

**Protist Images: Botryococcus braunii.** Disponível em: <[http://protist.i.hosei.ac.jp/pdb/images/Chlorophyta/Botryococcus/braunii/sp\\_1c.html](http://protist.i.hosei.ac.jp/pdb/images/Chlorophyta/Botryococcus/braunii/sp_1c.html)>. Acesso em: 31 jul. 2013.

RAMLUKAN, K.; MOODLEY, K. G.; BUX, F. An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method. **Fuel**, v. 116, n. 0, p. 103–108, 15 jan. 2014.

RASOUL-AMINI, S. et al. *Chlorella* sp.: A new strain with highly saturated fatty acids for biodiesel production in bubble-column photobioreactor. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3354–3356, 2011.

REIS, A. et al. Eicosapentaenoic acid-rich biomass production by the microalga *Phaeodactylum tricornutum* in a continuous-flow reactor. **Bioresource Technology**, v. 55, n. 1, p. 83–88, jan. 1996.

RICCI-SILVA, M. .; ABRAHÃO-NETO, J.; VITOLO, M. Protein and glucose 6-phosphate dehydrogenase releasing from baker's yeast cells disrupted by a vertical bead mill. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 831–835, 2000.

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

RODOLFI, L. et al. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 1, p. 100–112, 1 jan. 2009.

SCHÜTTE, H. et al. Experiences with a 20 litre industrial bead mill for the disruption of microorganisms. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 5, p. 143–148, 1983.

SHELEF, G.; SUKENIK, A.; GREEN, M. **Microalgae Harvesting and Processing: A Literature Review**. [s.l.: s.n.].

SMEDES, F.; THOMASEN, T. K. Evaluation of the Bligh n' Dyer lipid determination method. **Marine Pollution Bulletin**, v. 32, p. 681–688, 1996.

SOARES, D. **AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR E DA PRODUTIVIDADE DE LIPÍDEOS DE MICROALGAS MARINHAS EM DIFERENTES REGIMES DE CULTIVO**. Curitiba, Paraná: Universidade Federal do Paraná, 2010.



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

SU, C.-H. et al. Factors affecting lipid accumulation by *Nannochloropsis oculata* in a two-stage cultivation process. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 5, p. 903–908, 8 out. 2010.

SUBBA RAO, D. V. **Algal Cultures, analogues of Blooms and applications**. Enfield: Science Publishers, 2006. v. 1

**Sustainable Green Technologies Inc. - Algae FAQ**. Disponível em: <[http://sgth2.com/algae\\_faq](http://sgth2.com/algae_faq)>. Acesso em: 31 jul. 2013.

THOSTENSON, E. T.; CHOU, T.-W. Microwave processing: fundamentals and applications. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v. 30, p. 1055–1071, 1999.

TOMASELLI, L. The Microalgal Cell. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Oxford: Blackwell, 2004. p. 3–19.

TRAVIESO, L. et al. A helical tubular photobioreactor producing *Spirulina* in a semicontinuous mode. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 47, n. 3, p. 151–155, 2001.

TSUCHIDA, T. et al. Clinical study of gamma-aminobutyric acid-rich *Chlorella* for subjects with high-normal blood pressure and mild hypertension. **Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science**, v. 56, p. 97–102, 2003.

VISWANATHAN, T. et al. Effect of cell rupturing methods on the drying characteristics and lipid compositions of microalgae. **Advances in Biological Waste Treatment and Bioconversion Technologies**, v. 126, n. 0, p. 131–136, dez. 2012.

WANG, B. et al. CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 5, p. 707–718, 16 maio 2008.

XIN, L. et al. Growth and nutrient removal properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. LX1 under different kinds of nitrogen sources. **Ecological Engineering**, v. 36, n. 4, p. 379–381, 2010a.

XIN, L. et al. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5494–5500, jul. 2010b.

XU, H.; MIAO, X.; WU, Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 126, n. 4, p. 499–506, 2006.

ZYGLER, A.; STOMIŃSKA, M.; NAMIEŚNIK, J. Soxhlet Extraction and New Developments Such as Soxtec. In: **Comprehensive Sampling and Sample Preparation**. [s.l.] Oxford, 2012. v. 2p. 65–82.

