



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
ENG07053 - TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA



**Estudo sobre o crescimento
da microalga marinha
Nannochloropsis oculata em
regime mixotrófico e
heterotrófico utilizando
diferentes fontes de carbono
orgânico**

Autor: Viviane Ferreira

Orientador: Marcelo Farenzena

Porto Alegre, julho de 13

Sumário

Agradecimentos	iv
Resumo	v
Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas	vii
1 Introdução	1
2 Revisão Bibliográfica	2
2.1 Biocombustíveis	2
2.2 Microalgas	3
2.3 Condições e meio de Cultivo para microalgas marinhas	5
2.4 Regime de Cultivo	6
2.4.1 Autotrófico	6
2.4.2 Heterotrófico	7
2.4.3 Mixotrófico	9
2.5 Fonte de carbono	9
2.6 Sistema de cultivo	9
3 Materiais e Métodos	11
3.1 Inóculo e banco de células	11
3.2 Teste de ambientação	12
3.3 Teste de concentração	13
3.4 Fotobiorreatores	13
3.5 Planejamento Experimental	15
3.6 Análises/ Metodologia	17
4 Resultados	18
4.1 Testes preliminares	18
4.2 Experimentos nos fotobiorreatores	20
4.2.1 Curva de correlação entre absorbância e peso seco	21
4.2.2 Avaliação da concentração em biomassa	26
4.3 Contaminações	29
5 Conclusões e Trabalhos Futuros	33
6 Referências	34
Apêndice A –Condições de repicagem	37
Apêndice B – Preparo das soluções	38
Apêndice C –A Análise das triplicatas	40

Agradecimentos

Agradeço imensamente a Deus, por ter sempre me amado, protegido, guiado, abençoado e guardado de todo mal.

Agradeço a meus pais, Arlete e Ferreira, que me permitiram continuar estudando, que sempre apoiaram as minhas decisões acadêmicas e que perderam sua filha no período final da confecção deste trabalho.

A meus irmão, Angelo e Fernando, que abriram mão de muita coisa para que eu pudesse me tornar engenheira, mas tenho certeza de que eles também, muito em breve, o serão.

Ao meu namorado, Luciano Berchon, aluno “TCCista” do curso de Física, pelas dicas e pela compreensão (mútua) que permitiu a conclusão dos dois trabalhos.

Ao meu companheiro de aventuras, Lucas Foppa, pelas palpitações e risadas nesse final de curso.

A Liège Costa, amiga e “professora”, cuja participação foi fundamental para esse trabalho, especialmente ao que compete a todo o procedimento experimental. Agradeço pela paciência e pelos finais de semana perdidos trabalhando ao meu lado no laboratório para fazer esse trabalho sair do papel.

Ao meu orientador, Professor Marcelo Farenzena, agradeço pelo entusiasmo com as microalgas e pelas orientações dadas.

A UFRGS, que além de um ensino de qualidade, me proporcionou uma casa, a CEFVAV, e o RU, sem o qual estudante nenhum sobreviveria na capital dos gaúchos.

Resumo

Microalgas são organismos fotossintetizantes que utilizam o CO₂ do ar e luz solar para o seu crescimento. Atualmente, os estudos sobre biocombustíveis, especialmente o biodiesel, apresentam um foco no crescimento e adensamento das culturas de microalgas para o seu uso como matéria-prima renovável.

Uma das possibilidades para melhorar as taxas de crescimento desses microorganismos é a modificação do regime de cultivo, através da adição de um componente carbônico orgânico no meio de cultivo. Esse procedimento pode se dar em presença ou ausência de luz, cultivo mixotrófico e heterotrófico, respectivamente.

Neste trabalho foi desenvolvido um estudo sobre o potencial do uso desses cultivos para a microalga *Nannochloropsis oculata*, com o uso de glicose, sacarose e glicerina como fontes de carbono. Os experimentos foram desenvolvidos em uma mini-planta de fotobiorreatores, de 3 L de volume útil, em um período de cultivo de 3 dias. Para os cultivos em presença de luz, foi usado uma intensidade luminosa de 9000 lux e um fotoperíodo de 12:12h de luz/escuridão. Para permitir um comparativo, realizou-se igualmente um cultivo autotrófico e um cultivo em branco para avaliar as contaminações.

Os resultados deste trabalho mostram que, nas condições usadas, o regime mixotrófico se destaca como o regime que obteve maiores concentrações de biomassa para as três fontes testadas. Sendo a maior concentração para o uso de glicose, 0,376 g/L de biomassa, com aproximadamente 60% de aumento em relação ao regime autotrófico.

Os cultivos heterotróficos não se mostraram convenientes, dentro das condições testadas, pois apresentam crescimento compatível ou mesmo inferior ao regime autotrófico, sendo a sacarose como pior fonte de carbono, dentre as testadas, com apenas 0,175 g/L de biomassa.

O estudo ressalta ainda a observação de contaminações, mesmo em se tratando de meio de cultivo salino.

Lista de Figuras

Figura 1 – Imagem de microscópio da <i>Nannochloropsis Oculata</i> . Adaptado de Soares (2010).....	5
Figura 2 – Frascos no interior da incubadora shaker para o teste preliminar de cultivo heterotrófico.....	13
Figura 3 – Representação esquemática das dimensões do fotobiorreator - Retirado de Gris (2011).....	14
Figura 4 – Foto da planta de fotorreatores durante o segundo dia da segunda batelada de experimentos	16
Figura 5– Curva de absorvância em função do tempo de cultivo para o segundo teste de ambientação da <i>Nannochloropsis Oculata</i> na ausência de luz.....	18
Figura 6 – Comparação visual de intensidade de coloração verde entre cultivo heterotrófico (erlenmeyer) e autotrófico (bombonas).....	19
Figura 7 - Curva de absorvância em função do tempo de cultivo avaliando a concentração de glicose pela reação com DNS.....	19
Figura 8–Resultados do teste de concentração, apresentado em forma de curva de absorvância em função do tempo de cultivo para cultivo heterotrófico	20
Figura 9 – Comparação da evolução temporal nos experimentos para glicose mixotrófica na 1ª batelada (1A, 1B e 1C) e 2ª batelada (2A, 2B e 2C).....	21
Figura 10 – Regressões lineares da concentração em função da absorvância na batelada 1	22
Figura 11 - Regressão linear da concentração em função da absorvância para regime autotrófico	23
Figura 12 – Regressão linear da concentração em função da absorvância para glicerina em regime heterotrófico	24
Figura 13 - Regressão linear da concentração em função da absorvância para glicose em regime mixotrófico	24
Figura 14 - Regressão linear da concentração em função da absorvância para glicerina em regime mixotrófico	25
Figura 15 – Curva de concentração de biomassa em função do tempo de cultivo, apresentando os resultados obtidos no experimento em fotorreator airlift	26
Figura 16 – Comparativo das concentrações finais com resultados finais encontrados na bibliográfica	29
Figura 17 – Curva de absorvância em função do tempo de cultivo para o experimento em triplicata para meio de cultivo em branco.....	30
Figura 18 – Correlação linear da concentração de contaminação em função da absorvância, obtida através de análise de peso seco ao longo do experimento.	31
Figura 19 – Curva da concentração de contaminantes em função do tempo de cultivo para o experimento em triplicata em branco.....	31

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Composição meio f/2 modificado utilizado	12
Tabela 2 – Planejamento experimental para os experimentos em fotoreator separados em duas bateladas, realizado em triplicata (A,B,C).....	16
Tabela 3 – Resumo das correlações peso seco vs absorbância usadas neste trabalho	26
Tabela 4–Comparativo de crescimento entre os cultivos estudados neste trabalho.....	27
Tabela 5 – Avaliação da razão mássica entre a fonte de carbono suplementada ao meio de cultura e o aumento em relação ao cultivo sem suplementação de carbono	27

1 Introdução

Atualmente, as microalgas são consideradas como uma fonte promissora de lipídeos para a produção de biodiesel, devido a sua alta produtividade e teor oleaginoso. O potencial de produção de biodiesel está diretamente relacionado ao aumento da demanda mundial por energia, especialmente sob a forma de combustíveis de transporte.

Existe uma grande limitação na produção sustentável de combustíveis de transporte e produtos químicos derivados, hoje, do petróleo. Esses produtos não podem ser obtidos diretamente através das fontes de energia limpas – energia solar, eólica e das águas – de modo que se mostra necessário a busca por uma alternativa ecológica e economicamente viável.

Um dos grandes desafios para o uso industrial de microalgas como fonte renovável de energia está na viabilidade energética e econômica de seu processo produtivo. Ao conseguir adensar os cultivos de microalgas, reduz-se a necessidade de água e os custos energéticos associados à colheita e extração de lipídeos, sem contar na redução do tamanho das instalações necessárias para o cultivo e, portanto o capital inicial de investimento.

No presente trabalho será abordado o estudo da influência de três fontes de carbono no crescimento da microalga marinha *Nannochloropsis oculata* em regime mixotrófico e heterotrófico, em comparação com o resultado obtido em regime autotrófico.

O uso de um componente orgânico dissolvido no meio de cultivo como fonte suplementar de carbono pode aumentar significativamente a concentração do cultivo de microalga. Permitindo, além disso, a modulação da composição bioquímica da microalga, podendo levar a maiores concentrações em componentes desejáveis, como os lipídeos (Brennan e Owende, 2010).

De um ponto de vista de engenharia, este estudo visa avaliar o uso de glicerina, glicose e sacarose como fonte de carbono orgânico, a fim de adensar as culturas e reduzir o tempo de cultivo.

Este trabalho está dividido em 4 capítulos, além do presente. Uma breve revisão dos conceitos fundamentais para o entendimento deste trabalho, referenciando trabalhos similares encontrados na bibliografia e que servirão de referência para os resultados obtidos são mostrados no capítulo 2. Em seguida, são abordadas as explanações da metodologia e dos materiais utilizados na parte experimental desse trabalho. Na sequência são mostrados os resultados obtidos com uma sucinta discussão da representatividade desses dados. E por fim, são descritas as conclusões finais e os ramos de continuidade possíveis em trabalhos futuros.

2 Revisão Bibliográfica

Esse capítulo tem por objetivo fornecer os conceitos básicos envolvidos nesse trabalho. É feita uma breve descrição dos principais tópicos de discussão sobre o uso de biocombustíveis, na sequência são abordadas as vantagens do uso de microalgas como fonte renovável para os biocombustíveis de transporte. Logo após, são aprofundadas as informações a cerca das condições, regimes e sistemas de cultivo das microalgas. Para finalizar, uma breve descrição de trabalhos semelhantes a este é realizada.

2.1 Biocombustíveis

A demanda global por energia está em crescimento permanente, suportada pelo aumento da população e da industrialização. Combustíveis fósseis são as fontes primárias de energia e de produtos químicos, o que nesse cenário de aumento constante da demanda, traz à tona importantes questões ambientais, econômicas e sociais. Entre elas, são destacadas a taxa de exploração do petróleo, que é extraído e consumido a taxas muito maiores do que sua regeneração natural através do ciclo de carbono, e a localização das reservas de petróleo, que estão centralizadas em apenas alguns países privilegiados (Cherubini e Strømman, 2011).

Esse consumo acelerado, acrescido da percepção da escassez do petróleo, fará com que os preços do óleo cru, combustíveis de transporte e derivados de petróleo em geral, subam constantemente nos próximos anos (Bentley et al., 2007; Greene, 2004). Com esse aumento nos preços, as fontes de energia renováveis começam a se tornar economicamente competitivas. Além disso, elas são distribuídas mais uniformemente no globo do que o petróleo, não apresentam impacto ambiental e social tão aguçados, e podem até mitigar alguns dos problemas causados pelo uso do petróleo e seus derivados (Cherubini e Strømman, 2011).

A força dos ventos e das águas, a energia solar e a biomassa são alguns exemplos de alternativas renováveis para a geração de calor e eletricidade. Entretanto a biomassa é provavelmente a única alternativa viável para a produção de combustíveis de transporte e químicos derivados do petróleo (Cherubini e Strømman, 2011).

Há um pouco mais de um século, o engenheiro alemão Rudolf Diesel adotou para o seu primeiro motor de compressão-ignição, o óleo de amendoim como combustível. Tratava-se na verdade do que é hoje caracterizado como o biodiesel, pois provinha de fonte natural. Contudo, o biodiesel não se tornou popular nessa época para motores, sendo substituído por diesel derivado de petróleo no início dos anos 1920, devido à abundância e preço baixo (Yi-Feng e Wu, 2011).

O biodiesel é definido como um monoalquil éster de óleo vegetal ou gordura animal produzido através de reações de transesterificação (Yi-Feng e Wu, 2011).

A produção de biodiesel e outros biocombustíveis pode ser subdividida em três gerações, dependendo da fonte de biomassa utilizada. A primeira geração é a derivada de alimentos oleaginosos como óleos vegetais, tais como soja, colza (ou canola) e milho, ou gorduras animais. A segunda geração se destina a produzir combustíveis a partir de todo o material vegetal de culturas dedicadas a produção de energia, resíduos agrícolas, resíduos de colheita florestal e resíduos de processamento de madeira, ao invés de culturas alimentares. São as chamadas lignoceluloses e seus derivados. E finalmente, a

terceira geração é a composta por óleo de microalgas (Lourenço, 2006; Brennan e Owende, 2010; Rawat *et al.*, 2013).

Mais de 95% do biodiesel produzido hoje é de primeira geração (Rawat *et al.*, 2013). Por ser de fonte alimentar, o uso desses materiais para a produção do biodiesel, pode causar severos impactos no mercado de alimentos global, comprometendo a segurança alimentar, especialmente nas regiões mais vulneráveis economicamente (Brennan e Owende, 2010).

Biodiesel de segunda geração ainda não apresentou qualquer exploração significativa, pois a tecnologia para fazê-lo ainda está em fase de desenvolvimento e não atingiu a exploração comercial (Brennan e Owende, 2010).

Para um biocombustível ter sua exploração viável técnica e economicamente, é necessário que a fonte renovável seja competitiva ou custe menos do que os derivados de petróleo, exija baixo ou nenhum uso adicional de terras cultiváveis, proporcione a melhoria da qualidade do ar (através de seu cultivo pela sequestração de CO₂) e exija o uso mínimo de água para o seu cultivo. A terceira geração de biocombustíveis tem potencial de se enquadrar em todos esses critérios, sendo atualmente amplamente estudada (Brennan e Owende, 2010; Rawat *et al.*, 2013).

2.2 Microalgas

As microalgas são organismos microscópicos fotossintetizantes que crescem rapidamente e em diferentes condições ambientais devido à sua estrutura celular simples, unicelular ou multicelular. Elas podem ser encontradas tanto em ambientes aquáticos quanto terrestres e apresentam de 2 a 200 µm de tamanho, podendo ser eucariontes ou procariontes. Eles estão entre os seres mais primitivos da Terra e existem relatos antigos de sua utilização como alimento por algumas populações (Lourenço, 2006; Mata, Martins e Caetano, 2010). Estima-se que apenas 30.000 espécies foram estudadas e analisadas de um total de aproximadamente 50.000 espécies existentes no mundo (Richmond, 2004; Lourenço, 2006).

Segundo Lourenço (2006), é interessante fazer uso de cultivo em batelada de microalgas em pesquisas, pois esse apresenta um ciclo de vida com fases bem definidas, o que permite avaliar o comportamento do sistema frente a condições operacionais de estudo. As cinco etapas são:

- 1) Fase de adaptação – ocorre devido à presença de células inviáveis ou esporos no inóculo, ou ainda devido a um período de adaptação fisiológica das células frente às modificações nas condições de cultivo. Ela pode ser evitada ao utilizar células em crescimento exponencial avançado como inóculo;
- 2) Fase exponencial ou logarítmica – caracteriza-se pelo início do crescimento e da multiplicação das células. As mesmas se dividem exponencialmente com o tempo enquanto substratos, luz e temperatura estiverem adequados ao crescimento;
- 3) Fase de transição – redução da multiplicação, devido ao aumento da população;
- 4) Fase estacionária – caracteriza-se por uma população praticamente constante;

5) Fase de declínio – redução da população devido à escassez de recursos.

Ainda de acordo com Lourenço (2006) são três as categorias básicas de aplicações comerciais já reconhecidas para as microalgas:

1) Uso de microalgas para aumentar o valor nutricional de alguns alimentos para animais e para o homem;

2) Uso de microalgas como ração para aquicultura *in natura* ou parcialmente processadas;

3) Utilização de moléculas de alto valor agregado provinda das microalgas, como vitaminas, pigmentos e ácidos graxos, em alimentos industrializados, produtos farmacêuticos e cosméticos.

Além disso, um fator importante para o uso desse tipo de fonte renovável é a captação de CO₂ do ar para a realização de fotossíntese. Estima-se que para cada 1 kg de microalga seca, tenha-se uma captura líquida de 1,86 kg de CO₂ da atmosfera (Chisti, 2007).

Pulz e Gross (2004) estimam que o mercado atual envolva 5.000 t/ano de biomassa microalgácea somando 1,25 bilhão/ano de dólares em receitas, excluindo os produtos processados.

Além dessas, atualmente estão em fase de estudo a produção de biogás proveniente da biomassa microalgácea e a produção de biodiesel proveniente da extração de ácidos graxos a partir das microalgas (Brennan e Owende, 2010; Chisti, 2007; Rawat et al., 2013).

Como principais vantagens do uso de microalgas como matéria-prima para a produção do biodiesel, Brennan e Owende (2010) ressaltam que:

- 1) São cultiváveis o ano todo;
- 2) Consomem menor quantidade de água do que as culturas tradicionais;
- 3) Podem usar água salobra e terras não cultiváveis;
- 4) Apresentam dinâmica de crescimento rápido, com teor de óleo significativo;
- 5) São agentes de biofixação de CO₂;
- 6) Podem usar os nutrientes de águas residuais (N, K, P);
- 7) Apresentam coprodutos valiosos, como proteínas;
- 8) Sua composição bioquímica pode ser modulada em função do meio e das condições de cultivo.

O cultivo de microalgas marinhas apresenta menor potencial de contaminação por bactérias e fungos devido à natureza salina dos meios de cultivos (Gris, 2011).

A *Nannochloropsis oculata*, objeto de estudo desse trabalho, apresenta de 2 a 4 μm de diâmetro médio, tem formato esférico ou ligeiramente ovolóide e não apresenta flagelos. A Figura 1 apresenta uma imagem de microscópio da microalga. Ela é amplamente distribuída nos oceanos e demonstra grande resistência em meio competitivo algal (Lourenço, 2006; Soares, 2010).

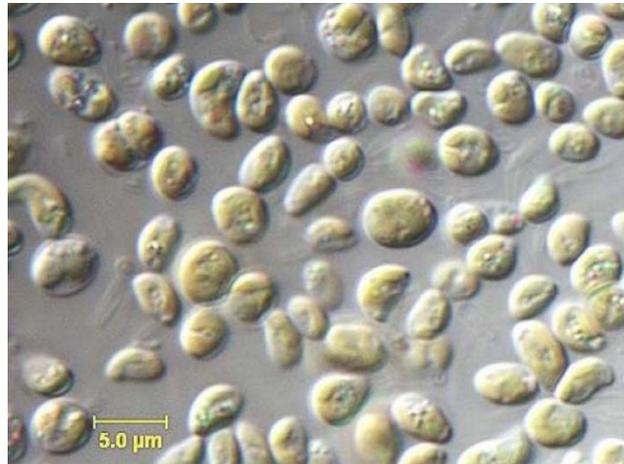


Figura 1 – Imagem de microscópio da *Nannochloropsis Oculata*. Adaptado de Soares (2010).

Ela é um microorganismo interessante no campo da biotecnologia marinha devido ao seu alto conteúdo lipídico. Muitas microalgas podem acumular lipídeos devido ao excesso fotossintético e algumas podem ainda acumular lipídeos sob regime heterotrófico ou condições de estresse, tais como restrição de nutrientes ou modificações na salinidade do meio. O interesse comercial na *Nannochloropsis* visa também o teor de ácido graxo poliinsaturados, os chamados PUFA. O teor de lipídeos na *Nannochloropsis oculata* pode variar entre 8 e 50%, dependendo da fase de crescimento, da temperatura, concentração de CO_2 e nitrogênio no meio de cultura. Existem relatos de aumento de 30% para 50% do conteúdo lipídico dessa microalga da fase exponencial para a fase estacionária. O perfil de ácidos graxos da *Nannochloropsis oculata* é semelhante ao de outras espécies de *Nannochloropsis* e essas foram identificadas como os produtores autotróficos mais promissores de EPA (ácido eicosapentaenóico, pertencente a família de $\omega 3$) para o consumo humano (Chiu *et al.*, 2009; Koller *et al.*, 2012; Yen *et al.*, 2013; Zhu e Dunford, 2013).

2.3 Condições e meio de Cultivo para microalgas marinhas

A água do mar contém aproximadamente 3,5% de substâncias dissolvidas, somando cerca de 70 elementos químicos diferentes em sua composição natural. Para o cultivo em laboratório de microalgas marinhas se faz necessário o uso de meio de cultivo que se aproxime dessa composição.

Lourenço (2006) divide os nutrientes para o cultivo algal em dois grupos: os macros e os micronutrientes. Os primeiros apresentam funções constitutivas das células, como compor a estrutura de membranas e da própria célula microalgal. Carbono, Hidrogênio, Oxigênio, Nitrogênio, Fósforo, Enxofre, Potássio, Magnésio, Silício e Ferro compõem esse grupo. Por outro lado, os micronutrientes auxiliam na atividade de diversas enzimas, fundamentais para o funcionamento da célula. São exemplos de micronutrientes o

Manganês, Molibdênio, Cobalto, Boro, Zinco e Cobre. Ele indica ainda, o uso de vitaminas para cultivos densos.

2.4 Regime de Cultivo

O termo microalga é normalmente utilizado em seu sentido mais restrito como sinônimo para algas unicelulares fotoautotróficas utilizando CO₂, com obtenção de energia a partir da luz. Embora certas espécies sejam obrigatoriamente fotoautotróficas, inúmeros microrganismos atualmente classificadas como microalgas são, na verdade heterotróficos obrigatórios e outros são capazes de ambos, metabolismos heterotróficos e fotoautotróficos, sequencialmente ou simultaneamente (Bumbak *et al.*, 2011).

2.4.1 Autotrófico

Autotrófico ou fotoautotrófico é o regime de cultivo mais comumente utilizado nos dias atuais para o crescimento de microalgas. Muitas microalgas são especialmente eficientes conversores de energia solar, por isso elas são cultivadas em ambiente iluminado, natural ou artificialmente. Sob cultura autotrófica, as células recuperam a energia da luz e utilizam CO₂ como uma fonte de carbono. A introdução de luz, natural ou artificial, suficiente para permitir o crescimento maciço e densas populações é o principal objetivo desse regime e também um fator limitante do cultivo: quanto mais luz, até o limite para a espécie, maior será o crescimento (Perez-Garcia *et al.*, 2011).

Atualmente, a produção autotrófica é o único método que é técnica e economicamente viável em grande escala para aplicações específicas, mas ainda não está plenamente desenvolvida para produção de biocombustíveis (Brennan e Owende, 2010).

Existem, porém, limitações de ordem prática para esse regime de cultivo. Por depender fortemente da energia transmitida via irradiação luminosa para a realização da fotossíntese, faz-se necessária uma geometria própria para o recipiente de cultivo, de modo a promover a dispersão homogênea de luminosidade dentro da cultura algal. Tradicionalmente, utilizam-se tanques ou bacias rasas, ou ainda reatores cuja área superficial seja elevada. Outra questão prática a ser avaliada é que o material dos reatores, quando em sistema fechado, deve ser translúcido, de modo a permitir a passagem da luz para o meio (Chisti, 2007; Brennan e Owende, 2010; Rawat *et al.*, 2013).

Huang *et al.* (2013) estudam os efeitos de suplementação de nitrogênio no meio de cultivo em três microalgas. O cultivo é feito em regime batelada em uma incubadora iluminada em frascos de 3 L com meio f/2 a 25°C e 150 μmol fótons m⁻²s⁻¹ por um período de 10 dias. As concentrações em nitrogênio em teste são 0; 0,22; 0,44; 0,88 e 1,76 mM. Os resultados mostram uma correlação positiva entre a concentração de nitrogênio e o crescimento de todas as três espécies testadas. Por outro lado, o teor lipídico parece reduzir-se com o aumento da concentração de nitrogênio, atingindo seu máximo, para a *Nannochloropsis oculata* no caso em estudo, a 35,85% na concentração de 0,22 mM de nitrogênio. O menor teor lipídico nessa microalga foi de 29,16% na maior concentração de nitrogênio.

Roleda *et al.* (2013) avaliam os efeitos da temperatura e quantidade de nutrientes sob o crescimento e conteúdo lipídico de seis microalgas oleaginosas. O estudo é realizado em batelada, em frascos de 500 mL, usando uma matriz de dois níveis de temperatura (10 e 20°C) e dois níveis de nutrientes (pleno e deficiente). Dentre as

microalgas testadas está a *Nannochloropsis oculata*, em que foi usado o meio de cultivo f/2. O fotoperíodo é de 16:8 h de luz/escuridão, com intensidade luminosa de $100 \pm 10 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$. O período de cultivo é de 12 dias, correspondendo a uma produtividade diária máxima em biomassa de 0,146 mg/mL, para o cultivo em temperatura de 20°C e pleno em nutrientes. Apresentando nessa mesma condição um teor orgânico em sua composição de 45%, o mais alto dentre os cultivos testados. O estudo sugere ainda que a redução de temperatura não parece ter efeito significativo sobre o teor de lipídeos na *Nannochloropsis oculata*, mas a restrição de nutrientes apresenta um aumento desse teor em todas as culturas testadas, sendo que a condição de baixa temperatura e restrição de nutrientes aumenta em 247% o teor lipídico na *Nannochloropsis oculata*, mas desencadeia uma redução no crescimento.

Além desses, diversos são os estudos avaliando o potencial da *Nannochloropsis oculata* em regime autotrófico. Dentre os mais relevantes para esse trabalho, está a dissertação de Gris (2011), que avalia as condições de crescimento da mesma cepa de microalga usada, em função das variações de concentração de nitrogênio, temperatura e intensidade luminosa, em fotobiorreator airlift em batelada. O cultivo foi avaliado durante 11 dias, com medidas diárias de absorvância em espectrofotômetro a 570 nm, e análises de peso seco, usando como meio de cultura f/2.

A maior concentração em biomassa que Gris (2011) observa é 482,7 mg/L, cultivada a 21°C, 105 mg/L NaNO_3 e 9000 lux. Outro ponto de destaque está a 453mg/L, cultivada a 27°C e demais condições iguais a anterior, o que leva a avaliar a pouca influência da temperatura frente aos outros dois parâmetros.

2.4.2 Heterotrófico

Uma alternativa viável para culturas em regime autotrófico, mas restrito a poucas espécies de microalgas, é a utilização da sua capacidade de crescimento quimioheterotrófico na ausência de luz e substituindo a fixação de CO_2 da atmosfera por fontes de carbono orgânico dissolvido no meio de cultura. Quimioheterotrofia é definida como a utilização de compostos orgânicos para o crescimento sem necessidade de fonte de luz. Quimioheterótrofos são organismos cujos substratos e necessidades de energia são adquiridas de compostos orgânicos sintetizados por outros organismos. Em se tratando de microalgas é comum o uso do termo heterotrófico como sinônimo de quimioheterotrófico. A composição do meio de cultura de base para as culturas heterotróficas é semelhante à cultura autotrófica com a única exceção de adição de carbono orgânico (Perez-Garcia *et al.*, 2011).

Cultivos heterotróficos podem ser realizados em fermentadores tradicionais, em que o controle de crescimento e esterilização é mais eficiente. Permitem cultivos mais densos, uma vez que não há necessidade de permitir passagem de luz até o interior do meio de cultivo, o que reduz o custo de colheita. Apresentam tradicionalmente maiores concentrações de lipídeos, podendo ser modulável pelo uso de fonte adequada de carbono. Ainda assim, esse regime é limitado pela concentração de oxigênio dissolvido, devendo apresentar boa aeração e agitação. Por apresentar substrato carbônico dissolvido no meio de cultivo, esse regime em relação ao autotrófico, apresenta maior capacidade de crescimento de cultivos indesejados, especialmente fungos e bactérias. Por esse motivo é recomendado o uso desse regime em reatores fechados, de material facilmente esterilizável e com controles periódicos de contaminação (Perez-Garcia *et al.*, 2011).

As características das microalgas para o crescimento heterotrófico são, segundo Perez-Garcia *et al.* (2011):

- 1) Ser capaz de realizar a divisão celular e ter metabolismo ativo em ausência de luz;
- 2) Aceitar como substrato orgânico no meio de cultivo compostos facilmente esterilizáveis;
- 3) Ter rápida adaptação a mudanças de ambientes;
- 4) Apresentar boa resistência mecânica a agitação e cisalhamento.

Gladue e Maxey (1994) apresentam um estudo com 121 cepas de microalgas avaliando o seu potencial de cultivo heterotrófico. Dentre as microalgas de estudo estão 12 cepas de *Nannochloropsis*, dentre elas a *Nannochloropsis oculata*. O estudo é dividido em três etapas e apenas as cepas que tem resultados satisfatórios passam para a próxima etapa. A primeira etapa testa a possibilidade de cultivo heterotrófico em tubos de ensaio de 5 ml cultivados a 20 e 25°C. Cada teste é acompanhado de um controle autotrófico e um controle negativo (teste em branco). Para a *Nannochloropsis oculata* o meio de cultivo é o SK suplementado com glicerol a 18 g/L (195 mM) e fonte complexa de nutrientes CN. Essa cepa apresenta resultado positivo na primeira etapa, passando para a segunda etapa que consiste do cultivo em frascos de shaker, a 26°C e rotação de 100-120 rpm. O crescimento celular é acompanhado por microscopia. O critério de crescimento nessa etapa é o tempo de geração, definido como a razão entre o tempo de cultivo e a diferença do logaritmo da concentração de massa algal, multiplicado por logaritmo de 2. A *Nannochloropsis oculata* não apresenta desempenho satisfatório na segunda etapa, com tempo de geração superior às 96h. Ela apresenta, portanto, tempo de crescimento lento comparado com as demais cepas testadas.

Segundo Liang (2013), para a produção abundante de produtos valiosos a partir de microalgas, em particular biocombustíveis, as microalgas devem ser cultivadas heterotroficamente, em que carbonos orgânicos, tais como açúcares ou ácidos orgânicos, servem como fonte de carbono e energia. Essa condição de cultura elimina o requisito de luz e, portanto, oferece a possibilidade de um grande aumento da densidade celular e da produtividade. No entanto, os impedimentos para essa cultura em escala comercial de microalgas heterotróficas ainda são econômicos. Para superar o obstáculo de custos na fabricação de biocombustíveis a partir de microalgas e torná-la economicamente viável, pelo menos, três áreas precisam ser exploradas:

- 1) Descoberta de fontes de carbono de baixo ou zero custo para suportar o crescimento de microalgas heterotróficas;
- 2) Projeto de biorreatores apropriados para o cultivo heterotrófico em escala industrial;
- 3) Identificação de vias adequadas para a conversão de biomassa de algas aos biocombustíveis.

2.4.3 Mixotrófico

Mixotrófico é um regime de crescimento variante do regime de crescimento heterotrófico, onde CO₂ e carbono orgânico estão simultaneamente assimilados e tanto o metabolismo respiratório quanto o fotossintético estão em operação (Perez-Garcia *et al.*, 2011).

Cultivos mixotróficos podem proporcionar um ambiente mais próximo ao ideal para o crescimento de microalgas, o que muitas vezes leva a uma maior taxa de crescimento em comparação com o cultivo convencional autotrófico. As taxas de crescimento e as concentrações de biomassa tendem a aumentar devido a um efeito sinérgico entre o uso de luz e CO₂, e o substrato orgânico. Entre todos os substratos possíveis, a utilização de glicerol como matéria-prima para o cultivo ganhou mais atenção recentemente. O glicerol é um subproduto do processo de produção de biodiesel. Estima-se uma proporção de cerca de 10% (w/w) na saída do processo. E seu uso como fonte de carbono pode reduzir os custos com o substrato (Liang, 2013; Yen *et al.*, 2013).

Fang *et al.* (2004) avaliam o efeito da fonte de carbono no crescimento heterotrófico e mixotrófico de *Nannochloropsis sp.* As amostras são cultivadas durante 7 dias em erlenmeyers de 250 ml em um shaker orbital de 100 rpm a 23°C. Um cultivo autotrófico é igualmente realizado para comparação. Testes periódicos de pureza por análise em microscópio são realizados. Como fontes de carbono são testadas glicose e etanol com 30 mM de concentração. Os melhores resultados de crescimento são encontrados para regime mixotrófico com glicose, 550 mg/L de biomassa e regime mixotrófico com etanol 510ml/L. Observa-se que nesse trabalho o regime heterotrófico apresenta o menor crescimento.

2.5 Fonte de carbono

Glicose é a fonte orgânica de carbono mais usualmente empregada em crescimento de microalgas. Ela proporciona altas taxas de crescimento e respiração, o que é devido ao seu alto teor energético, cerca de 2,8 kJ/mol (Perez-Garcia *et al.*, 2011). Entretanto, a *Nannochloropsis sp.* parece preferir o glicerol do que a glicose ou acetato como fonte de carbono (Wood *et al.*, 1999).

De toda a glicose absorvida pelas microalgas, cerca de 1% permanece como glicose livre. Mais de 85% da glicose é assimilada e convertida em oligossacarídeo (essencialmente sacarose, cerca de 50%) e polissacarídeos (principalmente amido, 30%). Contudo, existem teorias de que as microalgas não apresentam invertase para assimilação de sacarose a partir do meio de cultivo (Perez-Garcia *et al.*, 2011).

2.6 Sistema de cultivo

O sistema de cultivo de microalgas pode ser aberto ou fechado, de forma contínua, em batelada ou batelada alimentada (Chisti, 2007; Brennan e Owende, 2010; Bumbak *et al.*, 2011; Yi-Feng e Wu, 2011)

Comercialmente, sistemas abertos são as lagoas abertas de cultivo de microalgas, usadas desde os anos 1950. Elas podem ser naturais, lagos e lagoas, ou construídas de forma artificial na forma de tanques, em concreto, ou terra compactada forrada com plástico. São a forma de cultivo mais usual para sistemas autotróficos, pois apresentam baixo custo de instalação, entretanto estão sujeitas a contaminação do ambiente ao

entorno, via bactérias, fungos e outras culturas de microalgas. Tradicionalmente essas lagoas apresentam um mecanismo de agitação, para promover a aeração e evitar a sedimentação (Brennan e Owende, 2010).

Sistemas fechados apresentam-se na forma de biorreatores, cuja geometria é de extrema importância para cultivos autotróficos, devendo apresentar uma grande relação área/volume, a fim de possibilitar um melhor aproveitamento da luz solar. Em cultivos heterotróficos, a forma do reator pode ser a dos tradicionais fermentadores, usados para bactérias e fungos. Nesse sistema de cultivo o investimento é maior, porém as condições de crescimento e as contaminações podem ser controladas com precisão muito superior (Brennan e Owende, 2010; Perez-Garcia *et al.*, 2011; Rawat *et al.*, 2013). Operados de forma contínua, ambos os sistemas apresentam contínua injeção e retirada de biomassa. Em batelada, é inserido no sistema de cultivo, meio e inóculo e não há inserção extra durante o período de cultivo, na colheita é retirado todo o volume do cultivo e iniciado um novo. Batelada alimentada é a mistura dos dois processos, em que há uma inserção inicial de meio e inóculo, e posterior adição de meio extra para promover o crescimento do cultivo (Brennan e Owende, 2010; Bumbak *et al.*, 2011; Perez-Garcia *et al.*, 2011; Yi-Feng e Wu, 2011).

3 Materiais e Métodos

Este capítulo aborda o detalhamento dos materiais e métodos usados neste trabalho, em que se fez uso dos equipamentos e infraestrutura disponibilizados pelo Departamento de Engenharia Química.

3.1 Inóculo e banco de células

A cepa de *Nannochloropsis oculata* em estudo nesse trabalho foi cedida pelo Laboratório de Ecologia de Fitoplâncton e Microorganismos Marinhos, da Universidade Federal de Rio Grande. A manutenção do banco de células se deu em uma incubadora dotada de controle de temperatura e fotoperíodo, construída a partir de um refrigerador no trabalho de Gris (2011).

Para manutenção do banco, as células foram mantidas em regime autotrófico com repicagens em tubos de ensaio de 10 mL de volume útil e em erlenmeyers de 1000 mL. As condições das repicagens estão no Apêndice A –, e seguem a mesma metodologia adotada por Gris (2011).

Para os inóculos usados nos experimentos deste trabalho, partiu-se das células incubadas nos erlenmeyers de 1000 mL, que foram incubadas em bombonas de plástico de 5 L, com 4 L de volume útil, previamente esterilizadas com uso de água sanitária, na proporção 1:1000, e o cloro que restasse ativo foi neutralizado com solução de tiosulfato de sódio na mesma proporção. A repicagem nas bombonas foi feita usando a proporção 1:10, incubadas em regime autotrófico com fotoperíodo de 12 h, a 1500 lux, num período médio de 7 dias, em que a absorbância do inóculo chegasse a $1 \pm 0,1$ abs a 720 nm. Uma vez alcançado os valores desejados de absorbância, a mesma foi repicada para os diferentes experimentos.

O meio de cultura utilizado nesse trabalho foi o f/2, que é largamente utilizado em pesquisas de microalgas marinhas. Esse meio, neste estudo, foi modificado na sua composição de NaNO_3 , devido aos resultados atingidos por Gris (2011), que indicam que uma composição de 105 mg/L de NaNO_3 apresenta um maior crescimento da cepa de microalga estudada. Trata-se de um meio marinho artificial, formado pela combinação de 6 soluções estoques: meio salino, solução de vitaminas, solução de NaNO_3 , solução de metais-traços, solução de fosfato e solução de silicato. A Tabela 1 apresenta a composição do meio f/2 modificado, das soluções estoques, e a concentração final no meio de cultivo. Detalhes do preparo das soluções podem ser vistos no Apêndice A –B.

Toda a vidraria e material envolvido no processo de manutenção e repicagem dos inóculos foi devidamente limpo e esterilizado em autoclave, a 1 kgf/cm^2 e $121 \text{ }^\circ\text{C}$, por 30 min (prévio a sua utilização) ou 45 min (após o contato com as células). As autoclaves usadas nesse trabalho foram Autoclave vertical CS da Prismatec e Autoclave vertical AL da Phoenix Luterco. Materiais que devido ao tamanho ou fragilidade térmica não puderam ser esterilizados em autoclave, foram limpos com água sanitária ou com radiação UV, num período mínimo de 30 min.

Tabela 1 - Composição meio f/2 modificado utilizado

Solução (volume no meio final)		Reagente usado	Concentração solução estoque (mg/L)	Concentração meio f/2 modificado (mg/L)
Soluções estoques	Solução salina (1000 ml)	Sal marinho	33300	33000 ± 1000
	Nitrato (1,4 ml)	NaNO ₃	75000	105
	Fosfato (1ml)	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	5000	5
	Silicato (1ml)	Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	30000	30
	Metais-traços (1ml)	CuSO ₄ .5H ₂ O	9,8	9,8 x 10 ⁻³
		ZnSO ₄ .7H ₂ O	22,2	22,2 x 10 ⁻³
		CoCl ₂ .6H ₂ O	10	10 x 10 ⁻³
		MnCl ₂ .4H ₂ O	180	180 x 10 ⁻³
		Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	6,3	6,3 x 10 ⁻³
		FeCl ₃ .6H ₂ O	3,15	3,15
	Vitaminas (1 ml)	Na ₂ EDTA	4,36	4,36
		Tiamina (B ₁)	100	100 x 10 ⁻³
		Cianocobalamina (B ₁₂)	0,5	0,5 x 10 ⁻³
	Biotina (B ₇)	0,5	0,5 x 10 ⁻³	

Adaptado de Guillard (1975) apud Lorenço (2006)

3.2 Teste de ambientação

Foi realizada uma série de ensaios qualitativos a fim de verificar a viabilidade das condições básicas de metabolização heterotrófica pela microalga escolhida.

Para essa avaliação, utilizaram-se erlenmeyers de 250 mL, com volume útil de 200 mL aproximadamente, recobertos com papel *contact* preto em toda superfície externa, com exceção do bocal, que foi fechado com uma bucha fabricada em gaze, algodão hidrófobo e barbante. Foram realizados experimentos sem duplicata, usando como fonte de carbono açúcar extra fino comercial da marca eKonomico, avaliado em três concentrações 1, 3 e 5 g/L.

Os erlenmeyers (ver Figura 2) foram colocados na incubadora refrigerada shaker de bancada, marca Cientec, modelo CT-712RN, a 21°C, valor baseado nos resultados da dissertação de mestrado de Gris (2011), e com rotação de 75 rpm, com ajuste manual buscando equilíbrio entre agitação vigorosa e ausência de respingos na bucha utilizada para vedação do frasco.

Nesse experimento foram medidas apenas as absorbâncias no espectrofotômetro marca Pró-Análise, modelo UV-1600, no comprimento de onda 720 nm. O tempo de cultivo foi de 6 dias.

Uma vez ambientada, a microalga foi repicada e inoculada em meio novo para ser submetida a um período de 4 dias em ausência de luz, nas mesmas condições de temperatura e rotação no shaker.



Figura 2 – Frascos no interior da incubadora shaker para o teste preliminar de cultivo heterotrófico

3.3 Teste de concentração

Baseado nos resultados da ambientação foi feita outra série de experimentos em ausência de luz no shaker nas mesmas condições de temperatura e rotação. O objetivo dessa segunda série de testes foi definir a concentração e fonte de carbono. Partiu-se do inoculo mãe em regime autotrófico para a repicagem das amostras.

Esse experimento foi realizado em triplicata ou duplicata, variando a concentração e fonte de carbono. Como concentrações foram usadas 0,1 g/L, 1 g/L e 10 g/L, e como fonte de carbono testaram-se glicose e sacarose.

Nesse experimento foram testadas todas as concentrações com todas as fontes de carbono, resultando em 6 ensaios que foram feitos 5 em triplicata e 1 em duplicata, somando 17 erlenmeyers com amostra.

3.4 Fotobiorreatores

A mini-planta de fotobiorreatores utilizada nesse estudo foi construída no trabalho de mestrado de Gris (2011). Ela possui três prateleiras de aço de 120 cm de comprimento, 40 cm de largura e 69,5 cm de altura. Cada prateleira tem duas lâmpadas fluorescentes, acopladas a um circuito de modulação de tensão. Nesse experimento, as lâmpadas foram usadas na tensão máxima, e a intensidade luminosa foi modulada pelo posicionamento do reator na prateleira, por meio de medidas com um luxímetro LD-200, da Instrutherm, medido na face do reator em que a luz incide, na altura aproximada de 18,25 cm, entre as duas lâmpadas. As lâmpadas estão conectadas a um temporizador, de modo a permitir a variação no fotoperíodo. Nesse experimento, o fotoperíodo adotado foi de 12h.

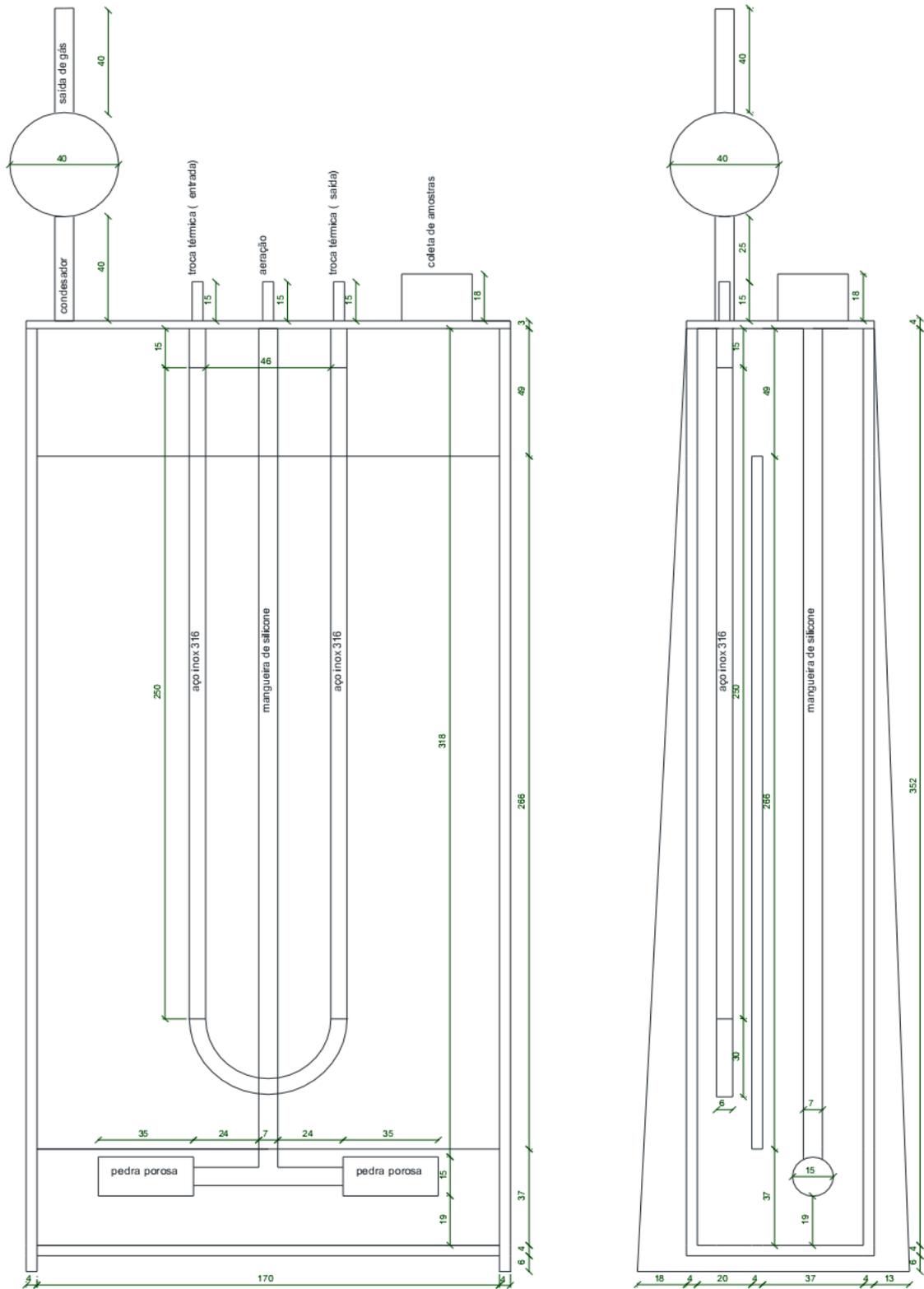


Figura 3 – Representação esquemática das dimensões do fotobiorreator - Retirado de Gris (2011)

A planta continha inicialmente 12 reatores, sendo que foram confeccionados outros 3 reatores para esse estudo. Todos os reatores foram construídos em acrílico transparente, apresentando formato retangular, com volume útil médio de 3195 ml \pm 54ml, com as dimensões descritas na Figura 3. A aeração é feita por duas pedras porosas na parte

inferior do *riser*, e a troca térmica é feita através de um trocador de calor, confeccionado em aço inox 316, em forma de U, acoplado com mangueiras, dentro do qual há circulação de água para promover o resfriamento. As amostras são coletadas pelo orifício na parte superior. Tem-se também, acoplado ao reator, um pequeno condensador para a saída de gases.

O potencial de transferência de massa do fotobiorreator foi medido por Gris (2011), na temperatura de 19°C, para as vazões de ar de 500, 750 e 1000 ml/min, o coeficiente volumétrico de transferência de massa na fase líquida apresentou os valores, 21,24 h⁻¹, 28,62 h⁻¹ e 31,68 h⁻¹, respectivamente. Essa medida não foi refeita neste trabalho.

3.5 Planejamento Experimental

Para os experimentos em fotobiorreator, foram usadas as condições de melhor crescimento indicadas no trabalho de Gris (2011) para o cultivo da *N. Oculata* em fotobiorreator em regime autotrófico.

As condições são as seguintes:

- Intensidade luminosa de 9000 lux;
- Meio de cultivo f/2, modificado a concentração de NaNO₃ de 75 para 105 mg/L;
- Temperatura entre 21 e 27°C;

Para o cultivo em regime mixotrófico, heterotrófico e branco foi acrescentado ao meio 30 mM de carbono de uma fonte orgânica, com base nos resultados dos testes preliminares e em estudos encontrados na bibliografia (Fang *et al.*, 2004), sendo testadas três fontes:

- Glicose (C₆H₁₂O₆);
- Sacarose (C₁₂H₂₂O₁₁);
- Glicerina (C₃H₈O₃);

Em regime heterotrófico o fotobiorreator foi recoberto por papel alumínio em toda sua extensão.

O controle de contaminações foi realizado através de um experimento em triplicata em “Branco”, ou seja, sem a adição da microalga. Usou-se como fonte de carbono no controle a glicose.

Para testar as três fontes de carbono, em ambos os regimes e em triplicata, foram necessárias duas bateladas de experimentos. A sequência de experimentos e a divisão por bateladas seguem na Tabela 2.

Note que o experimento em negrito (Glicose mixotrófica), foi realizado em ambas as bateladas, para permitir uma avaliação da repetitividade das condições do experimento.

O tempo de cultivo foi definido na primeira batelada, tendo como limite de cultivo quando uma das culturas começasse a decair em absorbância. Isso se deu ao longo do 3º dia de cultivo.

Tabela 2 – Planejamento experimental para os experimentos em fotorreator separados em duas bateladas, realizado em triplicata (A,B,C)

	Cultivo	Triplicata		
1º BATELADA	Sacarose Mixotrófica	1A	1B	1C
	Glicose Mixotrófica	1A	1B	1C
	Sacarose Heterotrófica	1A	1B	1C
	Glicose Heterotrófica	1A	1B	1C
2º BATELADA	Autotrófico	2A	2B	2C
	Glicerina Mixotrófica	2A	2B	2C
	Glicose Mixotrófica	2A	2B	2C
	Glicerina Heterotrófica	2A	2B	2C
	Branco	2A	2B	2C

No período de cultivo, análises diárias de absorbância e peso seco foram realizadas. A Figura 4 apresenta a disposição dos reatores na planta.



Figura 4 – Foto da planta de fotorreatores durante o segundo dia da segunda batelada de experimentos

3.6 Análises/ Metodologia

Para acompanhar o crescimento das células fez-se uso de método de espectrofotometria visível, no comprimento de onda de 720 nm. A utilização de medidas de densidade óptica baseia-se na obstrução física da passagem da luz pelas células. Quanto maior for a concentração das células, maior será o impedimento óptico, aumentando a absorbância, segundo previsto pela lei de Lambert-Beer. As análises de absorbância foram realizadas no espectrofotômetro modelo Pró-Análise, de marca UV-1600, em cubeta de vidro, sem dupla.

O comprimento de onda para análise de absorbância foi escolhido de modo a evitar os picos dos espectros das clorofilas a e b, presentes em organismos fotossintetizantes.

As amostras foram colhidas dos fotorreatores com o auxílio de uma pipeta automática de 10 ml, e alocadas em béqueres, todos previamente limpos e esterilizados em bancada de fluxo laminar vertical Pachane, modelo Pa50, com Radiação UV por, no mínimo, 30 min. Uma vez todas as amostras coletadas, os béqueres foram levados para a sala do espectrofotômetro, e uma a uma, as amostras foram medidas, limpando a cubeta com água destilada entre as amostras. O espectrofotômetro foi previamente zerado com a cubeta de amostras contendo água destilada. O restante das amostras foi esterilizado com água sanitária marca Proquill e descartado.

Esse procedimento, entre a coleta das amostras e o final das análises, leva aproximadamente 1h.

Para as análises de peso seco, foram retiradas alíquotas, em duplicatas, de volume de 200 ou 150 ml, de apenas uma das triplicatas (a de maior absorbância), e filtradas com microfiltro de fibra de vidro GF-3 0,7 µm da marca Marcherey-Nagel, de diâmetro 125 mm, previamente pesado. Para evitar que haja meio de cultivo retido no filtro juntamente com a biomassa, realizou-se lavagens do filtrado com água destilada. E para facilitar a filtração, usou-se uma bomba à vácuo, modelo 131A, de ¼ de CV, marca Prismatec.

Uma vez as amostras filtradas, o papel de filtro com o conteúdo em biomassa, foi seco em estufa a 75°C por aproximadamente 24h, até peso constante. A temperatura usada foi escolhida de modo a não degradar o produto microalgal. A estufa utilizada foi a modelo 5, marca Med Clave. Após a secagem, o papel de filtro foi retirado da estufa e colocado em dessecador de sílica para esfriar. Depois de frio, o papel foi pesado, numa balança analítica, marca BOSCH, modelo SAE 200.

4 Resultados

No presente capítulo são apresentados e discutidos os resultados desse trabalho. A abordagem começa pelos resultados dos testes preliminares, partindo para os dados obtidos na planta de fotobiorreatores e por fim uma discussão sobre as evidências de contaminação.

4.1 Testes preliminares

Conforme descrito anteriormente, foram realizados testes preliminares para avaliar o potencial de crescimento em regime heterotrófico da microalga. O primeiro teste avaliou o potencial de desenvolvimento da microalga em ausência de luz, em meio suplementado com açúcar, conforme citado anteriormente, em três concentrações distintas, 1, 3 e 5 g/L.

Observa-se que nas primeiras 150 horas há crescimento, mas não é evidenciada diferença entre as concentrações. A Figura 5 evidencia que após a segunda repicagem, já em regime heterotrófico, a concentração de 1 g/L se sobressai no valor da absorbância das demais. Observa-se ainda uma nítida descoloração da cultura, mostrada na Figura 6.

Com base nos resultados desse teste de ambientação, partiu-se para um experimento com valores mais espaçados de concentração de fonte de carbono, e foi testado como fonte de carbono, na forma de reagentes PA, glicose e sacarose, nas concentrações 0,1; 1 e 10 g/L.

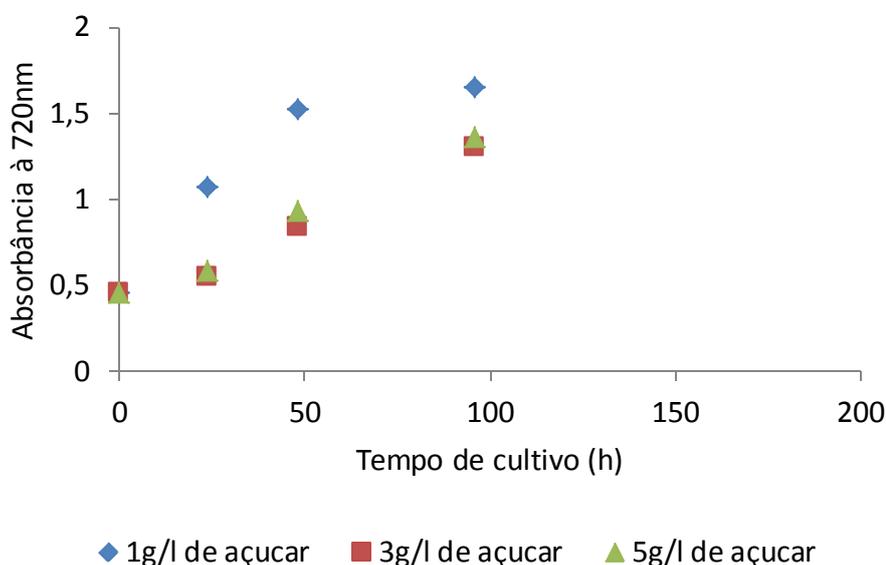


Figura 5– Curva de absorbância em função do tempo de cultivo para o segundo teste de ambientação da *Nannochloropsis Oculata* na ausência de luz

Nas avaliações da concentração de glicose residual nos meio de cultivo, não foi possível usar a curva de calibração da concentração em glicose pela reação com DNS (3,5 dinitro salicilato) em função da medida de absorbância, uma vez que a presença da massa algal, interfere na medida, resultando em valores de absorbância maior. Em virtude dessa interferência, optou-se por abandonar essa análise nos experimentos posteriores.



Figura 6 – Comparação visual de intensidade de coloração verde entre cultivo heterotrófico (erlenmeyer) e autotrófico (bombonas)

Apresenta-se, portanto, unicamente a avaliação qualitativa do consumo de glicose nos experimentos através da Figura 7, em que são apresentadas as variações da absorbância correspondendo a reação com DNS, com influência da biomassa presente no meio, em função do tempo de cultivo.

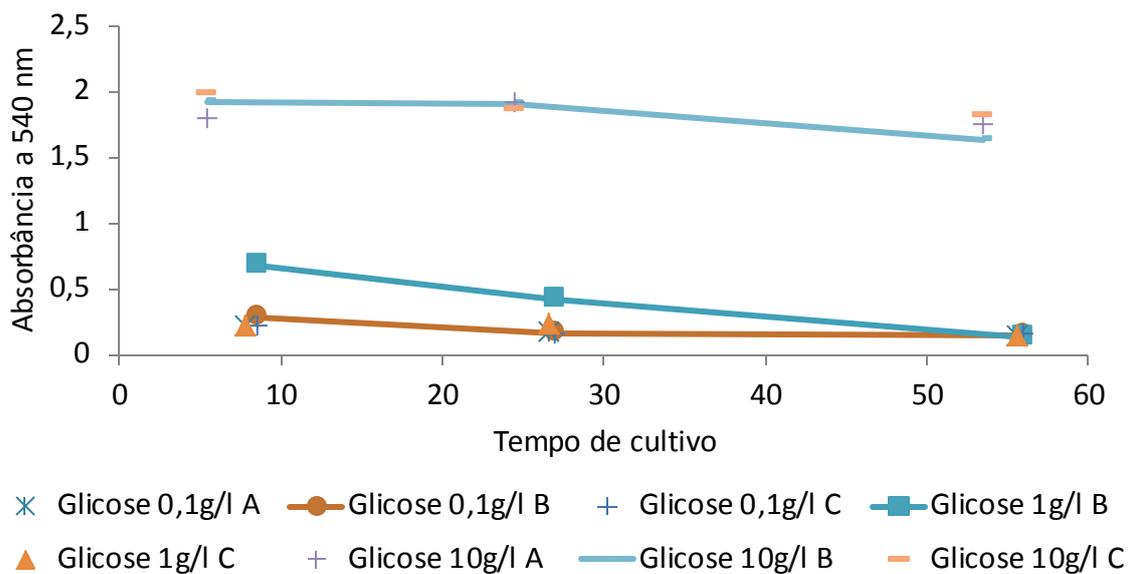


Figura 7 - Curva de absorbância em função do tempo de cultivo avaliando a concentração de glicose pela reação com DNS.

É possível perceber, ainda que de modo qualitativo, que há um decréscimo da concentração de glicose no meio, e que nos cultivos com concentração elevada, a variação de concentração através do consumo da fonte de carbono pela microalga não parece ser muito superior àquela encontrada na concentração de 1 g/L.

Acoplado os dados da Figura 8, surge a hipótese de que uma elevada concentração na fonte de carbono possa ser prejudicial ou no mínimo indiferente para o crescimento da microalga. Visto que as absorbâncias em 720 nm em concentração elevada não chegaram aos valores alcançados pelo cultivo a 1 g/L.

Os experimentos em concentração baixa, 0,1 g/L, mostram que essa concentração é insuficiente para sustentar um crescimento algal representativo nessas condições.

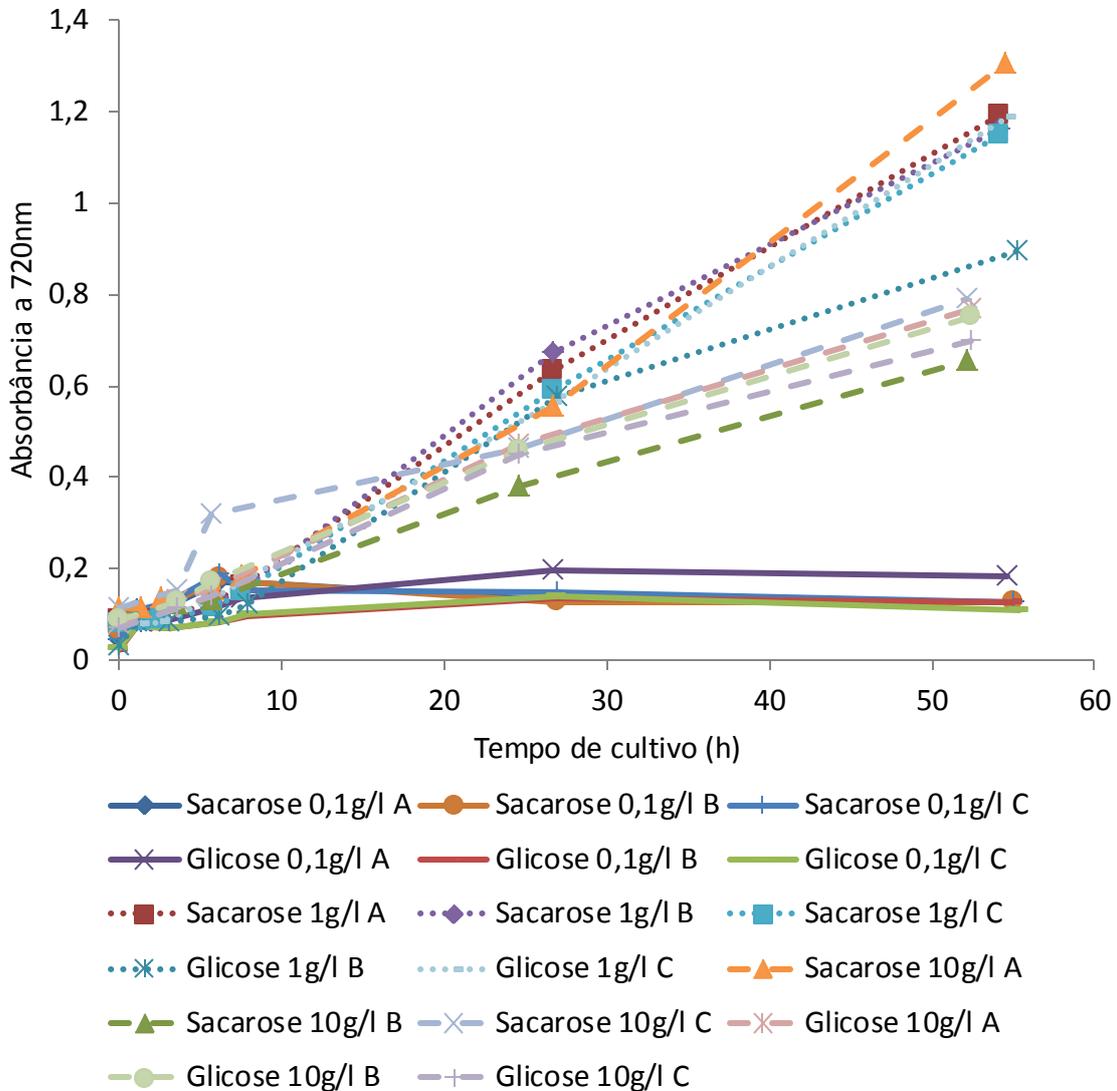


Figura 8—Resultados do teste de concentração, apresentado em forma de curva de absorbância em função do tempo de cultivo para cultivo heterotrófico

Observa-se ainda uma incoerência em relação a tendência geral da curva da Sacarose 10g/L A, como pode ser visto na Figura 8, que apresenta-se acima das demais. Um comportamento inverso é demonstrado pela curva Glicose 1g/L B. É possível que esses dois experimentos tenham sido trocados durante a prática.

4.2 Experimentos nos fotobiorreatores

Esta seção mostra os resultados principais desse trabalho, através da análise dos dados obtidos no fotobiorreator pela comparação direta dos resultados obtidos nos três regimes e com as três fontes de carbono testadas.

Para uma avaliação individual dos experimentos em triplicatas é possível consultar o Apêndice C.

São apresentadas aqui as curvas de correlação entre as análises de absorvância e as de peso seco. Em seguida, é feita a discussão dos resultados em concentração de biomassa.

A fim de permitir a comparação entre as duas bateladas de experimentos, uma condição específica foi realizada em ambas as bateladas, o experimento de glicose em regime mixotrófico. A Figura 9 apresenta os resultados das duas bateladas. Observa-se um deslocamento na curva de crescimento da segunda batelada, devido principalmente à contribuição do experimento 2A. Observa-se que a variância da segunda batelada está mais elevada do que a da primeira, mas as duas curvas apresentam comportamentos semelhantes, portanto serão consideradas experimentalmente iguais dentro dos erros da técnica usada, permitindo a comparação entre os resultados das duas bateladas.

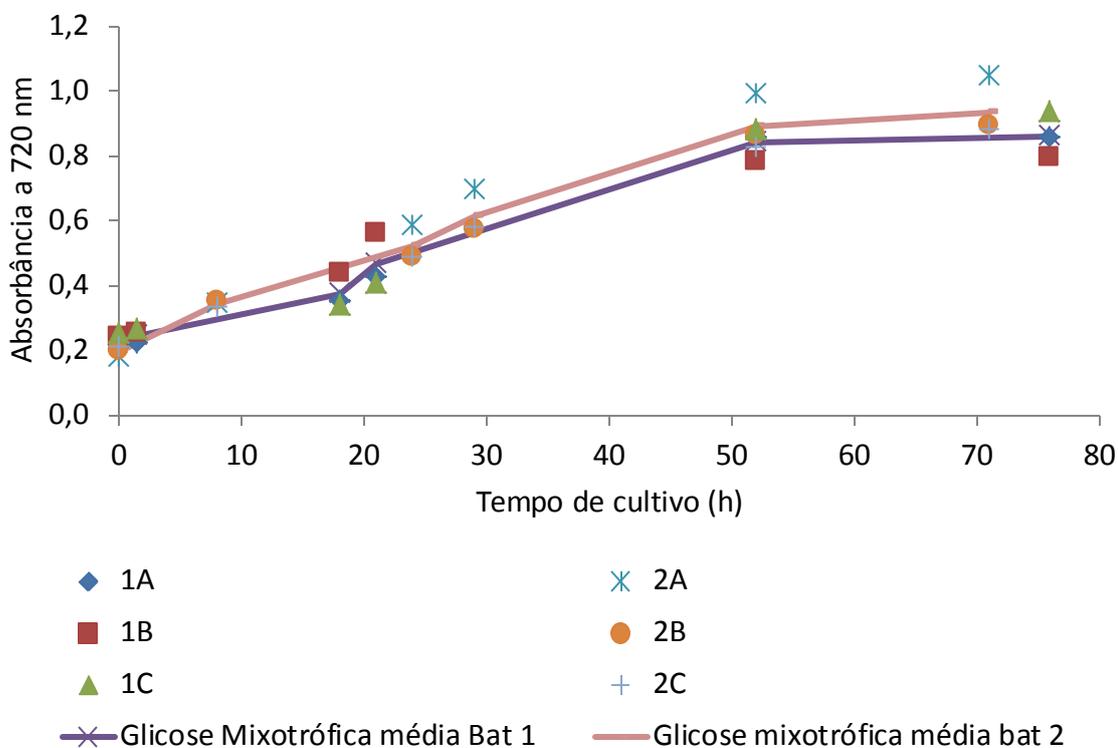


Figura 9 – Comparação da evolução temporal nos experimentos para glicose mixotrófica na 1ª batelada (1A, 1B e 1C) e 2ª batelada (2A, 2B e 2C)

4.2.1 Curva de correlação entre absorvância e peso seco

Neste tópico, serão abordados os resultados das curvas de concentração em biomassa, medidas por peso seco, com os resultados das análises de absorvância.

Na primeira batelada de experimentos, realizou-se a análise de peso seco somente após o término do tempo de cultivo, pois supostamente a relação concentração vs absorvância deveria ser uma reta que passasse pela origem, uma vez que na ausência de microalgas a absorvância lida é nula, comprovada pelo uso do meio como branco nas análises no espectrofotômetro. A Figura 10 mostra essas relações passando pela origem para os experimentos da primeira batelada.

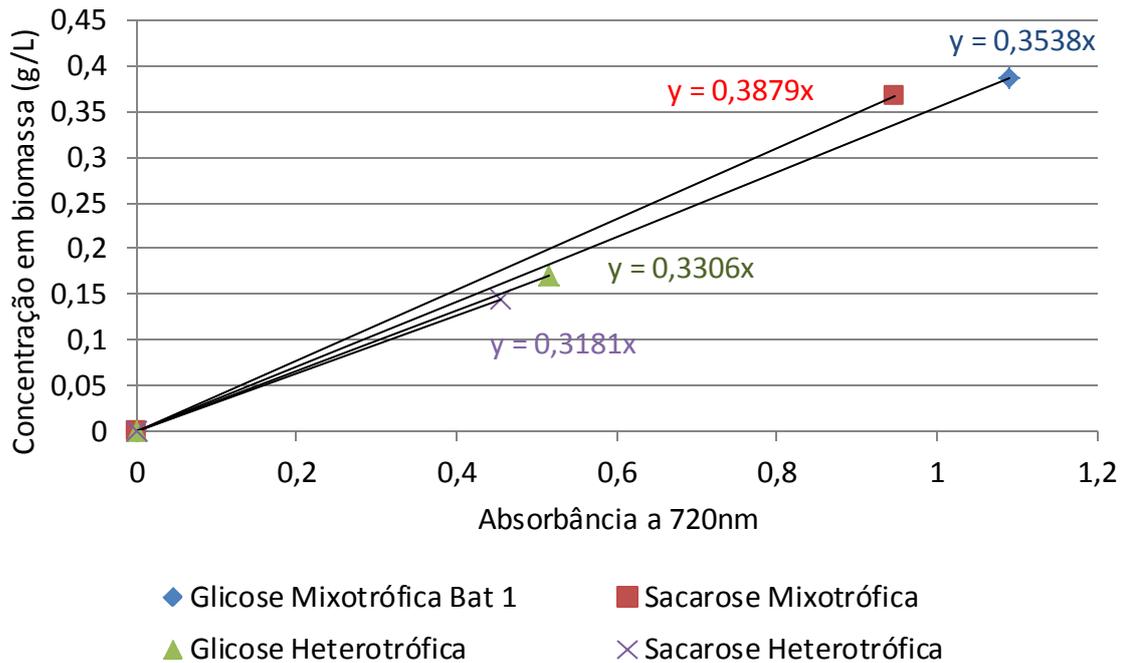


Figura 10 – Regressões lineares da concentração em função da absorbância na batelada 1

Entretanto, o término dessa batelada só foi possível, após 148 horas do início do experimento. Portanto, esses resultados de concentração de biomassa, baseados nas medidas de peso seco, foram tomados na fase de declínio dos cultivos heterotróficos podendo, portanto não representar corretamente a relação desejada.

Para a segunda batelada, foram realizadas análises diárias de peso seco em uma das triplicatas de cada experimento, sendo escolhida a condição que apresenta maior absorbância no início do experimento. A saber: autotrófico 2A, glicerina heterotrófica 2C, glicerina mixotrófica 2C, glicose mixotrófica 2C e branco 2C. Esse último será detalhado em capítulo próprio sobre a contaminação.

Os resultados dessas análises de peso seco, ao contrário do esperado, apresentaram grande variabilidade de resultados, e em alguns casos um coeficiente de correlação menor do que 0,50.

Na sequência, são apresentados e discutidos os dados para cada um dos experimentos da segunda batelada.

Em regime autotrófico, os resultados da análise de peso seco apresentaram uma baixa variabilidade, conforme Figura 11, quando comparada aos demais experimentos desse estudo.

Para fins de cálculo da correlação linear, foi desprezado um dos pontos experimentais, pois o mesmo encontrava-se muito fora da tendência geral dos demais, devendo resultar de algum erro de pesagem ou de avolumação da amostra usada.

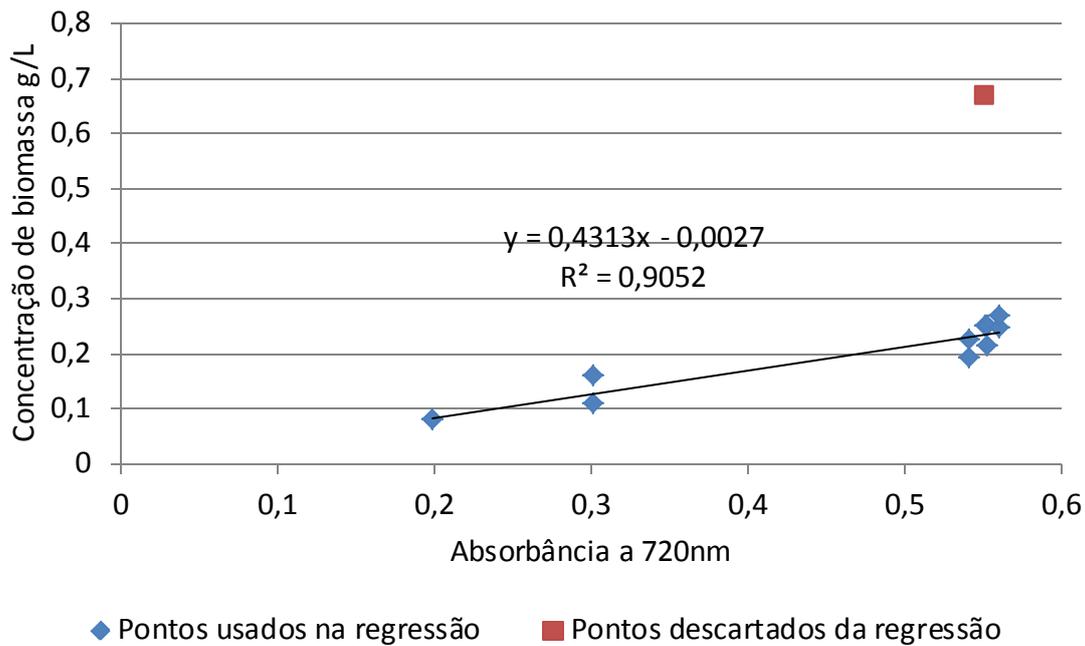


Figura 11 - Regressão linear da concentração em função da absorbância para regime autotrófico

Observa-se ainda que o coeficiente linear, aqui representado por $-0,0027$ não está distante do ponto zero, o que está de acordo com o esperado pela lei de Lambert-Beer.

Para o regime heterotrófico, conforme mostrado na Figura 12, obtém-se o pior coeficiente de correlação dentre as amostras contendo microalgas, avaliado em $0,4927$, mesmo com a exclusão de 2 pontos experimentais extremos. Observa-se ainda o coeficiente linear que se afasta do ponto zero, e o coeficiente angular que aumentou em quase 5 vezes em comparação com o valor encontrado no regime autotrófico.

Não é possível explicar com clareza o que levou a tamanha dispersão dos dados, mas algumas hipóteses surgiram ao fazer a avaliação dos mesmos, infelizmente nenhuma delas pôde ser confirmada na prática. As hipóteses são as seguintes:

- 1) O uso de glicerina como fonte de carbono, por ser um reagente com alta viscosidade, pode ter permitido a criação de zonas de concentrações elevadas em detrimento de zonas mais diluídas, o que poderia levar a resultados bem distintos quando da filtração da amostra, se houvesse acúmulo de glicerina na microalga retida pelo filtro, apesar das lavagens com água destilada. A mesma provavelmente não seria evaporada na estufa que se encontrava a 75°C , visto que seu ponto de ebulição é a 290°C (Brenntag Química), contribuindo para o aumento de massa e dispersão dos pontos.
- 2) A transição de regimes de cultivo, do autotrófico para o heterotrófico, pode levar a uma modificação da relação entre a concentração em biomassa e a absorbância. É possível que essa alteração de metabolismo na microalga durante o experimento tenha contribuído para a dispersão dos dados, pois, nessa hipótese, duas relações distintas entre os parâmetros estudados existiriam, não permitindo assim a avaliação indistinta dos dados para encontrar a correlação desejada.

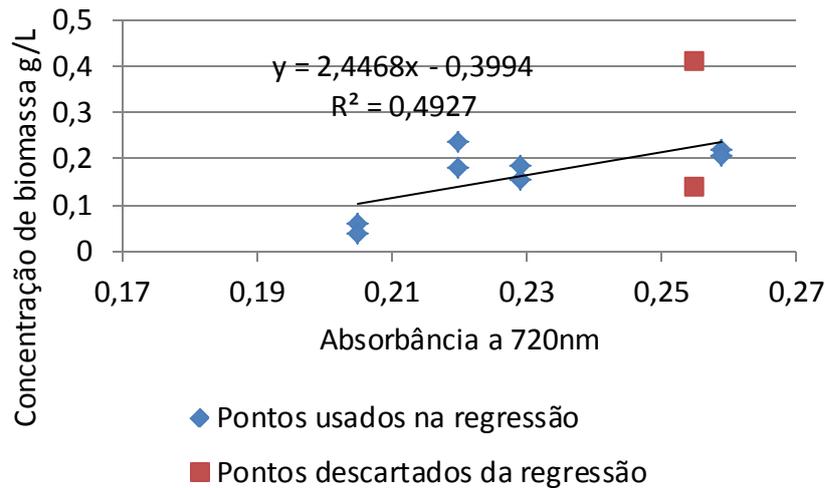


Figura 12 – Regressão linear da concentração em função da absorvância para glicerina em regime heterotrófico

No experimento realizado com glicose em regime mixotrófico, conforme Figura 13, teve-se o maior coeficiente de correlação nesse estudo, excluindo apenas um ponto que pareceu estar fora da tendência geral.

Observa-se que o coeficiente linear, -0,0336, não está tão próximo ao ponto zero quanto o encontrado no regime autotrófico, mas o coeficiente angular não apresenta muita diferença do encontrado para o regime autotrófico, 0,4539 e 0,4313, respectivamente.

Por se tratar de um regime intermediário, entre o autotrófico e o heterotrófico, era esperado que o mesmo apresentasse características de um e de outro. Justifica-se aqui o aumento do coeficiente angular pela contribuição de crescimento com uso de fonte de carbono orgânica e o distanciamento do coeficiente linear do ponto zero, deve-se, provavelmente, ao explicitado na hipótese 2) quando foi abordado o experimento de glicerina em regime heterotrófico, a transição de regimes de cultivo.

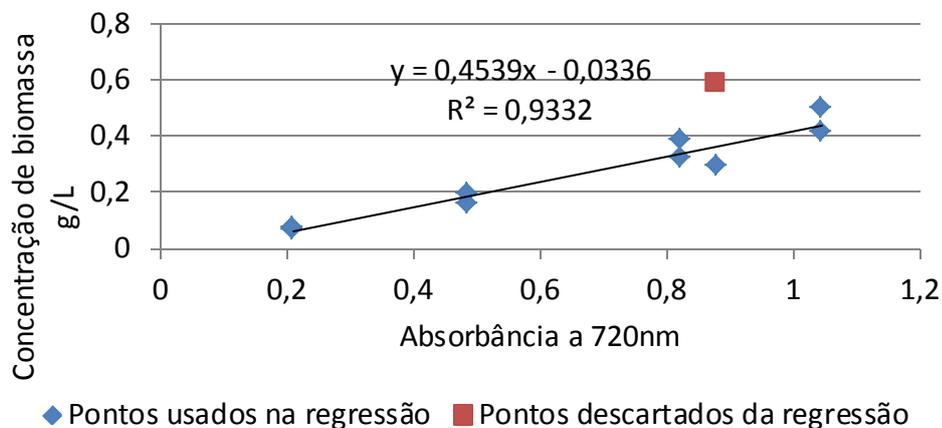


Figura 13 - Regressão linear da concentração em função da absorvância para glicose em regime mixotrófico

Nota-se no experimento com glicerina em regime mixotrófico, representado na Figura 14, uma dispersão de dados semelhante à encontrada quando do uso de glicerina em regime heterotrófico. Entretanto, aqui, observa-se uma tendência mais clara de crescimento da concentração de biomassa com o aumento da absorbância.

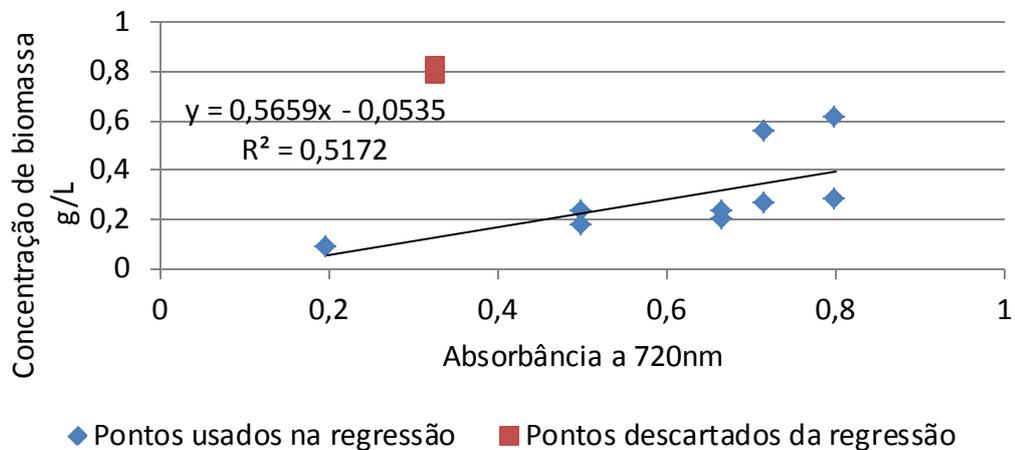


Figura 14 - Regressão linear da concentração em função da absorbância para glicerina em regime mixotrófico

Para o cálculo da correlação linear, foram excluídos os dois pontos da análise de peso seco realizada no segundo dia, que apresentavam uma concentração maior do que a encontrada ao término do experimento. A hipótese levantada para tamanha discordância dos dados é a explicada na hipótese 1, quando da análise do experimento de glicerina heterotrófica.

Apesar da grande dispersão dos dados, o coeficiente angular não se apresenta muito distante dos encontrados em regime autotrófico e em mixotrófico com glicose, conforme era o esperado. Da mesma maneira que o ocorrido no experimento de glicose mixotrófica, observa-se um distanciamento do coeficiente angular em relação ao ponto zero, cuja hipótese de explicação é a indicada como número 2) quando da análise do regime heterotrófico com glicerina.

De modo geral, foi possível perceber que as correlações entre concentração em biomassa e absorbância sofrem grande influência do regime em que se encontra o cultivo, e que a correlação distancia-se da origem quanto maior for o caráter de transição de regimes a que está submetido o experimento. Por esse motivo, as correlações encontradas para a batelada 1 em regime mixotrófico, não serão usadas, visto que elas compreendem apenas um ponto experimental. No lugar, serão usadas como aproximação de correlação, a correlação linear encontrada para a glicose em regime mixotrófico para os regimes mixotróficos da batelada 1. Por falta de melhor correlação, serão empregadas as correlações obtidas com apenas uma análise de peso seco para os regimes heterotróficos da primeira batelada. Ainda, serão considerados como pertencentes ao regime autotrófico os dois primeiros pontos de todos os experimentos, e suas concentrações em biomassa calculadas como tal. A Tabela 3 apresenta um resumo das correlações usadas em cada caso.

Tabela 3 – Resumo das correlações peso seco vs absorvância usadas neste trabalho

Regime	A - Coeficiente angular	B - Coeficiente linear	R ²
Autotrófico	0,4313	-0,0027	0,9052
Glicerina Heterotrófico	2,4468	-0,3994	0,4927
Glicose Heterotrófico	0,3306	0	NA
Sacarose Heterotrófico	0,3108	0	NA
Glicerina Mixotrófico	0,5659	-0,0535	0,5172
Outros Mixotrófico	0,4539	-0,0336	0,9332
Equação:	Concentração em biomassa (g/L) = A x Absorvância (720nm) + B		

4.2.2 Avaliação da concentração em biomassa

A Figura 15 mostra os resultados do experimento em fotobiorreator. É possível ver que as culturas mixotróficas começam a se sobressair pela elevação de concentração de biomassa a partir da 30ª hora, apresentando até a 76ª hora de cultivo concentrações superiores quando comparada com as culturas autotróficas e heterotróficas.

Dentre os cultivos mixotróficos, observa-se que aquele usando glicerina como fonte de carbono, apresenta crescimento mais lento e a menor concentração em biomassa ao final do experimento.

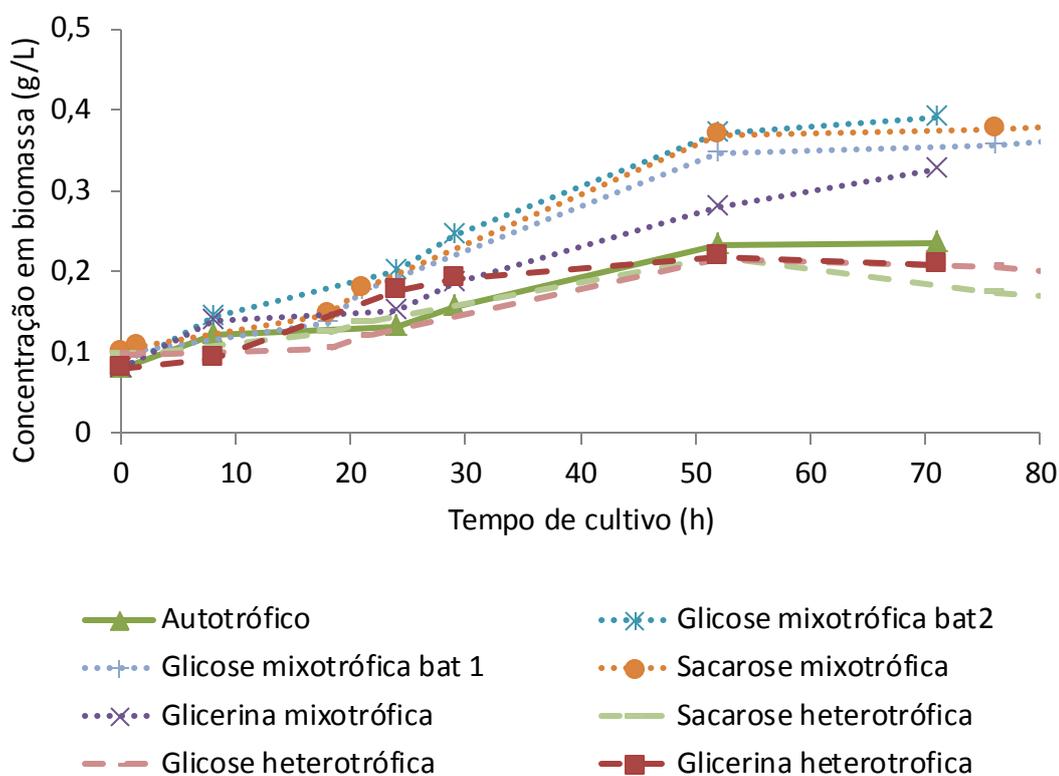


Figura 15 – Curva de concentração de biomassa em função do tempo de cultivo, apresentando os resultados obtidos no experimento em fotorreator airlift

Tabela 4–Comparativo de crescimento entre os cultivos estudados neste trabalho

	Concentração (g/L)				% crescimento	Diferença em relação ao autotrófico
	Tempo de cultivo (h)	0	76	σ (g/L) Desvio padrão		
1° batelada	Sacarose heterotrófica	0,096	0,175	0,015	82%	-26%
	Glicose heterotrófica	0,098	0,205	0,020	110%	-13%
	Sacarose mixotrófica	0,100	0,376	0,007	275%	60%
	Glicose mixotrófica bat 1	0,098	0,357	0,032	264%	52%
2° batelada	Tempo de cultivo (h)	0	71	σ (g/L)	% crescimento	Diferença em relação ao autotrófico
	Glicerina heterotrófica	0,080	0,207	0,041	160%	-12%
	Autotrófico	0,080	0,235	0,004	194%	0%
	Glicerina mixotrófica	0,080	0,328	0,021	312%	39%
	Glicose mixotrófica bat2	0,081	0,392	0,041	383%	67%

Tabela 5 – Avaliação da razão mássica entre a fonte de carbono suplementada ao meio de cultura e o aumento em relação ao cultivo sem suplementação de carbono

Fonte de carbono	Ganho em biomassa em relação ao autotrófico g/L	Formula Molar	Massa Molar (g/mol)	N° Carbonos	Concentração usada no experimento (g/L)	Razão massa fonte de carbono e ganho em biomassa (g/g)
Sacarose	0,140	C12H22O11	342,24	12	0,856	6,1
Glicose bat 1	0,122	C6H12O6	180,16	6	0,901	7,4
Glicose bat 2	0,157	C6H12O6	180,16	6	0,901	5,7
Glicerina	0,093	C3H8O3	92,09	3	0,921	9,9

A Tabela 4 mostra o comparativo em relação à razão de crescimento interno de cada experimento, ou seja, o quanto a cultura cresceu em relação ao tempo inicial. Ela mostra ainda um comparativo entre a concentração final em regime autotrófico e os demais experimentos.

Os dois experimentos que se destacam pelo aumento significativo da concentração em biomassa em relação ao autotrófico são os experimentos em regime mixotrófico

usando como fontes de carbono a sacarose e a glicose, obtendo relações de até 67% de aumento na concentração de biomassa.

Não foi possível confirmar neste estudo a hipótese de que as microalgas não apresentam invertase para a assimilação da sacarose. Embora a presença ou não da invertase não seja o ponto de discussão nesse estudo, foi possível observar a assimilação de sacarose para promover o crescimento da microalga, tanto em regime mixotrófico quanto heterotrófico, com concentrações finais de biomassa muito próximas das encontradas com o uso de glicose como fonte de carbono orgânico.

Uma avaliação do potencial de ganho em concentração de biomassa com base na massa da fonte de carbono adicionada ao meio para os regimes mixotróficos, ilustrada na Tabela 5, mostra que a sacarose e a glicose além de apresentarem ambas altas concentrações em biomassa, apresentam também razões entre a massa adicionada de fonte de carbono e a biomassa “extra” gerada por essa adição muito próximas, sendo, portanto mais eficientes do que a glicerina de um ponto de vista puramente mássico. Para uma avaliação mais realista, é necessário levar em consideração os valores comerciais de todas as fontes, para que a análise possa ser feita do ponto de vista econômico igualmente.

Buscando na literatura citada na revisão bibliográfica por valores de referência para os cultivos estudados, é possível traçar um paralelo entre os resultados encontrados nesse trabalho e os resultados esperados.

O trabalho de Fang *et al.*(2004) mostra que o regime mixotrófico apresentou o maior incremento da concentração de biomassa, embora não tenha sido possível chegar, neste trabalho, a valores tão elevados quando os reportados no estudo citado. Fang *et al.* (2004) alcançaram valores 46% maiores em concentração de biomassa com cultivo de 7 dias, usando a mesma concentração da fonte de carbono, 30mM, porém partindo de valores iniciais de biomassa inferior a 0,1 g/L, valor inicial aproximado deste trabalho. Os valores iniciais de concentração de biomassa nos experimentos de Fang *et al.*(2004) não são mencionados explicitamente no trabalho. Ainda seguindo a tendência dos estudos de Fang *et al.* (2004), o regime heterotrófico mostrou-se pouco atrativo, pois apresenta baixo crescimento. Entretanto, ao contrário do explicitado no estudo citado, não foi possível observar uma diferença significativa entre os cultivos autotróficos e heterotróficos, ficando ambos com a mesma ordem de grandeza na concentração em biomassa.

A Figura 16 apresenta um comparativo entre os estudos de Fang *et al.* (2004), Gris (2011) e o presente trabalho.

Observa-se que neste trabalho não foi possível alcançar os mesmos valores de concentração reportados nos demais estudos. Mas o tempo de cultivo desse estudo foi diminuto em relação aos demais, de modo que com apenas três dias de cultivo, obteve-se concentrações como 0,376 g/L, não tão distantes das referências.

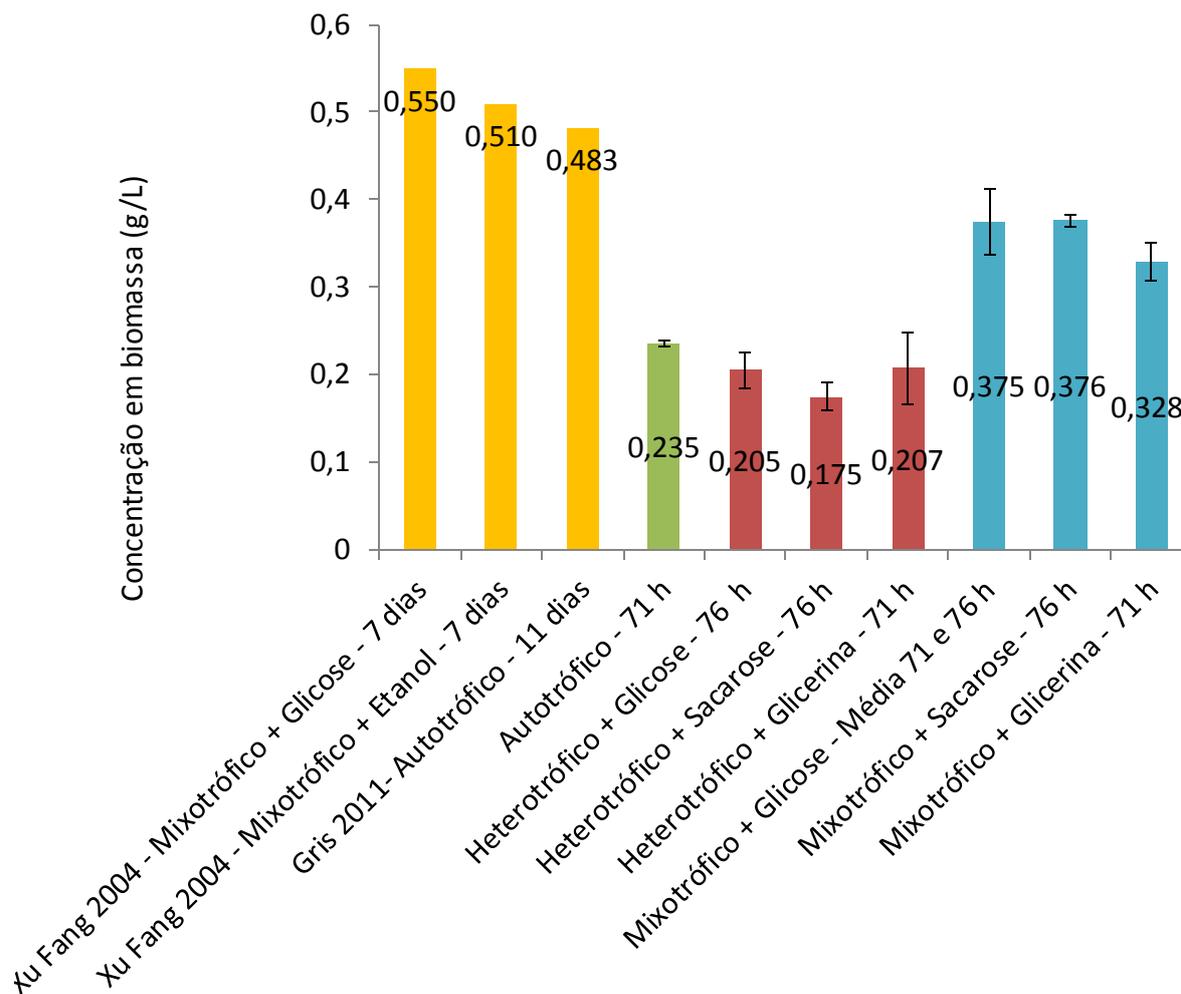


Figura 16 – Comparativo das concentrações finais com resultados finais encontrados na bibliográfica

4.3 Contaminações

Com o intuito de avaliar as possíveis contaminações durante o experimento, foi realizado um experimento em branco, ou seja, com o mesmo procedimento dos demais: inclusão de meio e fonte de carbono (a escolhida foi a glicose), porém sem adição de microalga.

A Figura 17 apresenta o acompanhamento da absorbância desse experimento com o tempo. É possível avaliar claramente a presença de contaminações no meio de cultivo, assim como a sua proliferação no decorrer do tempo. Além disso, observou-se uma turvação do meio de cultivo.

Para o experimento em branco assim como para os demais, foi realizado a análise de peso seco, representada na Figura 18.

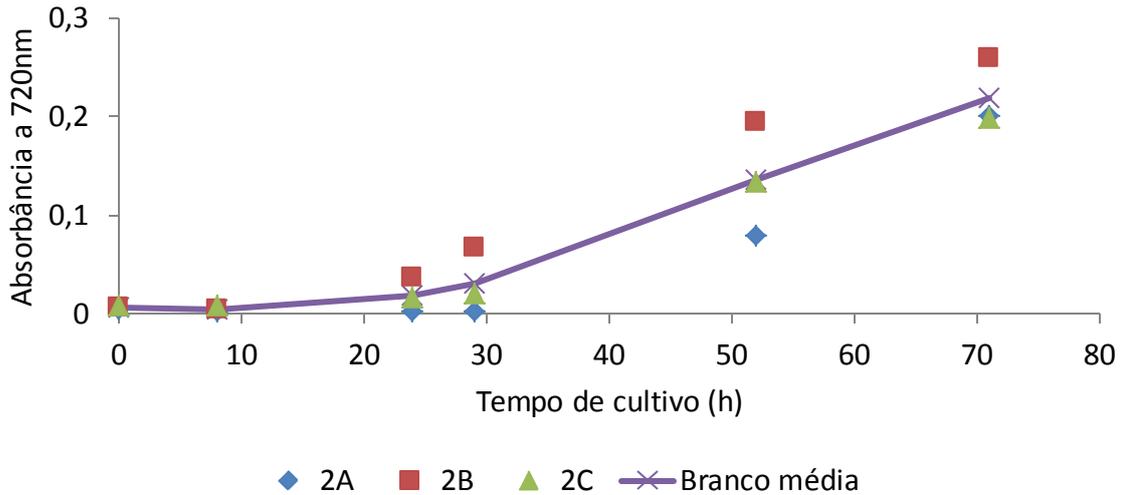


Figura 17 – Curva de absorvância em função do tempo de cultivo para o experimento em triplicada para meio de cultivo em branco

Nessa regressão, optou-se por utilizar todos os pontos. Observa-se um coeficiente linear positivo, o que para os demais experimentos não ocorreu. Ainda, nota-se um coeficiente angular superior aos encontrados para a maior parte dos outros experimentos, indicando uma proliferação acentuada das contaminações.

Esse capítulo não busca definir, quantificar e tão pouco identificar as contaminações, podendo essas se tratar de microorganismos (principalmente bactérias e fungos) presentes tanto no ar, como em quaisquer das soluções utilizadas ou ainda terem sido inserido no meio durante a coleta das amostras. Vale lembrar que foram tomadas medidas preventivas de contaminação tanto nas soluções, no meio salino, quanto no ar injetado no interior do cultivo, e mesmo assim existem evidências de que a contaminação é efetiva.

Com o uso de uma cepa de microalga marinha, era esperado que a contaminação fosse mínima. Uma vez que para se proliferar em um ambiente altamente salino é necessário uma certa adaptação, não inerente a todos os microorganismos.

A Figura 19 representa a curva de variação da concentração de contaminantes em função do tempo de cultivo.

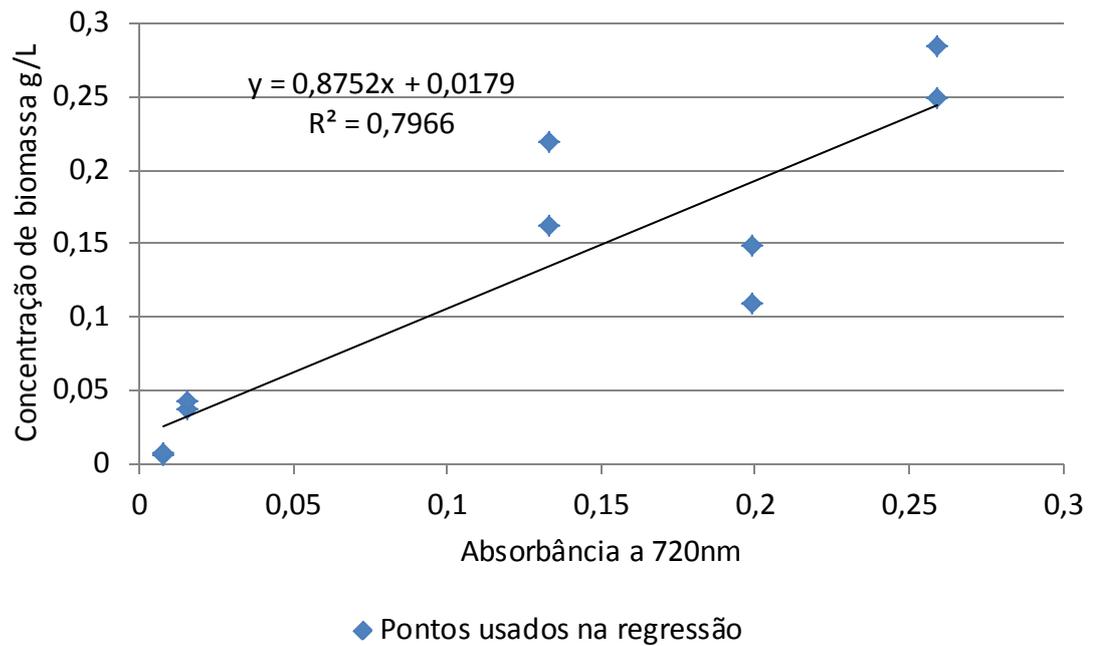


Figura 18 – Correlação linear da concentração de contaminação em função da absorvância, obtida através de análise de peso seco ao longo do experimento.

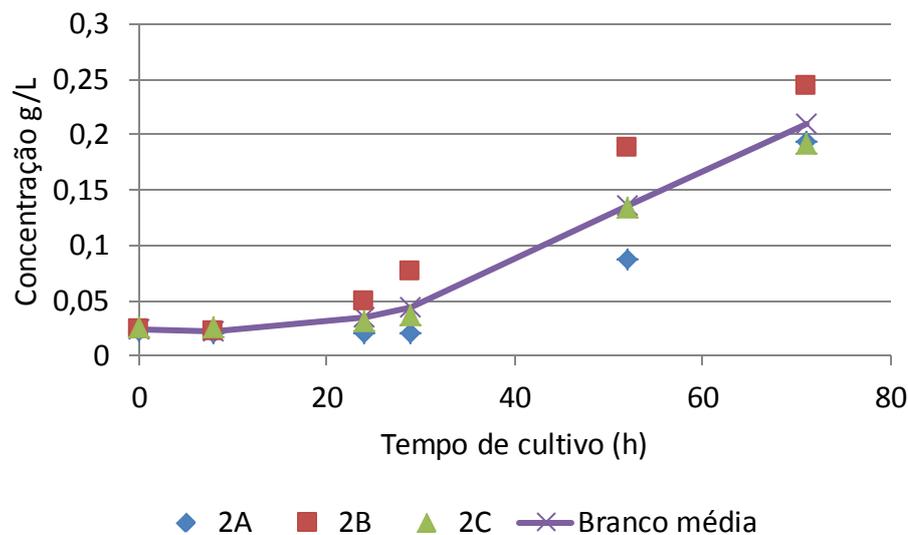


Figura 19 – Curva da concentração de contaminantes em função do tempo de cultivo para o experimento em triplicata em branco

Nesse experimento, em ausência de microalgas, as fontes de contaminação puderam usufruir livremente da fonte de carbono e dos nutrientes do meio de cultivo, estando, portanto em uma situação muito favorável sem a presença de competição nesse consumo. Por outro lado, os experimentos contendo microalgas, apresentam esse fator competitivo no consumo dos nutrientes do meio de cultivo. Fator esse que tem por tendência reduzir a proliferação dos cultivos invasores. Logo, é possível afirmar que a condição observada nesse experimento é uma condição de limite superior de proliferação de contaminantes nas condições desse estudo.

Nos cultivos microalgais em presença de luz, foi possível observar um aumento na intensidade da coloração verde, característica da fotossíntese, indicando um aumento da massa algal. Nesses experimentos, é possível que a competição com a microalga presente no início do experimento tenha retardado a proliferação dos contaminantes.

Nos cultivos na ausência de luz, observa-se que a concentração final de biomassa aproxima-se muito dos valores obtidos nos cultivos em branco, e embora ao final do experimento ainda houvesse a persistência de uma leve coloração esverdeada nos cultivos, não é possível avaliar se a descoloração foi devido ao crescimento das microalgas no regime heterotrófico, a morte das microalgas na ausência de luz ou a proliferação de outros microorganismos.

5 Conclusões e Trabalhos Futuros

Neste estudo foi possível avaliar o crescimento da microalga *Nannochloropsis oculata* em regime mixotrófico e heterotrófico, usando como fonte de carbono glicerina, glicose e sacarose em comparação com um cultivo em regime autotrófico.

O regime heterotrófico, independente da fonte de carbono utilizada, apresentou concentração de biomassa, ao final do experimento, menor do que o cultivo autotrófico. Provando, assim, não ser uma alternativa viável, sob as condições testadas, para adensar o cultivo da cepa utilizada, pois apesar de possibilitar o cultivo em reatores do tipo fermentadores tradicionais, necessita da adição de uma fonte alternativa de carbono, o que representa um custo adicional, não desprezível, ao cultivo.

Por outro lado, o regime mixotrófico, especialmente com o uso de glicose, mostrou resultados positivos para o adensamento da cultura e a redução do tempo de cultivo, permitindo uma concentração de 0,376 g/L de biomassa em 71 horas de cultivo. Obteve-se cerca de 80% da concentração em biomassa de um cultivo autotrófico de 11 dias.

Conforme observado nesse trabalho, em presença de fonte orgânica de carbono dissolvida no meio de cultivo há a real possibilidade de contaminação com culturas indesejadas, mascarando os resultados e podendo levar a conclusões errôneas caso não sejam consideradas. É fundamental, para trabalhos futuros em regime de cultivo nessas condições, o estudo do uso de agentes antibióticos a fim de evitar a proliferação de agentes contaminantes. Contudo esses antibióticos podem interferir igualmente no crescimento das microalgas. Uma avaliação detalhada para a escolha do agente antibiótico adequado a cada cultura de microalga parece atrativa do ponto de vista de desenvolvimento desses regimes de cultivo.

Uma vez provado que a *Nannochloropsis oculata* aceita fontes de carbono orgânico, seria interessante o uso de material orgânico de baixo custo para suprir essa necessidade nos cultivos, de modo a promover a exploração de fontes alternativas de carbono, tais como restos alimentares e florestais.

Outro ponto importante a ser ressaltado é que nesse estudo não foi avaliado o potencial de produção de lipídeos nas condições estudadas, podendo nem sempre coincidir a maior produção de microalga com altas concentrações em lipídeos na sua composição. Entretanto optou-se por, nesse estudo, encontrar uma condição de crescimento que justifique estudos mais apurados, como foi o caso do regime mixotrófico com uso de glicose a 30 mM de carbono.

6 Referências

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557-577, // 2010. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-72049083209&partnerID=40&md5=0f2b4fd2b00fce5714432c02bf5c0a8f>>.

BRENNTAG QUÍMICA, B. **Ficha de informações de segurança para produtos químicos**. FISPQ 1181. Glicerina Branca Bi-distilada.

BUMBAK, F. et al. Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: Achievements, potential and possible limitations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 1, p. 31-46, // 2011. ISSN 01757598 (ISSN). Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79959256030&partnerID=40&md5=51f6a0494ed563e67c5628028e533be1>>.

CHERUBINI, F.; STRØMMAN, A. H. Chapter 1 - Principles of Biorefining. In: ASHOK, P.; CHRISTIAN, L., *et al* (Ed.). **Biofuels**. Amsterdam: Academic Press, 2011. p.3-24. ISBN 978-0-12-385099-7.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, // 2007. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33947617349&partnerID=40&md5=464a58308afb5e8386669d8188df8da6>>.

CHIU, S.-Y. et al. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 833-838, 1// 2009. ISSN 0960-8524. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096085240800583X>>.

FANG, X. et al. Effects of organic carbon sources on cell growth and eicosapentaenoic acid content of *Nannochloropsis* sp. **Journal of Applied Phycology**, v. 16, n. 6, p. 499-503, // 2004. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-22844448561&partnerID=40&md5=ae41c204b08f41f001942e8bff4dae2a>>.

GLADUE, R. M.; MAXEY, J. E. Microalgal feeds for aquaculture. **Journal of Applied Phycology**, v. 6, n. 2, p. 131-141, // 1994. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0000735280&partnerID=40&md5=39c42ad4421866474390a4006381a41d>>.

GRIS, L. **Produção da microalga Nannochloropsis oculata em fotobiorreator airlift**. 2011. 148 p (Dissertação de Mestrado). Departamento de Engenharia Química, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

HUANG, X. et al. Effects of nitrogen supplementation of the culture medium on the growth, total lipid content and fatty acid profiles of three microalgae (*Tetraselmis subcordiformis*, *Nannochloropsis oculata* and *Pavlova viridis*). **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 1, p. 129-137, // 2013. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84872500587&partnerID=40&md5=366e09ed06bfef1b8a8518cd6a29f7d9>>.

KOLLER, M. et al. Characteristics and potential of micro algal cultivation strategies: A review. **Journal of Cleaner Production**, v. 37, p. 377-388, // 2012. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84865477481&partnerID=40&md5=d4a0a691da9a3ebd1f3711a907dffaf8>>.

LIANG, Y. Producing liquid transportation fuels from heterotrophic microalgae. **Applied Energy**, v. 104, n. 0, p. 860-868, 4// 2013. ISSN 0306-2619. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306261912007994>>.

LOURENÇO, S. D. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. Brasil: RiMa, 2006.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217-232, // 2010. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-70349505956&partnerID=40&md5=34818fe089d910705a48ee06adafb5c6>>.

PEREZ-GARCIA, O. et al. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, n. 1, p. 11-36, // 2011. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-78649649684&partnerID=40&md5=259640d93f16260d480ae2e86c27545c>>.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 635-648, // 2004. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-8644242931&partnerID=40&md5=dc71b651344f4f57b862395cba578088>>.

RAWAT, I. et al. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. **Applied Energy**, v. 103, p. 444-467, // 2013. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84871717568&partnerID=40&md5=d2d82d25cc887c70fb1ef97febca47b2>>.

RICHMOND, A. Biological Principles of Mass cultivation. In: (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and applied Phycology**. England: Blackwell Publishing, 2004.

ROLEDA, M. Y. et al. Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 439-449, // 2013. ISSN 09608524 (ISSN). Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84871461706&partnerID=40&md5=abaac485d41e9ee6c6e3817b349e6735>>.

SOARES, D. **Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo**. 2010. 107 p (Dissertação de Mestrado). Departamento de bioquímica e biologia molecular, UFPR, Curitiba, PR, Brasil.

WOOD, B. J. B. et al. Photoheterotrophy in the production of phytoplankton organisms. **Journal of Biotechnology**, v. 70, n. 1-3, p. 175-183, 4/30/ 1999. ISSN 0168-1656. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816569900070X>>.

YEN, H.-W. et al. Microalgae-based biorefinery – From biofuels to natural products. **Bioresource Technology**, v. 135, n. 0, p. 166-174, 5// 2013. ISSN 0960-8524. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096085241201601X>>.

YI-FENG, C.; WU, Q. Chapter 17 - Production of Biodiesel from Algal Biomass: Current Perspectives and Future. In: ASHOK, P.;CHRISTIAN, L., et al (Ed.). **Biofuels**. Amsterdam: Academic Press, 2011. p.399-413. ISBN 978-0-12-385099-7.

ZHU, Y.; DUNFORD, N. T. Growth and biomass characteristics of *picochlorum oklahomensis* and *nannochloropsis oculata*. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 90, n. 6, p. 841-849, // 2013. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84878686912&partnerID=40&md5=8ed157aa5e0bf7140a1fecbf2e3c8cb8>>.

Apêndice A –Condições de repicagem

Para manutenção de um banco de células da *Nannochloropsis oculata*, independente do trabalho desenvolvido, são adotados dois procedimentos no LACIP, laboratório onde foi desenvolvido esse estudo (Gris, 2011).

- A.1. Repicagem em tubos de ensaio de 20 mL (volume útil de 10mL), temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12:12 h luz/escuro e luminosidade média de 5170 ± 650 lux, dependendo da localização dos tubos na incubadora. Foram mantidos sempre três tubos, cada um representando uma geração dada por repicagens com intervalos entre 10 e 15 dias, isto é, o primeiro tubo gerou o segundo, que gerou o terceiro e assim por diante. Cada repicagem foi realizada na proporção 1:10 (1 mL da cultura antecessora em 9 mL de meio de cultura novo). Os tubos foram agitados suavemente de forma manual uma vez ao dia.

- A.2. Repicagem em erlenmeyers de 1000 mL (volume útil de 400mL), temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12:12 h de luz/ escuro, luminosidade média de 3810 ± 400 lux dependendo da localização dos recipientes na incubadora. Foram mantidos sempre três erlenmeyers, cada um representando uma geração dada por repicagens com intervalo de 10 a 15 dias. Ao contrario dos tubos de ensaio, um primeiro in'coulo deu origem aos três sistemas e cada um foi repicado independentemente para erlenmeyers de igual volume nos procedimentos seguintes. Cada repicagem foi realizada na proporção 1:10 (40mL de cultura antecessora para 360 mL de meio de cultivo novo). Os erlenmeyers foram agitados suavemente de forma manual uma vez ao dia.

Apêndice B – Preparo das soluções

B.1. Solução Salina

Em um erlenmeyer de 6L foram solubilizados 1998,8 g do sal marinho Red Sea em água destilada, com auxílio de um agitador magnético, marca Tecnal, modelo TE-0851. Após 30 minutos de solubilização, a solução foi filtrada com filtros de 0,7 µm de poro (GF-3) da marca Marcherey-Nagel, e armazenada em frascos Duran de 1 L para autoclavagem.

B.2. Solução de Nitrato

Em um balão volumétrico foram solubilizadas 7,5 g do sal de NaNO_3 em água destilada até completar 100 mL. O conteúdo foi armazenado em frascos de vidro âmbar de 100 mL para autoclavagem e depois armazenados no refrigerador até o uso.

B.3. Solução de Fosfato

Em um balão volumétrico foram solubilizadas 0,5 g do sal de $\text{NaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ em água destilada até completar 100 mL. O conteúdo foi armazenado em frascos de vidro âmbar de 100 mL para autoclavagem e depois armazenados no refrigerador até o uso.

B.4. Solução de Silicato

Em um balão volumétrico foram solubilizadas 3,0 g do sal de $\text{NaSiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ em água destilada até completar 100 mL. O conteúdo foi armazenado em frascos de vidro âmbar de 100 mL para autoclavagem e depois armazenados no refrigerador até o uso.

B.5. Solução de Metais

A solução de metais foi obtida pela misturas de soluções de cada metal preparadas separadamente. Para cada solução parcial, usou-se a mesma metodologia, descrita a seguir.

Em um balão volumétrico foram solubilizadas as quantidades descritas na Tabela B1 em água destilada até completar 1000mL. O conteúdo foi armazenado em frascos de 1000 mL.

Tabela B1 – Massas usadas na preparação das soluções

Reagente	Massa solubilizada (g)
Cianocobalamina (B_{12})	0,5
Biotina (B_7)	0,5

A solução final, foi realizada da seguinte maneira, em um balão volumétrico de 1000 mL foram solubilizados 0,1 g da vitamina tiamina (9B1) em água destilada, aproximadamente 750mL. Após a solubilização desse componente, foram adicionados 1 mL de cada uma das soluções de vitaminas previamente preparadas e o volume foi

completado com água destilada até 1 L. O conteúdo foi submetido ao procedimento de esterilização por filtração em sistema dotado de membrana de 0,2 µm de poro em capela de fluxo laminar. A solução foi armazenada em frasco âmbar, envolvido com folha de alumínio e congelado até utilização.

B.6. Solução de Tiosulfato de sódio

Em um balão volumétrico foram solubilizados 50,0g desse sal em água destilada até completar 1000mL. O conteúdo foi armazenado em frasco plástico de 1000mL. Esta solução não faz parte do meio de cultivo, somente é utilizada para neutralizar de hipoclorito de sódio remanescente dos procedimentos de assepsia dos fotobiorreatores.

B.7. Solução de Glicose

Em um balão volumétrico, previamente esterilizado com água sanitária, foram solubilizadas 30,02 g de glicose (pesados em um copo de béquer e deixadas no interior da capela de fluxo laminar sob radiação UV por 30 min) em água destilada, previamente esterilizada por autoclavagem, até completar 100 mL. Em seguida a solução foi agitada magneticamente para auxiliar na dissolução. A mesma foi armazenada em frasco de vidro âmbar no refrigerador.

Para os cultivos em fotobiorreator, foi usado 3 ml de solução para 1000 mL de cultivo, afim de obter a concentração de 30 mM em carbono.

B.8. Solução de Sacarose

Em um balão volumétrico, previamente esterilizado com água sanitária, foram solubilizadas 28,52 g de sacarose (pesados em um copo de béquer e deixadas no interior da capela de fluxo laminar sob radiação UV por 30 min) em água destilada, previamente esterilizada por autoclavagem, até completar 100 mL. Em seguida a solução foi agitada magneticamente para auxiliar na dissolução. A mesma foi armazenada em frasco de vidro âmbar no refrigerador.

Para os cultivos em fotobiorreator, foi usado 3 ml de solução para 1000 mL de cultivo, afim de obter a concentração de 30 mM em carbono.

B.9. Solução de Glicerina

Em um balão volumétrico, previamente esterilizado com água sanitária, foram misturados 30,70 g de glicerina (pesados diretamente no balão e deixado no interior da capela de fluxo laminar sob radiação UV por 30 min) com água destilada, previamente esterilizada por autoclavagem, até completar 100 mL. Em seguida a solução foi agitada magneticamente para auxiliar na dissolução. A mesma foi armazenada em frasco de vidro âmbar no refrigerador.

Para os cultivos em fotobiorreator, foi usado 3 ml de solução para 1000 mL de cultivo, afim de obter a concentração de 30 mM em carbono.

Apêndice C –A Análise das triplicatas

Comparado aos demais experimentos, o regime autotrófico, Figura C1, apresenta uma variância muito menor, com desvio padrão avaliado em 0,004, nesse estudo.

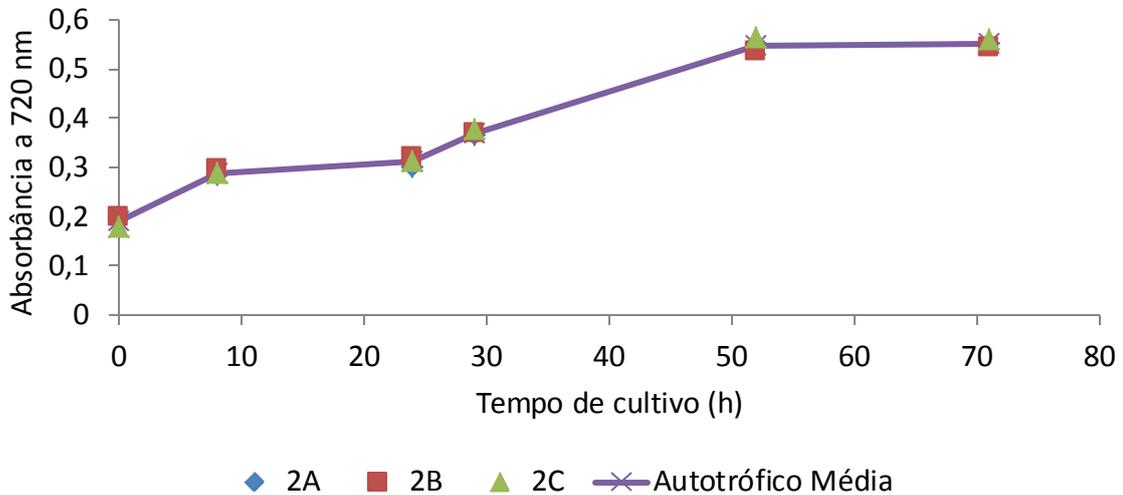


Figura C 1 – Curva de absorvância em função do tempo de cultivo para o experimento em triplicata para regime autotrófico

Entre o segundo e o quarto ponto, é possível observar ainda a influência do fotoperíodo: o segundo e o terceiro ponto estão separados por um período de escuridão, apresentando um crescimento diminuto quando comparado com o crescimento percebido entre o terceiro e quarto ponto, separados por um período de claridade. É perceptível o aumento de massa durante o período de exposição à luz.

Tanto o experimento para sacarose (Figura C2) quanto glicose (Figura C3) em regime heterotrófico, apresentaram um declínio do penúltimo para o último ponto. Por apresentarem um metabolismo distinto dos demais regimes, observa-se a fase de declínio muito antes dos demais, provavelmente devido à escassez de fonte de carbono. Infelizmente não foi possível medir as concentrações das fontes de carbono ao final de cada experimento, uma vez que a técnica mais simples seria via reação com DNS, para os açúcares, e medida em espectroscopia a 540 nm. Nesse comprimento de onda, temos a influência da presença de biomassa, que poderia mascarar os resultados da análise, sem contar que seria impossível realizar uma curva de calibração precisa, pois as concentrações em biomassa variam de amostra para amostra. Mesmo se usássemos o filtrado, é possível que uma quantidade razoável da fonte de carbono ficasse retida no filtro junto com a biomassa.

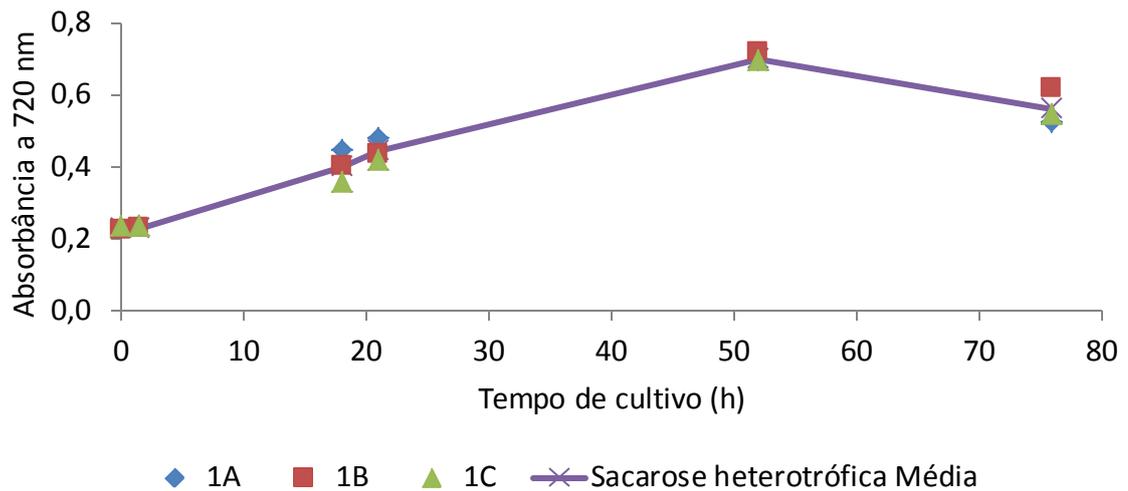


Figura C 2 - Curva de absorvância em função do tempo de cultivo para o experimento em triplicata para Sacarose regime heterotrófico

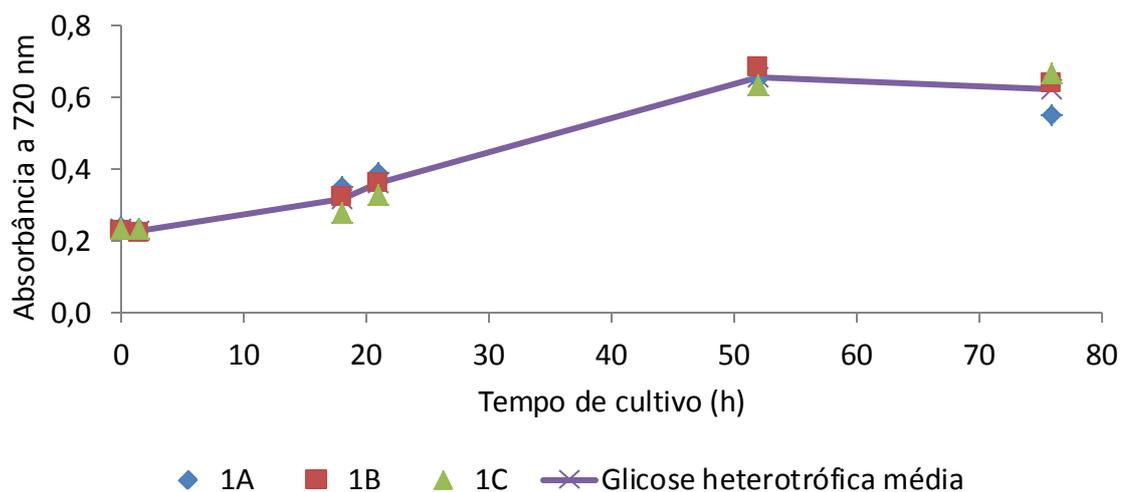


Figura C 3 - Curva de absorvância em função do tempo de cultivo para o experimento em triplicata para Glicose em regime heterotrófico

No experimento com glicerina em regime heterotrófico, Figura C4, observou-se um pequeno aumento na absorvância ao longo do tempo de cultivo, mesmo quando comparado com outras fontes no mesmo regime. Esses resultados estão divergentes dos publicados por Wood *et al.* (1999), em que se observou a preferência da *Nannochloropsis Sp.* por glicerina em detrimento da glicose e acetato. Ainda assim, existe a possibilidade de que uma outra cepa de *Nannochloropsis* que não seja a *oculata* apresente essa preferência, visto que o cultivo usado por Wood *et al* foi uma cepa genérica. Em específico a *Nannochloropsis Oculata* não parece apresentar tal preferência.

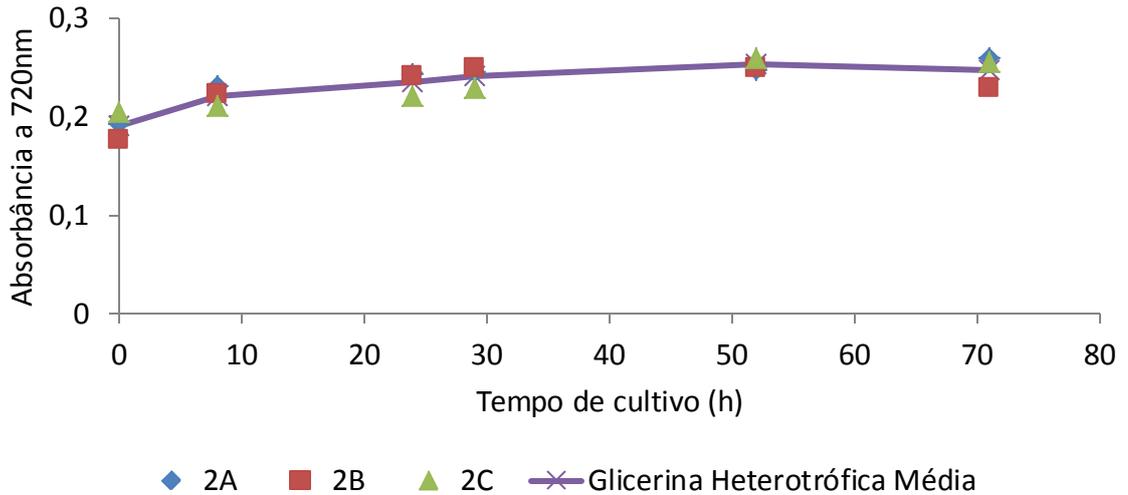


Figura C 4 - Curva de absorvância em função do tempo de cultivo para o experimento em triplicata para glicerina em regime heterotrófico

Na Figura C5, é possível verificar que as triplicatas do experimento para sacarose em regime mixotrófico, que apresentam uma boa concordância entre si. A partir da 52ª hora percebe-se a estabilidade do crescimento, provavelmente devido a entrada na fase estacionário do crescimento.

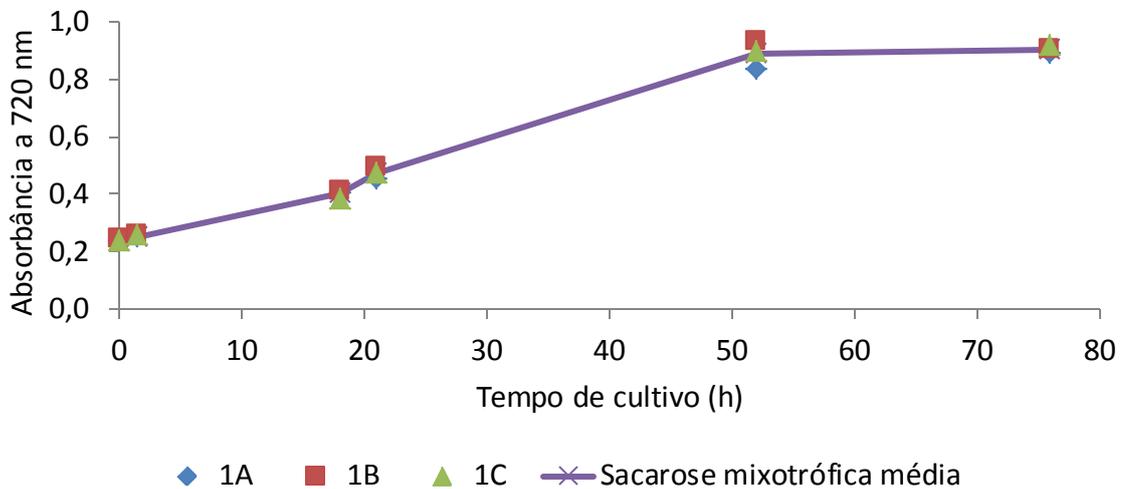


Figura C 5 - Curva de absorvância em função do tempo de cultivo para o experimento em triplicata para sacarose em regime mixotrófico

No experimento de glicerina em regime mixotrófico, Figura C6, tem-se uma grande variabilidade dos dados. Isso é devido especialmente à concentração inicial de biomassa no sistema, que por um erro operacional na triplicata 2B foi quase o dobro das demais. Descontando esse valor fixo de diferença de concentração inicial e recalculando a média, obtém-se curvas mais semelhantes, como pode ser visto na Figura C7.

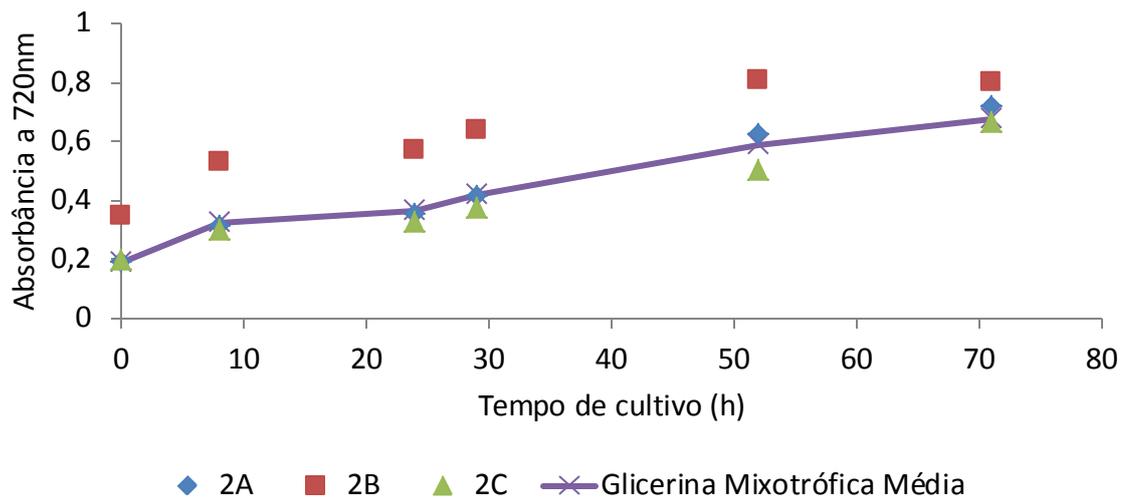


Figura C 6 - Curva de absorvância em função do tempo de cultivo para o experimento em triplicata para glicerina em regime mixotrófico

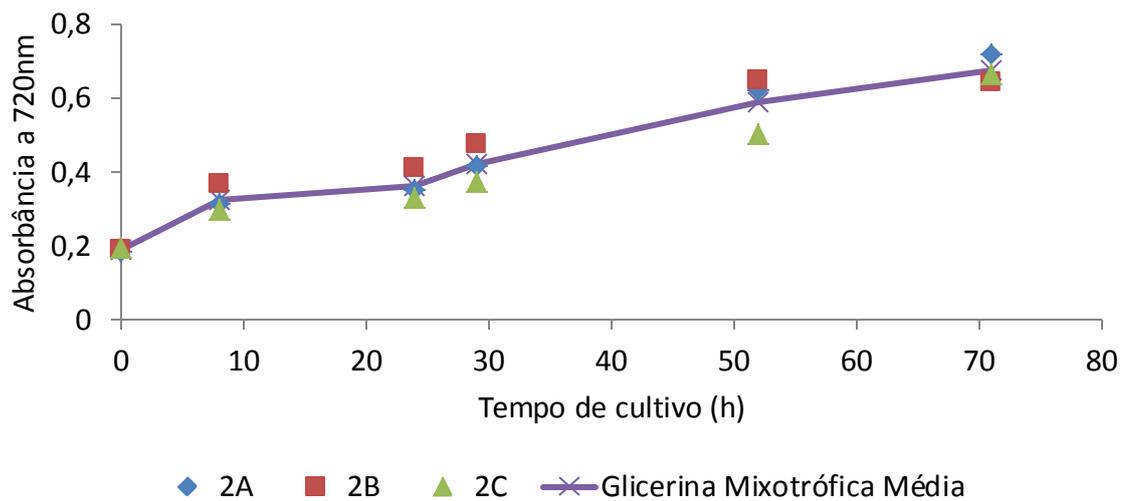


Figura C 7 - Curva de corrigida da absorvância em função do tempo de cultivo para o experimento em triplicata para glicerina regime mixotrófico