

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Estudo da Produção de Lipídeos e Carotenoides
por *Chlorella minutissima* em Fotobiorreator**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Cristiane Redaelli

Porto Alegre

2012

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

Estudo da Produção de Lipídeos e Carotenoides por *Chlorella minutissima* em Fotobiorreator

Cristiane Redaelli

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

Área de concentração: Pesquisa e Desenvolvimento
de Processos

Orientadores:

Prof. Dr. Nilson Romeu Marcilio

Prof^a. Dr^a. Rosane Rech

Porto Alegre

2012

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação *Estudo da Produção de Lipídeos e Carotenoides por Chlorella minutissima em Fotobiorreator*, elaborada por Cristiane Redaelli, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Marco Antonio Záchia Ayub – PPGEQ / UFRGS

Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz – PPGCTA / UFRGS

Dr^a. Lucélia do Valle Borges – PPGAq / UFRGS

Agradecimentos

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

À CAPES e à Rede Carvão, pelo apoio financeiro para operacionalizar este trabalho.

Aos professores do PPGEQ-UFRGS, em especial aos meus orientadores, Prof. Nilson Romeu Marcilio e Prof^a. Rosane Rech, pelos ensinamentos e paciência.

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

Ao Prof. Paulo Vergne de Abreu, da Oceanologia da FURG, e sua equipe, por me receberem em seu laboratório e dividirem alguns conhecimentos.

À equipe do laboratório, que ajudou muito na realização do presente trabalho e tornou os meus dias no ICTA mais divertidos: Luce Helena Kochem, Tobias Dierings, Allan Morcelli, André Jarenkow, Géssica Marchese Roman e Nicéia Chies Da-Fré.

Aos amigos e colegas do PPGEQ e do ICTA, pelo apoio e amizade, em especial às: Lara Soccol Gris, Fernanda Borges, Letícia Corbini, Juliana Espindola, Débora Faccin, Nicole Sehnem, Mariana Dullius, Priscilla Reque e Cleice Nora.

À família e aos amigos, que sempre me apoiaram e entenderam os momentos de ausência.

Enfim, ao meu pai, Emir José Redaelli, meu grande companheiro e incentivador.

Resumo

Neste trabalho é proposto o desenvolvimento de um processo para a biofixação do dióxido de carbono através do uso de microalgas. Para o cultivo desses microrganismos foram utilizados fotobiorreatores do tipo *airlift*. Nos cultivos foram avaliadas espécies de microalgas (*Chlorella* sp. e *Chlorella minutissima*), influência da intensidade luminosa (2.200 a 24.500 lx), concentração salina (28 a 40 g.L⁻¹) e temperatura (25 °C a 35 °C) sobre a concentração de biomassa, velocidade específica de crescimento, produtividade de biomassa, biofixação de CO₂, conteúdo lipídico e carotenoides totais. Também foi realizada a identificação dos carotenoides. A microalga escolhida para os testes em fotobiorreatores foi a *C. minutissima*. A intensidade luminosa que apresentou os melhores resultados foi a de 17.000 lx. A temperatura mostrou possuir influência significativa na concentração de biomassa, na velocidade específica de crescimento e na biofixação de carbono, mas a concentração salina influenciou apenas a velocidade específica de crescimento. A temperatura de 25 °C apresentou as maiores produtividade de biomassa (0,094 g.L⁻¹.d⁻¹) e concentração de biomassa (0,43 g.L⁻¹), independente da concentração salina, e as maiores velocidade específica de crescimento (0,81 d⁻¹) e biofixação de CO₂ (12 gCO₂.m⁻³.h⁻¹), na concentração salina de 37 g.L⁻¹. O conteúdo lipídico médio das microalgas foi de 13,2 % e os carotenoides totais apresentaram teor de 0,25 % do peso seco das microalgas em todas as condições de concentração salina e temperatura testadas. Foi possível identificar a produção dos carotenoides luteína, zeaxantina e β-caroteno.

Palavras-chave: microalga, *Chlorella minutissima*, fotobiorreator *airlift*, biofixação de CO₂, intensidade luminosa, concentração salina, temperatura, carotenoides, lipídeos.

Abstract

The present study proposes the development of a process for carbon dioxide biofixation through the use of microalgae. Flat-plate *airlift* photobioreactors were used. Microalgae species (*Chlorella* sp. and *Chlorella minutissima*) and the influence of light intensity (2,200 to 24,000 lx), salt concentration (28 to 40 g.L⁻¹) and temperature (25 to 35 °C) over biomass concentration, specific growth rate, biomass productivity, CO₂ biofixation rate, lipid content and total carotenoids content were evaluated. The identification of the carotenoids was performed. *C. minutissima* showed the best performance in shaker and was chosen for the tests in photobioreactor. The light intensity of 17,000 lx presented the best results. The temperature showed to have significant influence over biomass concentration, specific growth rate and CO₂ biofixation rate, but the salt concentration only affected the specific growth rate. The temperature of 25 °C allowed the highest biomass productivity (0.094 g.L⁻¹.d⁻¹) and biomass concentration (0.43 g.L⁻¹), independent of salt concentration, and the highest specific growth rate (0.81 d⁻¹) and CO₂ biofixation rate (12 gCO₂.m⁻³.h⁻¹) at the salt concentration of 37 g.L⁻¹. The average lipid content of the microalgae was 13.2 % and the total carotenoids content were about 0.25 % of the cell dry weight at all temperatures and salt concentrations tested. It was possible to identify the production of the carotenoids lutein, zeaxanthin and β-carotene.

Key-words: microalgae, *Chlorella minutissima*, *airlift* photobioreactor, CO₂ biofixation, light intensity, salt concentration, temperature, carotenoids, lipids.

Sumário

Introdução	1
Revisão Bibliográfica	3
2.1. <i>Problemática Ambiental</i>	3
2.2. <i>Microalgas</i>	8
2.2.1. <i>Biofixação de CO₂</i>	10
2.2.2. <i>Produção de Lipídeos</i>	13
2.2.3. <i>Produção de Pigmentos</i>	15
2.2.4. <i>Classificação e Características das Chlorellas</i>	17
2.3. <i>Fatores que Influenciam o Crescimento de Microalgas</i>	19
2.3.1. <i>Intensidade Luminosa</i>	19
2.3.2. <i>Temperatura</i>	22
2.3.3. <i>Concentração Salina</i>	22
2.3.4. <i>pH</i>	25
2.4. <i>Cultivo de Microalgas Fotoautotróficas</i>	26
2.4.1. <i>Sistemas Abertos</i>	26
2.4.2. <i>Sistemas Fechados</i>	28
2.4.3. <i>Comparativo entre os Sistemas Aberto e Fechado</i>	31
Materiais e Métodos	33
3.1. <i>Microalga e Meio de Cultivo</i>	33
3.2. <i>Banco de Algas</i>	34
3.3. <i>Testes Preliminares</i>	34
3.4. <i>Pré-inóculo</i>	35
3.5. <i>Cultivos em Fotobiorreator</i>	35
3.5.1. <i>Estudo da Influência da Luz</i>	37
3.5.2. <i>Estudo da Influência da Concentração Salina e da Temperatura</i>	37
3.6. <i>Acompanhamento do Crescimento das Algas</i>	39
3.7. <i>Análises</i>	40
3.7.1. <i>Determinação de Carotenoides Totais</i>	41
3.7.2. <i>Identificação dos Carotenoides por CLAE</i>	41
3.7.3. <i>Determinação de Lipídeos Totais</i>	43
3.7.4. <i>Cálculo da Taxa de Fixação de Gás Carbônico</i>	44
3.7.5. <i>Cálculo da Velocidade Específica de Crescimento</i>	44
3.7.5. <i>Cálculo da Produtividade</i>	45
3.8. <i>Análise Estatística</i>	45
3.9. <i>Reagentes</i>	45
Resultados e Discussão	47
4.1. <i>Escolha da microalga</i>	47

4.2. Cultivos em Fotobiorreator	48
4.2.1. Estudo da Influência da Luz	48
4.2.2. Estudo da Influência da Concentração Salina e da Temperatura	53
4.3. Identificação dos Carotenoides	67
Conclusões	71
5.1. Sugestões para Trabalhos Futuros.....	72
Apêndice A	73
<i>Conversão de Unidades para Lâmpada Fluorescente Branca Fria</i>	<i>73</i>
Apêndice B	75
<i>Correlação entre Medidas de Absorbância em $\lambda = 570 \text{ nm}$ e $\lambda = 750 \text{ nm}$.....</i>	<i>75</i>
Referências Bibliográficas.....	77

Lista de Figuras

Figura 1. Emissões globais antropogênicas de gases do efeito estufa no ano de 2004. Figura adaptada do Relatório do IPCC do ano de 2007 (OLIVIER <i>et al.</i> , 2005).	4
Figura 2. Reação global de transesterificação de triglicerídeos (MATA <i>et al.</i> , 2009).	14
Figura 3. Curva de Resposta à Luz (RICHMOND, 2004).....	20
Figura 4. Sistema aberto tipo <i>raceway</i> para cultivo de microalgas (BRENNAN & OWENDE, 2010).....	27
Figura 5. Geometrias mais comuns de fotobiorreatores fechados. A) Reator de Placa Plana. B) Reator Anular. C) Reator Tubular (POSTEN, 2009).....	29
Figura 6. Imagem 3D do corte seccional do fotobiorreator.....	36
Figura 7. Desenho esquemático da distribuição de pontos de planejamento hexagonal utilizado.	38
Figura 8. Relação de biomassa (g.L^{-1}) e densidade ótica a 570 nm.....	40
Figura 9. Densidade ótica a 570 nm média de dois cultivos em incubadora com agitação orbital de <i>Chlorella</i> sp. e <i>C. minutissima</i> em função do tempo.....	47
Figura 10. Curvas de crescimento médias de dois cultivos de <i>C. minutissima</i> em fotobiorreator sob luminosidades de 2.200 lx, 10.000 lx, 17.000 lx e 24.500 lx. .	48
Figura 11. Curvas de crescimento médias de dois cultivos de <i>C. minutissima</i> em fotobiorreator sob luminosidades de 2.200 lx, 10.000 lx, 17.000 lx e 24.500 lx em escala logarítmica.	49
Figura 12. Taxa de fixação de CO_2 em função do tempo em cultivos de <i>C. minutissima</i> em fotobiorreatores sob luminosidades de 2.200 lx, 10.000 lx, 17.000 lx e 24.500 lx.	51
Figura 13. Resultado da análise de lipídeos totais contidos nas microalgas <i>C. minutissima</i> cultivadas em fotobiorreatores com diferentes luminosidades.	52
Figura 14. Curvas de crescimento dos cultivos de <i>C. minutissima</i> em fotobiorreator sob diferentes condições de concentração salina e temperatura.....	54
Figura 15. Curvas de crescimento dos cultivos de <i>C. minutissima</i> em fotobiorreator sob diferentes condições de concentração salina e temperatura em escala logarítmica.	54
Figura 16. Superfície de resposta da biomassa de <i>C. minutissima</i> em função da temperatura e da concentração salina do meio de cultivo em fotobiorreator....	57
Figura 17. Superfície de resposta da velocidade específica de crescimento de <i>C. minutissima</i> em função da temperatura e da concentração salina do meio de cultivo em fotobiorreator.....	58
Figura 18. Superfície de resposta da produtividade de biomassa de <i>C. minutissima</i> em função da temperatura e da concentração salina do meio de cultivo em fotobiorreator.....	59
Figura 19. Taxa de fixação de CO_2 em função do tempo em cultivos de <i>C. minutissima</i> em fotobiorreatores sob diferentes condições de temperatura e concentração salina do meio de cultivo.....	62
Figura 20. Superfície de resposta da taxa de fixação de dióxido de carbono em função da temperatura e da concentração salina do meio de cultivo em cultivos de <i>C. minutissima</i> em fotobiorreatores.	64
Figura 21. Resultado da análise de carotenoides presentes nas microalgas <i>C. minutissima</i> depois de cem horas de cultivos em fotobiorreatores em diferentes	

condições de temperatura e concentração salina do meio de cultivo. Desvio padrão médio dos dados: 137 mg. L ⁻¹	65
Figura 22. Cromatograma dos carotenoides do extrato saponificado de microalga liofilizada <i>C. minutissima</i> no final dos cultivos. Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C30 polimérica marca YMC, FM: gradiente de água/metanol/tert-metil-butil-éter (MTBE) proporção inicial 5:90:5, atingindo 0:95:5 em 12 minutos, 0:89:11 em 25 minutos, 0:75:25 em 40 minutos até concentração final de 0:50:50 em 60 minutos, vazão de 1mL.min ⁻¹ , a 33°C.	68
Figura B. 1. Medidas experimentais de absorbância de cultivos da microalga <i>C. minutissima</i> em fotobiorreator nos comprimentos de onda de 570 nm e 750 nm.....	75

Lista de Tabelas

Tabela 1. Microalgas estudadas para mitigação de CO ₂ , sendo produtividade da biomassa (Q_x) e produtividade do CO ₂ (Q_{CO_2}) (KHAN <i>et al.</i> , 2009; BRENNAN & OWENDE, 2010).....	12
Tabela 2. Conteúdo lipídico de algumas microalgas (CHISTI, 2007; GOUVEIA & OLIVEIRA, 2009).....	13
Tabela 3. Carotenoides presentes da microalga <i>Chlorella pyrenoidosa</i> apresentados em proporção e quantidades (INBARAJ <i>et al.</i> , 2006).	19
Tabela 4. Requisitos nutricionais para o cultivo de microalgas (ZENG <i>et al.</i> , 2011).....	23
Tabela 5. Comparação de diferentes sistemas fechados para cultivo de microalgas. Luminosidade (lx), caminho ótico ou diâmetro (D), volume (V), concentração de biomassa (X), produtividade de biomassa (Q_x) e coeficiente de transferência de massa (k_La) (XU <i>et al.</i> , 2009).....	31
Tabela 6. Comparação entre sistemas abertos e fechados para cultivo de microalgas (XU <i>et al.</i> , 2009).	32
Tabela 7. Planejamento 2 ² hexagonal com pontos centrais.....	38
Tabela 8. Gradiente utilizado como fase móvel na coluna de fase reversa C30 (ZANATTA, 2007).	43
Tabela 9. Resultados de biomassa, velocidade específica máxima de crescimento e produtividade para os cultivos de <i>C. minutissima</i> em fotobiorreatores sob iluminações de 2.200, 10.000, 17.000 e 24.500 lx.	49
Tabela 10. Resultados de biomassa, velocidade específica máxima de crescimento e produtividade para cultivos de <i>C. minutissima</i> em fotobiorreator em diferentes condições de temperatura e concentração salina.	55
Tabela 11. Tabela de valores dos coeficientes de regressão das variáveis codificadas e dos parâmetros da regressão para biomassa, velocidade de crescimento e produtividade de <i>C. minutissima</i> em fotobiorreator.	56
Tabela 12. Tabela de valores dos coeficientes de regressão das variáveis codificadas e dos parâmetros da regressão para taxa de fixação de CO ₂ pela microalga <i>C. minutissima</i> em fotobiorreator.	63
Tabela 13. Resultados da análise de lipídeos totais e carotenoides totais realizados com as microalgas coletadas no final dos cultivos e liofilizadas.	66
Tabela 14. Porcentagens médias dos carotenoides presentes na microalga <i>C. minutissima</i> identificados por cromatografia líquida de alta performance.	68
Tabela A. 1. Tabela de Conversão de Unidades para Lâmpada Fluorescente Branca Fria (Adaptado de EGC, 2011).....	73

Lista de Abreviações e Símbolos

Abreviações

AA	Ácido araquidônico
ALA	Ácido α -linoleico
ASTM	Sociedade Americana para Testes de Materiais
BNDES	Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social
CLC	<i>Chemical-Looping Combustion</i>
COP	Conferência das Partes
Cv	<i>Chlorella vulgaris</i>
DHA	Ácido docosaexaenóico
DME	Di-metil éter
Dt	<i>Dunaliella tertiolecta</i>
EGC	Environmental Growth Chambers
EPA	Ácido eicosapentaenóico
CLAE	Cromatografia líquida de alta performance
IPCC	Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas
MEA	Monoetanolamina
MTBE	Éter tert-metil-butílico
Nanno	<i>Nannochloropsis</i> sp.
Neo	<i>Neochloris oleabundans</i>
Psu	Unidades práticas de salinidade
Sc	<i>Scenedesmus obliquus</i>
Sp	<i>Spirulina máxima</i>

V_B	Vitamina B
V_C	Vitamina C
V_E	Vitamina E

Variáveis

C	Concentração de carotenoides ($\mu\text{g. L}^{-1}$)
D	Caminho ótico ou diâmetro (cm)
I_c	Ponto de compensação da intensidade luminosa
I_h	Ponto de fotoinibição da intensidade da luz
I_s	Ponto de saturação da intensidade da luz
$k_L a$	Coefficiente de global de transferência de massa ($\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$)
$OD_{570 \text{ nm}}$	Densidade ótica lida no comprimento de onda de 570 nm
$OD_{750 \text{ nm}}$	Densidade ótica lida no comprimento de onda de 750 nm
$OD_{510 \text{ nm}}$	Densidade ótica lida no comprimento de onda de 510 nm
$OD_{480 \text{ nm}}$	Densidade ótica lida no comprimento de onda de 480 nm
P	Taxa de fotossíntese
P_{max}	Taxa de fotossíntese máxima
Q_X	Produtividade de biomassa ($\text{g. L}^{-1}. \text{d}^{-1}$)
Q_{CO_2}	Produtividade de CO_2 ($\text{g. L}^{-1}. \text{d}^{-1}$)
S	Concentração salina (g. L^{-1})
T	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
V	volume (L)
X	Concentração de biomassa (g. L^{-1})
x_1	Variável codificada concentração salina
x_2	Variável codificada temperatura

x_{12}	Termo de interação entre as variáveis codificadas
Y	Variável dependente
α	Inclinação da Curva de Resposta à Luz
θ_0	Coeficiente de regressão referente à média
θ_1	Coeficiente de regressão referente à variável codificada x_1
θ_2	Coeficiente de regressão referente à variável codificada x_2
θ_{11}	Coeficiente de regressão referente ao termo quadrático da variável codificada x_1
θ_{22}	Coeficiente de regressão referente ao termo quadrático da variável codificada x_2
θ_{12}	Coeficiente de regressão referente à interação das variáveis codificadas
$\mu_{máx}$	Velocidade específica de crescimento máxima

Capítulo 1

Introdução

Depois da Revolução Industrial, a concentração de CO₂ na atmosfera praticamente quadruplicou. O CO₂ é um dos gases do efeito estufa e o aumento da sua concentração contribui para o aquecimento global, que é uma preocupação mundial. Diversas alternativas vêm sendo estudadas para a mitigação dos gases do efeito estufa.

As microalgas podem utilizar o CO₂ como fonte de carbono e possuem em sua constituição pigmentos, lipídeos, vitaminas e minerais que podem ser utilizados comercialmente. Já existem no mercado insumos produzidos a partir de cultivos de microalgas há mais de quarenta anos. Os cultivos de microalgas vinham sendo realizados majoritariamente em sistemas abertos. Porém, nos últimos anos, o uso de sistemas fechados tem sido foco de pesquisa e desenvolvimento a fim de aumentar a produção da biomassa algal e possibilitar a produção de espécies menos resistentes às condições de cultivo externas.

Este trabalho se propôs a, utilizando um fotobiorreator fechado do tipo *airlift*, estudar a influência das variáveis iluminação, temperatura e concentração salina no crescimento das microalgas, na taxa de biofixação de CO₂ e na produção de lipídeos e de pigmentos do tipo carotenoides. Também foi realizada a identificação dos carotenoides presentes nas microalgas. O objetivo deste trabalho foi encontrar a condição de operação mais favorável à produção de lipídeos e carotenoides, afim de atingir uma elevada concentração de biomassa, e conseqüente elevada taxa de bioabsorção de CO₂.

Este trabalho está dividido em 5 capítulos. O Capítulo 2 trata da revisão bibliográfica. Nele estão apresentados a problemática ambiental, algumas aplicações e características das microalgas, os fatores que influenciam o seu crescimento e tipos de sistemas de cultivos de microalgas fotoautotróficas.

O capítulo 3 é denominado Materiais e Métodos. Nele estão descritas as condições de manutenção das microalgas, as condições de cultivo e acompanhamento dos mesmos. Também estão descritos o fotobiorreator *airlift* utilizado nos cultivos, o teste de luminosidade e o de temperatura e concentração salina e as análises realizadas com a biomassa algal obtida.

No capítulo 4 são apresentados e discutidos os resultados dos testes e análises. No capítulo 5 encontram-se as conclusões obtidas a partir do estudo realizado e sugestões para trabalhos futuros.

O Apêndice A trata sobre a conversão das unidades de luminosidade e o Apêndice B apresenta uma correlação entre as absorbâncias lidas nos comprimentos de onda de 570 nm e 750 nm.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2.1. Problemática Ambiental

Após a Revolução Industrial, iniciada em meados do século XVIII, e principalmente no último século, as emissões antropogênicas de gases de efeito estufa aumentaram significativamente, principalmente devido à queima de combustíveis fósseis e mudanças no uso da terra (RIDGWELL & VALDES, 2009).

Os gases do efeito estufa estão presentes na atmosfera e retêm o calor das radiações solares (LOAICIGA *et al.*, 1996), estando os seguintes listados no Protocolo de Quioto: dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄), óxido nitroso (N₂O), hidrofluorcarbonos (HFCs), perfluorcarbonos (PFCs) e hexafluoreto de enxofre (SF₆).

O CO₂ é considerado o principal poluente entre os gases do efeito estufa, não pela toxicidade, e sim devido ao fato de o montante da sua emissão superar as emissões de todos os outros gases juntos. Essa constatação pode ser visualizada na Figura 1 (IPCC, 2007).

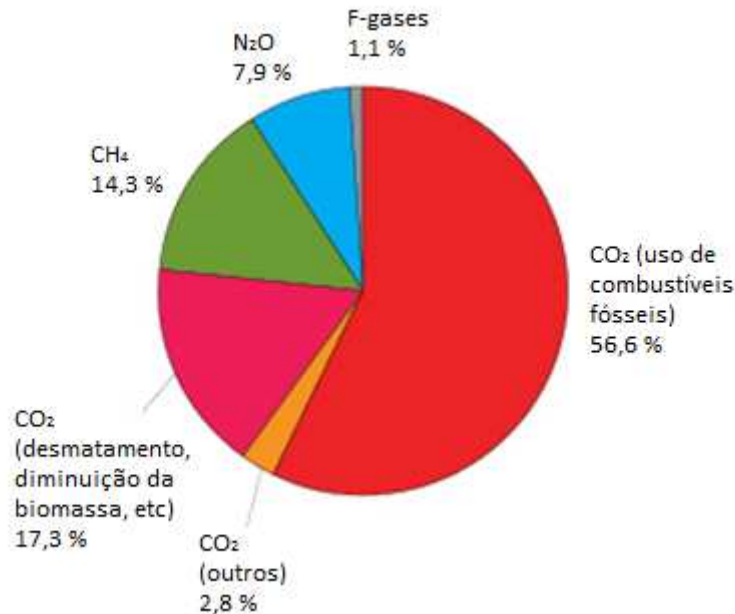


Figura 1. Emissões globais antropogênicas de gases do efeito estufa no ano de 2004. Figura adaptada do Relatório do IPCC do ano de 2007 (OLIVIER *et al.*, 2005).

No período pré-industrialização, a concentração de CO₂ na atmosfera era em torno de 280 ppm (partes por milhão) enquanto que em 2005 já atingia 379 ppm, de acordo com o relatório do IPCC (Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas) de 2007. No mesmo relatório, diversos cenários foram projetados para este século que estimam que uma concentração de aproximadamente 500 ppm será atingida no ano de 2050, o que está de acordo com a projeção de HANSEN *et al.* (2008), que consideram o fim das emissões provenientes do carvão em 2030, para atingir um nível de equilíbrio de 430 ppm de CO₂ na atmosfera em 2050 (HOFMANN *et al.*, 2009).

A principal consequência do aumento da concentração desses gases do efeito estufa é o aumento da temperatura média da superfície da Terra, conhecido como aquecimento global. O IPCC estima que até o final do século a temperatura na superfície da Terra vai aumentar entre 1,5 e 4 °C. O cenário que projeta aumento de 4 °C considera um mundo bastante heterogêneo, com aumento populacional e crescimento econômico e tecnológico mais lentos que os demais cenários, enquanto o cenário que projeta aumento de apenas 1,5 °C considera um pico populacional em 2050, seguido de um declínio, com mudanças rápidas na economia com introdução de tecnologias limpas em todo o mundo (IPCC, 2007).

O aquecimento global, por sua vez, também ocasiona mudanças no ecossistema e no padrão de vida das pessoas. Alguns exemplos dessa alteração estão listados a seguir (DUTTA & RADNER, 2009; FLORIDES & CHRISTODOULIDES, 2009; RIDGWELL & VALDES, 2009):

- derretimento das calotas polares e geleiras;
- derretimento das camadas congeladas de solo (*permafrost*), com consequente liberação de gases de efeito estufa na atmosfera, principalmente metano;
- aumento do nível do mar, que pode ocasionar o desaparecimento de ilhas e cidades costeiras;
- elevação da temperatura dos oceanos, causando a diminuição da solubilidade do dióxido de carbono e de outros gases de efeito estufa;
- aumento na frequência de eventos climáticos extremos, como ondas de calor, ciclones, secas e inundações de alta intensidade;
- disseminação de doenças;
- aumento do risco de extinção de espécies e de perda da biodiversidade;
- declínio da produção agrícola.

Os esforços para a mitigação das emissões dos gases do efeito estufa reúnem pesquisadores e governantes de diversos países ao redor do mundo, sendo que muitas organizações e tratados foram criados com esta finalidade, como por exemplo, o IPCC e a Convenção-Quadro das Nações Unidas.

Desde o ano de 1994, os países signatários da Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre Mudanças Climáticas realizam reuniões anuais entre as Partes, chamadas de Conferência das Partes (COP), a fim de debater e estabelecer metas de redução das emissões dos gases do efeito estufa. Atualmente, possui 192 países signatários. Um dos princípios, seguidos desde a COP 1, é o de “Responsabilidades comuns, porém diferenciadas”, que defende que os países desenvolvidos possuam mais responsabilidade para com a redução das emissões do que os países em desenvolvimento, pois eles iniciaram as emissões anteriormente. Inclusive os países em desenvolvimento contam com o apoio de recursos do Fundo Global para o Meio Ambiente para o desenvolvimento de programas de redução de emissões. Na COP 3,

em 1997, metas de redução de gases do efeito estufa foram adotadas para os países desenvolvidos, os chamados Países do Anexo I, que culminaram no Protocolo de Quioto. Porém, a ratificação do Protocolo aconteceu apenas no ano de 2005, sendo que dentre os principais emissores de gases de efeito estufa, somente os EUA não ratificaram o Protocolo nesta data. Ao longo dos anos, as mudanças no uso da terra foram discutidas e metas para o uso de fontes renováveis na matriz energética dos países foram estabelecidas. Outro assunto que tem estado em pauta é a geração de metas para o segundo período do Protocolo de Quioto, após 2012 (PORTAL BRASIL, 2011).

O Brasil assumiu compromisso de reduzir as emissões de gases do efeito estufa na COP 14, juntamente com outros países em desenvolvimento, como China, Índia, México e África do Sul. De acordo com o site oficial do governo brasileiro: “O País avança em suas políticas internas e de financiamento de ações para a mitigação e adaptação às mudanças climáticas. Hoje o Brasil possui dois fundos para financiar a redução de CO₂: o Fundo Amazônia e o Fundo Nacional sobre Mudança no Clima (Fundo Clima)” (PORTAL BRASIL, 2011).

O Fundo Amazônia é gerido pelo BNDES (Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social) e utiliza como recursos doações. Ele promove projetos de prevenção, monitoramento e combate ao desmatamento da floresta amazônica, sendo que 20 % dos seus recursos podem ser utilizados para projetos em outros biomas brasileiros e em outros países tropicais. Ele defende o uso sustentável das florestas (FUNDO AMAZÔNIA, 2011).

O Fundo Clima, gerido pelo Ministério do Meio Ambiente, utiliza como fonte de recursos doações e uma parte dos lucros provenientes da produção de petróleo para financiar projetos e estudos que contemplem a mitigação da mudança do clima e ações de adaptação à mudança do clima e seus efeitos. É o primeiro do mundo nesses moldes (MMA, 2011).

Para reduzir o total das emissões de CO₂ na atmosfera, existem as seguintes opções: aumentar a eficiência do uso da energia, substituir o uso de combustíveis fósseis para combustíveis de origem não-fóssil, como hidrogênio e energias renováveis, e promover a captura, sequestro e fixação do CO₂ (YANG *et al.*, 2008).

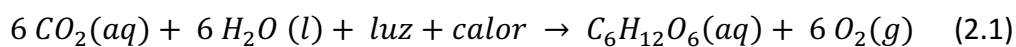
Diversas alternativas têm sido estudadas a fim de promover captura, sequestro e biofixação do gás carbônico. Para a captura do CO₂ emitido por fontes estacionárias como, por exemplo, termoelétricas a carvão mineral, existem alternativas:

- pós-combustão, onde o CO₂ é separado dos compostos SO₂ (dióxido de enxofre) e NO_x (óxidos de nitrogênio);
- pré-combustão, onde o combustível primeiramente é convertido numa mistura de CO₂ e H₂, sendo que apenas o H₂ vai para a etapa de conversão de energia;
- oxi-combustão, onde o nitrogênio é removido do ar, e substituído pelo CO₂ proveniente da queima do combustível, restando apenas uma mistura oxigênio e CO₂ para a conversão do combustível em energia, gerando uma corrente de gás de exaustão livre de compostos de nitrogênio, sendo apenas necessário remover particulados e componentes sulfúricos para obter um gás carbônico com elevado grau de pureza;
- combustão não-misturada, mais conhecida como CLC (*Chemical-Looping Combustion*), que é uma nova técnica que utiliza dois reatores, um para o ar de combustão e um para o combustível, evitando contato entre eles, apenas através de pequenas partículas de metal que circulam entre os dois reatores (YANG *et al.*, 2008).

Existem muitas opções de captura de CO₂, incluindo absorção, adsorção, membranas e biotecnologia. O processo de absorção é o mais estabelecido até o momento, podendo ser utilizada absorção química, com solventes como, por exemplo, a monoetanolamina (MEA), que é utilizada há sessenta anos na indústria de gás natural e atinge taxas de recuperação de CO₂ equivalentes a 98 % (YANG *et al.*, 2008).

Após a captura do CO₂, são necessárias as etapas de compressão e armazenamento. Uma alternativa é o armazenamento no oceano, porém a injeção de CO₂ na água do mar causa diminuição no pH das águas, que por sua vez, prejudica os ecossistemas. Depois de um curto tempo, o CO₂ retorna à atmosfera. Outra alternativa é o armazenamento subterrâneo, onde o CO₂ é injetado em campos vazios de petróleo e gás, que posteriormente são fechados com cimento especial. Porém o CO₂ é reativo à água e ataca metais e cimento, portanto existe a possibilidade de ocorrer vazamento, mesmo que a probabilidade seja pequena (BACIOCCHI *et al.*, 2006).

Formas naturais e artificiais para fixar o CO₂ têm sido estudadas, como por exemplo: florestamento; fertilização de oceanos, que consiste em aumentar a concentração de nutrientes limitantes para estimular o crescimento de fitoplâncton; carbonação mineral, que faz uso de pedras, como silicatos; “formação de hidrato”, que consiste em fazer uma corrente de gás contendo CO₂ passar através de água sob elevada pressão para formação de hidratos; e processos fotossintéticos, utilizando microrganismos, cianobactérias ou microalgas, em fotobiorreatores para consumir CO₂ realizando a reação de fotossíntese, descrita na Equação 2.1 (YANG *et al.*, 2008).



O CO₂ também pode ser utilizado na fabricação de compostos químicos. Atualmente, ele tem sido usado na produção de ácido salicílico, policarbonatos e na síntese da uréia, porém esses processos apenas fazem uso de uma pequena porcentagem do carbono disponível para ser convertido. Portanto, para que esta seja uma alternativa de real contribuição na diminuição do CO₂, se faz necessário o desenvolvimento de novos compostos químicos que sejam utilizados em larga escala, como os combustíveis. Já existem estudos para utilização do CO₂ na produção de metanol, etanol, DME (di-metil éter), ácido fórmico, dentre outros (CENTI & PERATHONER, 2009).

2.2. Microalgas

As microalgas são microrganismos fotossintéticos, de estrutura simples e dimensões microscópicas que possuem crescimento rápido e são capazes de sobreviver em condições extremas. Existem microalgas procariontes e eucariontes (KHAN *et al.*, 2009; MATA *et al.*, 2009). As microalgas podem habitar os ecossistemas mais diversos, mas a maioria é encontrada nos ambientes aquáticos (TOMASELLI, 2004).

O mais importante metabolismo para as microalgas é o autotrófico, no qual a energia é obtida através da absorção de energia luminosa e consumo de CO₂, reduzindo-o através da oxidação do substrato, geralmente água, para liberação de O₂. A segunda maior forma de nutrição é a heterotrófica, na qual a microalga utiliza componentes orgânicos como fonte de energia. Existem outros tipos e subtipos de metabolismo, como por exemplo, o fotoautotrófico, onde o microrganismo requer íons inorgânicos minerais e o fotoautotrófico obrigatório, no qual o microrganismo não consegue crescer no escuro. Os organismos fotoheterotróficos utilizam luz como fonte de energia e compostos orgânicos como nutrientes. Auxotrofia é quando a microalga requer pequenas quantidades de componentes orgânicos essenciais, como vitaminas e aminoácidos. Mixotrofia é quando componentes orgânicos e CO₂ são ambos necessários para o crescimento (GROBBELAAR, 2004). As microalgas inclusive são capazes de mudar de metabolismo como resposta a mudanças nas condições ambientais (MATA *et al.*, 2009).

Além de possuírem a capacidade de fixar o gás carbônico do ar, utilizando-o como fonte de carbono, as microalgas possuem uma composição rica em minerais, vitaminas, lipídios, pigmentos e proteínas, apresentando, assim, grande aplicabilidade industrial e comercial (KHAN *et al.*, 2009).

Microalgas já vêm sendo cultivadas com fins comerciais há mais de 40 anos, como é o caso das seguintes espécies: *Chlorella* como suplemento alimentar, *Spirulina* para aumentar o valor nutricional de alimentos, *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis* para produção de carotenoides, e uma gama de espécies para aquicultura. A pesquisa de microalgas data do final do século XIX, tendo como pioneiros pesquisadores poloneses, russos, holandeses e franceses. No Brasil somente nos anos 70 foi iniciada a criação das primeiras coleções de microalgas em cultivo e apenas na década de 80 esses cultivos realmente começaram a se difundir (LOURENÇO, 2006).

A ideia de usar microalgas como fonte de combustível não é nova, mas atualmente está sendo levada mais a sério devido ao aumento de preço do petróleo e ao aumento da preocupação mundial com o meio ambiente (CHISTI, 2007).

Microalgas podem ser usadas na produção de hidrogênio, de metano, através da digestão anaeróbia da biomassa, e de biodiesel, a partir do conteúdo lipídico intracelular (CHISTI, 2007).

Segundo a Sociedade Americana para Testes de Materiais (ASTM), o biodiesel de óleo de microalgas possui propriedades similares aos padrões de biodiesel, e ainda é mais estável devido ao seu ponto de fulgor ser mais elevado que o limite mínimo (HUANG *et al.*, 2010).

2.2.1. Biofixação de CO₂

Conforme citado no item 2.1, o uso de microalgas é uma alternativa para a mitigação do CO₂ através da reação de fotossíntese, descrita na Equação 2.1 (YANG *et al.*, 2008).

A biomassa de microalgas possui aproximadamente 50 % de carbono em peso seco, sendo que em cultivos autotróficos, esse carbono é derivado do dióxido de carbono (CHISTI, 2007). A produção de 1 kg de biomassa algal seca utiliza até 1,7 kg de CO₂ (KHAN *et al.*, 2009).

As microalgas podem utilizar como fonte de CO₂ o ar atmosférico, utilizando transferência de massa, porém esse processo é limitado pela baixa concentração de CO₂ existente no ar, que é por volta de 380 ppm. Também pode ser usado CO₂ proveniente de carbonatos solúveis, como por exemplo, o Na₂CO₃ (carbonato de sódio) e o NaHCO₃ (bicarbonato de sódio), porém a dissolução desses sais provoca no meio de cultivo uma elevação no pH e na concentração salina, sendo necessário o uso de microalgas tolerantes à essas condições extremas. Outra alternativa é o uso do CO₂ proveniente das emissões de plantas industriais ou usinas de energia. Segundo GUPTA & FAN (2002), os gases de combustão possuem entre 5 % e 30 % de CO₂. Além do CO₂, os gases de combustão possuem altos níveis de SO_x e NO_x, porém apenas um pequeno número de microalgas é tolerante à essa condição. Outro empecilho de usar o CO₂ proveniente de gases de combustão é que o mesmo deve ser refrigerado anteriormente ao uso (BRENNAN & OWENDE, 2010).

Portanto, as características desejadas para as microalgas utilizadas na mitigação de CO₂ são as seguintes: elevada taxa de crescimento e de utilização de CO₂, tolerância a elevadas temperaturas e elevadas quantidades de compostos NO_x e SO_x, co-produtos de alto valor agregado, facilidade de colheita e possibilidade de uso para tratamento de águas residuais. Ainda não foi encontrada uma microalga que satisfaça todas as características (BRENNAN & OWENDE, 2010).

Resultados de trabalhos encontrados na literatura foram compilados na Tabela 1.

Tabela 1. Microalgas estudadas para mitigação de CO₂, sendo produtividade da biomassa (Q_x) e produtividade do CO₂ (Q_{CO_2}) (KHAN *et al.*, 2009; BRENNAN & OWENDE, 2010).

Microalga	T (°C)	CO ₂ (%)	Q_x (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	Q_{CO_2} (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	Referência
<i>Chlorella</i> sp.	26	ar	0,091	-	(CHIU <i>et al.</i> , 2008)
<i>Chlorella</i> sp.	26	2	0,528	-	(CHIU <i>et al.</i> , 2008)
<i>Chlorella</i> sp.	26	5	0,491	-	(CHIU <i>et al.</i> , 2008)
<i>Chlorella</i> sp.	26	10	0,458	-	(CHIU <i>et al.</i> , 2008)
<i>Chlorella</i> sp.	26	15	0,369	-	(CHIU <i>et al.</i> , 2008)
<i>Chlorella kessleri</i>	30	18	0,087	0,163 ^a	(DE MORAIS & COSTA, 2007b)
<i>Scenedesmus</i> sp.	25	10	0,218	-	(YOO <i>et al.</i> , 2010)
<i>Chlorella vulgaris</i>	25	10	0,105	-	(YOO <i>et al.</i> , 2010)
<i>Botryococcus braunii</i>	25	10	0,027	-	(YOO <i>et al.</i> , 2010)
<i>Scenedesmus</i> sp.	25	gás de combustão	0,203	-	(YOO <i>et al.</i> , 2010)
<i>Botryococcus braunii</i>	25	gás de combustão	0,077	-	(YOO <i>et al.</i> , 2010)
<i>Chlorella vulgaris</i>	25	ar	0,04	0,075 ^a	(SCRAGG <i>et al.</i> , 2002)
<i>Chlorella vulgaris</i>	25	ar	0,024	0,045 ^a	(SCRAGG <i>et al.</i> , 2002)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	20	16-34	0,076	0,143	(HUNTLEY & REDALJE, 2007)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	-	ar	0,009	0,016	(GÓMEZ-VILLA <i>et al.</i> , 2005)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	-	ar	0,016	0,031	(GÓMEZ-VILLA <i>et al.</i> , 2005)
<i>Chlorella vulgaris</i>	27	15	-	0,624	(YUN <i>et al.</i> , 1997)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	30	18	0,14	0,26	(DE MORAIS & COSTA, 2007a)
<i>Spirulina</i> sp.	30	12	0,22	0,413	(DE MORAIS & COSTA, 2007a)
<i>Chlorococcum littorale</i>	30	40	-	1	(IWASAKI <i>et al.</i> , 1998); (MURAKAMI & IKENOUCI, 1997)
<i>Botryococcus braunii</i>	25- 30	-	1,1	> 1	(MURAKAMI & IKENOUCI, 1997)
<i>Chlorella</i> sp. UK001	35	15	-	> 1	(MURAKAMI & IKENOUCI, 1997)
<i>Chlorella</i> sp.	42	40	-	1	(SAKAI <i>et al.</i> , 1995)
<i>Dunaliella</i>	27	3	0,17	0,313	(KISHIMOTO <i>et al.</i> , 1994)

^a Calculado a partir da produtividade de biomassa segundo a equação $Q_{CO_2} = 1,88 \times Q_x$, que é derivada da fórmula molecular típica de biomassa de algas, CO_{0,48}H_{1,83}N_{0,11}P_{0,01} (CHISTI, 2007).

DOUSKOVA *et al.* (2009) cultivaram *Chlorella vulgaris* utilizando gás de combustão contendo entre 10 % e 13 % de CO₂ e 8 % a 10 % de O₂ e obtiveram produtividade de biomassa seca superior (2,5 g.L⁻¹.d⁻¹) ao cultivo controle, suplementado com 11 % de CO₂ no ar (1,7 g.L⁻¹.d⁻¹).

2.2.2. Produção de Lipídeos

Os lipídeos nas microalgas são constituintes de membrana, atuam como isolante térmico e reserva de energia (LOURENÇO, 2006). Na Tabela 2 são apresentadas algumas espécies de algas e seu respectivo conteúdo de óleo em porcentagem de peso seco.

Tabela 2. Conteúdo lipídico de algumas microalgas (CHISTI, 2007; GOUVEIA & OLIVEIRA, 2009).

Microalga	Lipídeos (% de peso seco)
<i>Chlorella</i> sp.	28 a 32
<i>Chlorella vulgaris</i>	14 a 56
<i>Chlorella emersonii</i>	63
<i>Chlorella protothecoides</i>	23 a 55
<i>Chlorella sorokiana</i>	22
<i>Chlorella minutissima</i>	57
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16 a 37
<i>Dunaliella salina</i>	14 a 20
<i>Isochrysis</i> sp.	25 a 33
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31 a 68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35 a 65
<i>Nitzchia</i> sp.	45 a 47
<i>Schizochytrium</i> sp.	50 a 77
<i>Spirulina maxima</i>	4 a 9

Alguns ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, produzidos pelas microalgas, possuem uso nutricional e farmacêutico, sendo de alto valor agregado, como os dos grupos ω -3 e ω -6, por exemplo, o α -linoleico, ALA, (18:3), ácidos eicosapentaenóico, EPA, (20:5), docosaexaenóico, DHA, (22:6) e araquidônico, AA, (20:4n-6) (SPOLAORE *et al.*, 2006; KHAN *et al.*, 2009; MATA *et al.*, 2009).

Segundo TEIXEIRA (2008), os óleos encontrados nas microalgas possuem características físico-químicas e químicas similares aos de óleos vegetais e por isto elas podem ser consideradas como potencial matéria-prima para a produção de biodiesel.

Na produção de biodiesel, as microalgas apresentam diversas vantagens com relação às plantas, como, por exemplo:

- crescerem à taxas mais elevadas, sendo o tempo de duplicação das microalgas geralmente em torno de um dia (MENG *et al.*, 2009);
- possuírem maior rendimento de óleo por área cultivada (KOH & GHAZOUL, 2008);
- poderem ser cultivadas em terrenos impróprios para a agricultura e sem competir por fontes com a agricultura convencional (CHISTI, 2007);
- serem capazes de remediar águas residuais através do consumo de nitrogênio e fósforo (SINGH & GU, 2010);
- produzirem co-produtos de alto valor agregado (KHAN *et al.*, 2009);
- produtividade não estar atrelada à época do ano ou clima (MATA *et al.*, 2009).

Os óleos de microalgas, assim como os das plantas, não podem ser utilizados diretamente como combustível devido ao fato de serem compostos principalmente por triglicerídeos, pequenas quantias de mono e diglicerídeos, ácidos graxos livres e quantidades residuais de fosfolipídeos, esteróis, água e outras impurezas (KHAN *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2010). A principal forma de transformar quimicamente esses óleos é a transesterificação, que é uma reação de múltiplas etapas, onde primeiramente os triglicerídeos são transformados em diglicerídeos, que depois são transformados em monoglicerídeos, que são convertidos em ésteres e glicerol. A reação global está apresentada na Figura 2 (MATA *et al.*, 2009).

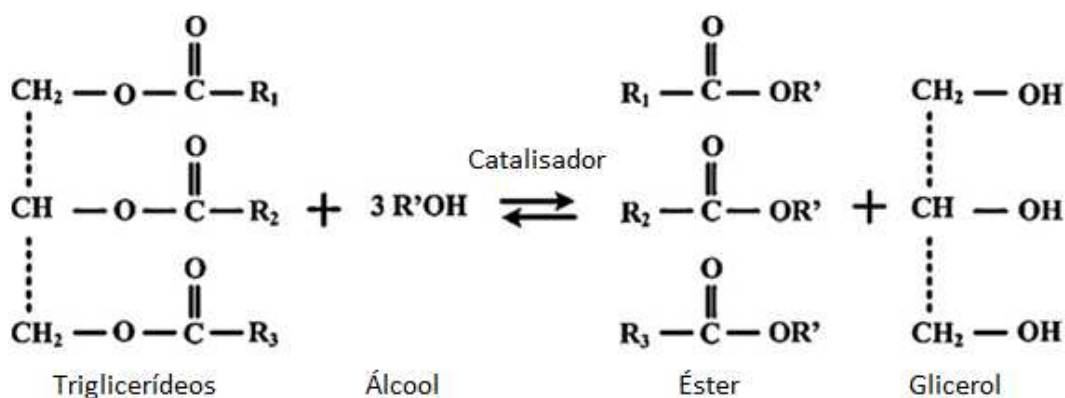


Figura 2. Reação global de transesterificação de triglicerídeos (MATA *et al.*, 2009).

Biodiesel é um combustível composto por uma mistura de ésteres de alquila de ácidos graxos obtidos através de transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais (MATA *et al.*, 2009). O biodiesel é um combustível renovável, não tóxico e biodegradável, que possui grande potencial para uso em transportes principalmente em função de poder ser utilizado nos motores que funcionam a diesel sem precisar de nenhuma modificação e de poder ser misturado com o diesel proveniente do petróleo em qualquer proporção. Outro ponto positivo com relação ao uso de biodiesel, é que a queima deste provoca menores emissões de particulados, monóxido de carbono, hidrocarbonetos e óxidos de enxofre, quando comparado ao diesel de petróleo. Porém, as emissões de óxidos de nitrogênio são mais elevadas (KHAN *et al.*, 2009).

2.2.3. Produção de Pigmentos

Todos os organismos fotossintéticos contêm pigmentos orgânicos para converter luz em energia, sendo que as três maiores classes são as clorofilas, os carotenoides e as ficobilinas (MASOJÍDEK, 2004).

O papel principal nos sistemas de absorção de luz é desempenhado pela clorofila *a*, portanto, ela está presente em todas as espécies de microalgas fotossintetizantes. As clorofilas *b*, *c* e *d* são pigmentos acessórios da fotossíntese, sendo que a maioria das algas possui alguma delas (LOURENÇO, 2006). A clorofila pode ser usada para tratamentos de úlcera e recuperação de fígado devido à sua atividade como agente quelante, e na reparação celular, pois aumenta a hemoglobina no sangue que aumenta o crescimento celular. Também pode ser usada como aditivo em alimentos, devido à sua forte pigmentação verde, aliada à demanda dos consumidores por alimentos naturais. Acredita-se que quase todas as culturas de microalgas em condições ótimas de crescimento possuem em torno de 4 % do seu peso seco de clorofila, mas foi relatado que a microalga *Chlorella* possui maiores quantidades (HARUN *et al.*, 2010).

As ficobilinas estão presentes apenas em alguns tipos de algas e podem ser pigmentos azuis, sendo chamados de ficocianinas, ou pigmentos vermelhos, sendo chamados de ficoeritrinas. As ficobilinas aumentam o espectro de captação da luz pela

fotossíntese e também atuam como reserva de nitrogênio (LOURENÇO, 2006). As principais fontes de ficobilinas comerciais são a cianobactéria *Arthrospira* e a microalga vermelha *Porphyridium*. As principais aplicações destas microalgas são em corantes alimentares, substituindo os corantes sintéticos, em pigmentos naturais para cosméticos e como reagentes fluorescentes em laboratórios de imunologia (SPOLAORE *et al.*, 2006). Também são utilizadas para consumo humano, devido ao seu elevado conteúdo protéico (LOURENÇO, 2006).

O grupo de pigmentos denominado carotenoides, pigmentos amarelos ou alaranjados, são os mais importantes comercialmente. Existem mais de quatrocentos carotenoides de microalgas conhecidos, divididos em dois grupos, os carotenos, que contém apenas hidrocarbonetos, não sendo oxigenados, e as xantofilas, que contém moléculas de oxigênio. No grupo dos carotenos estão o α -caroteno e o β -caroteno, dentre outros. Os carotenoides estão presentes nas microalgas geralmente na concentração de 0,1 a 0,2 % do seu peso seco, sendo que na microalga *Dunaliella* é possível atingir mais de 14 % de β -caroteno em condições de cultura apropriadas. O β -caroteno é convertido pelo corpo humano em vitamina A e possui propriedades antioxidantes. É usado comercialmente como corante em alimentos e como fármaco (MASOJÍDEK, 2004; DUFOSSÉ *et al.*, 2005; SPOLAORE *et al.*, 2006).

No grupo das xantofilas estão a luteína, zeaxantina, violaxantina e neoxantina, sendo a luteína considerada o principal pigmento do grupo. Ela pode ser usada em produtos farmacêuticos para o tratamento e prevenção de doenças degenerativas, em cosméticos e em alimentos, devido ao seu elevado valor nutricional e baixa toxicidade, além do uso como pigmento. O principal gênero utilizado na produção de luteína é a *Chlorella*, principalmente as espécies *C. protothecoides*, *C. pyrenoidosa* e *C. vulgaris* (PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011).

Os carotenoides, da mesma forma que as clorofilas *b*, *c* e *d* são pigmentos acessórios da fotossíntese, mas também possuem a função de proteger os fotossistemas quando há luz em excesso, funcionando como uma espécie de filtro (MASOJÍDEK, 2004; LOURENÇO, 2006).

No grupo dos carotenoides, existem ainda os cetocarotenoides, sendo que os mais importantes são a astaxantina e a cantaxantina, que são bastante usados na

aquicultura. A astaxantina possui propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, exibe atividade anticâncer e aumenta a resposta imunológica. A microalga *Haematococcus pluvialis* pode chegar a produzir concentrações equivalentes a 4-5 % de seu peso seco em astaxantina, mas o seu uso comercial está mais voltado ao consumo humano do que à aquicultura, que utiliza a astaxantina sintética por possuir valor de mercado menor (SPOLAORE *et al.*, 2006; ZHU *et al.*, 2009).

2.2.4. Classificação e Características das Chlorellas

As microalgas são categorizadas de acordo com a sua pigmentação, ciclo de vida e estrutura celular básica, estando as quatro principais classes (em termos de abundância) listadas a seguir (KHAN *et al.*, 2009):

- i. diatomáceas (Bacillariophyceae)
- ii. algas verdes (Chlorophyceae)
- iii. algas azuis-verdes (Cyanophyceae)
- iv. algas douradas (Chrysophyceae)

A microalga *Chlorella* faz parte do grupo das Chlorophytas (Chlorophyceae), ou algas verdes. É uma alga unicelular, com formato esférico, globular ou elipsoidal, não móvel (não possui flagelos) que pode atingir diâmetros entre 2,0 μm e 10,0 μm . Algumas espécies de *Chlorella* são marinhas e outras são dulcícolas. Sua composição média é de aproximadamente 20 % de gordura, 45 % de proteína, 20 % de carboidrato e 10 % de minerais e vitaminas (PHUKAN *et al.*, 2011).

As algas verdes possuem como pigmentos fotossintéticos clorofila *a* e *b* e a sua composição de carotenoides engloba α -caroteno, β -caroteno, neoxantina, luteína, violaxantina, anteraxantina e zeaxantina como carotenoides primários, e equinenona, hidroxiequinenona, cantaxantina e astaxantina como carotenoides secundários (BUBRICK, 1991; YOUNG & BRITTON, 1993; GOUVEIA *et al.*, 1996).

A microalga *Chlorella* é produzida por mais de setenta companhias, sendo a japonesa Nihon Chlorella Inc. a precursora em 1961. Inicialmente, ela foi comercializada como suplemento alimentar, e depois como alimento para a

aquicultura marinha podendo ser também utilizada como aditivo alimentar devido à sua coloração. O principal componente para a saúde humana presente em *Chlorella* é o β -1,3-glicano, que é um ativo imunestimulador e que reduz radicais livres e a quantidade de lipídeos no sangue (IWAMOTO, 2004; SPOLAORE *et al.*, 2006).

A espécie *Chlorella minutissima* tem sido alvo de estudos por diversos pesquisadores. BHATNAGAR *et al.* (2010) cultivaram *C. minutissima* em águas residuárias municipais em condições mixotróficas e heterotróficas e relataram que esta espécie possui tolerância a diversas condições, como por exemplo: pH entre 4 e 12, poluição, anaerobiose e estresse osmótico. BORGHETTI (2009) cultivou *C. minutissima* em diversas proporções de resíduo agroindustrial do processamento da mandioca, chegando a obter biomassa de 2,790 g.L⁻¹, velocidade de crescimento máxima de 0,397 d⁻¹, produtividade de 0,540 g.L⁻¹.d⁻¹ e porcentagem de lipídeos de 11,08 %.

OH *et al.* (2010) desenvolveram um sistema de reciclagem de células em água com propriedades similares às do mar aquecida a 30 °C em fotobiorreator de 200 litros durante 80 dias. Eles atingiram, cultivando *C. minutissima* em condições mixotróficas, concentração máxima de células secas de 8,3 g.L⁻¹ contendo 23,2 % de lipídeos com composição de 17 % de C16 e 47 % de C18 e concluíram que uma quantidade elevada de biomassa é necessária para promover elevados acúmulos de lipídeos dentro das células.

LI *et al.* (2011) cultivaram *C. minutissima* (UTEX2341) em condições fotoheterotróficas com 26,37 g.L⁻¹.d⁻¹ de carbono, 2,61 g.L⁻¹.d⁻¹ de nitrogênio e 0,03 g.L⁻¹.d⁻¹ de fósforo e obtiveram produtividade máxima de biomassa de 1,78 g.L⁻¹.d⁻¹.

ILLMAN *et al.* (2000) utilizaram um biorreator agitado de 2 litros e testaram espécies de *Chlorella* em meio Watanabe como controle e em meio com limitação de nitrogênio, conseguindo, em *C. minutissima*, duplicar a biomassa atingida, por consequência, a produtividade e elevando a porcentagem de lipídeos de 31 a 57 %.

INBARAJ *et al.* (2006) determinaram o perfil completo dos carotenoides da microalga *Chlorella pyrenoidosa* (Tabela 3).

Tabela 3. Carotenoides presentes da microalga *Chlorella pyrenoidosa* apresentados em proporção e quantidades (INBARAJ *et al.*, 2006).

Carotenoide	Proporção (%)	Quantidade (mg.g ⁻¹)
Luteína	93,0	153,01 ± 0,1
β-caroteno	2,62	4,31 ± 0,03
α-caroteno	2,57	4,23 ± 0,02
Zeaxantina	1,32	2,17 ± 0,01
Auroxantina, violaxantina, neocromo, neoxantina e criptoxantina	0,42	0,68 ± 0,01

2.3. Fatores que Influenciam o Crescimento de Microalgas

Os cultivos de microalgas dependem de uma série de parâmetros, dentre eles estão a intensidade luminosa, a temperatura, a concentração salina do meio de cultivo e o pH (MATA *et al.*, 2009).

2.3.1. Intensidade Luminosa

A questão central envolvida na produção em massa de microalgas fotoautotróficas é o uso eficiente da luz para obter produtividade fotossintética, massa celular e metabólitos secundários (RICHMOND, 2004).

Diminuindo a intensidade luminosa, os pigmentos diretamente envolvidos com a fotossíntese aumentam, como por exemplo, a clorofila-*a*. Em contrapartida, aumentando a intensidade luminosa, os pigmentos que servem como agentes fotoprotetores aumentam, como por exemplo, a zeaxantina e o β-caroteno (HU, 2004).

A produtividade máxima da cultura é obtida quando os requisitos nutricionais para o cultivo são satisfeitos e a temperatura está na faixa ótima. Porém, existe uma

interação entre a temperatura e a intensidade luminosa, ou seja, a temperatura ótima para a fotossíntese aumenta com o aumento da intensidade luminosa (RICHMOND, 2004).

A resposta cinética do crescimento das microalgas para a intensidade da luz é conhecida como Curva de Resposta à Luz, mostrada na FIGURA 3 (RICHMOND, 2004).

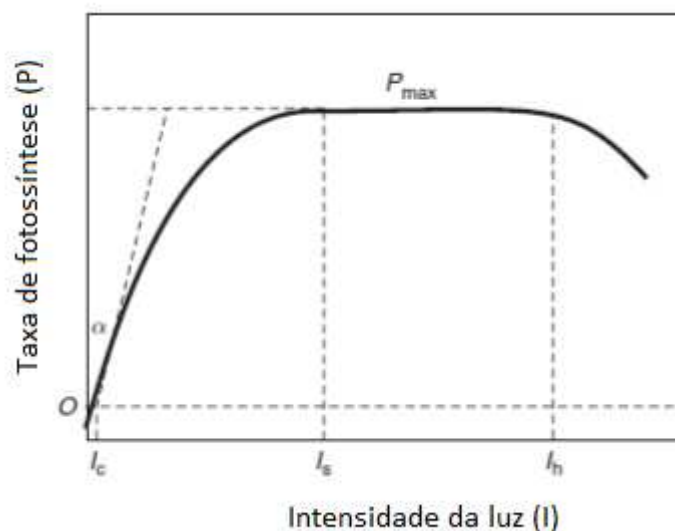


Figura 3. Curva de Resposta à Luz (RICHMOND, 2004).

Em intensidades luminosas extremamente baixas, abaixo do ponto de compensação (I_c), o crescimento das microalgas é praticamente zero. Elevando a intensidade luminosa para níveis acima do ponto de compensação, o crescimento é acelerado, sendo que a inclinação inicial (α) representa a máxima eficiência de crescimento em resposta à luz. Elevando ainda mais a intensidade luminosa, o ponto de saturação da luz (I_s) é atingido, onde a taxa de crescimento das microalgas é máxima, sendo que a taxa de fotossíntese é máxima (P_{max}). Este ponto é o ponto ótimo da luz, pois iluminações mais elevadas que esta não proporcionam aumento na taxa de crescimento e inclusive podem ser prejudiciais, quando a taxa atinge o ponto de fotoinibição (I_h), onde ocorre o declínio da fotossíntese e até a morte celular em casos mais drásticos (RICHMOND, 2004).

Quando os cultivos atingem uma elevada densidade celular, podem existir regiões

de sombra que podem modificar a disponibilidade da luz para as células individualmente, ou seja, a luz pode se tornar indisponível para certas regiões dos cultivos. Neste caso, a mistura da cultura torna-se um fator de elevada importância, pois promove às células acesso à luz, em ciclos de luz e sombra, que podem levar milissegundos até alguns segundos para serem completos, dependendo da turbulência e do caminho ótico. Quanto maior for a frequência do ciclo de luz e sombra, mais eficientemente a luz será usada pela fotossíntese (RICHMOND, 2004).

DEGEN *et al.* (2001) testaram intensidades luminosas até 29.600 lx em cultivos de *Chlorella* a 22 °C chegando aos resultados que o ponto de compensação foi na intensidade luminosa entre 370 lx e 740 lx e o ponto de saturação em 18.500 lx, onde ocorreu um máximo na velocidade específica de crescimento, equivalente a 0,08 h⁻¹ (1,92 d⁻¹). Os autores sugerem que a fotoinibição em *Chlorella* pode ser evitada cultivando esta microalga em intensidades luminosas de aproximadamente 18.500 lx.

MESECK *et al.* (2005) testou a influência da intensidade luminosa e do fotoperíodo em cultivos da microalga *Tetraselmi chui*. As intensidades luminosas testadas foram 5.402 lx, 8.140 lx e 16.280 lx e os ciclos dia:noite foram 24:0, 16:8, 12:12 e 8:16. Os resultados não mostraram interação significativa entre o fotoperíodo e a intensidade da luz, sendo que quanto maior a intensidade da luz e maior a duração da iluminação (ciclo dia), maior a biomassa atingida.

JACOB-LOPES *et al.* (2009) utilizaram cultivos em fotobiorreator de coluna de bolhas da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nägeli* a 35 °C com 15 % de CO₂ na intensidade luminosa de 11.100 lx para avaliar o fotoperíodo. Os ciclos dia:noite testados foram os seguintes: 0:24, 2:22, 4:20, 6:18, 8:16, 10:14, 12:12, 14:10, 16:8, 18:6, 20:4, 22:2 e 24:0. A máxima biomassa obtida foi no cultivo com iluminação contínua, ou seja, ciclo dia:noite de 24:0. Diminuindo o ciclo dia, a biomassa obtida diminuiu linearmente, com exceção da condição 12:12. Essa exceção foi atribuída a pré-adaptação da microalga, pois era nessa condição que ela estava sendo mantida anteriormente.

2.3.2. Temperatura

Depois da intensidade luminosa, a temperatura é o fator mais importante no crescimento de microalgas, pois regula as respostas celular, morfológica e fisiológica. Altas temperaturas aceleram o metabolismo das microalgas, enquanto baixas temperaturas inibem o seu crescimento. Cada espécie possui a sua temperatura ótima e geralmente as microalgas toleram temperaturas até 15 °C inferiores à sua temperatura ótima, porém um aumento de 2 a 4 °C pode resultar na perda total do cultivo (MATA *et al.*, 2009; ZENG *et al.*, 2011).

Os cultivos de *Chlorella* na literatura têm sido reportados com temperaturas entre 25 e 35 °C, como é o caso de CHIU *et al.* (2008) que cultivou *Chlorella sp.* a 26 °C e BHATNAGAR *et al.* (2010) e BORGHETTI (2009) que cultivaram *Chlorella minutissima* a 27 °C e a 27 °C – 33 °C, respectivamente.

MEHLITZ (2009) atingiu um máximo para a velocidade de crescimento da microalga *Chlorella* (de aproximadamente 0,06 h⁻¹ ou 1,44 d⁻¹) em temperaturas em torno de 30 °C em fotobiorreator tubular.

Segundo HU (2004), a temperatura não possui influência no montante de lipídeos produzidos pelas microalgas, porém uma diminuição na temperatura de cultivo abaixo do nível ótimo geralmente ocasiona um aumento no grau de insaturação dos lipídeos.

Com relação à produção de carotenoides, TIAHJONO *et al.* (1994) e LIU & LEE (2000) *apud* HU (2004) conseguiram aumentar a quantidade de carotenoides elevando a temperatura de cultivo de 20 °C a 30 °C e 35 °C, respectivamente.

2.3.3. Concentração Salina

O fator concentração salina está fortemente relacionado à composição do meio de cultivo. Os requisitos nutricionais para o cultivo de microalgas estão sintetizados na TABELA 4 (ZENG *et al.*, 2011).

Tabela 4. Requisitos nutricionais para o cultivo de microalgas (ZENG *et al.*, 2011).

Nutrição	Principais Ingredientes	Função	Faixa
Fonte de Carbono	CO ₂ , HCO ₃ ⁻ , CO ₃ ⁻ , etc.	Fornecer C para toda a célula, etc.	1 – 10 g.L ⁻¹
Fonte de Nitrogênio	NO ₃ ⁻ , Uréia, N ₂ , etc.	Fornecer N para toda a célula, etc.	10 – 2000 mg.L ⁻¹
Fósforo	Hidrofosfato, fosfato, etc.	Fornecer P para todas as reações nas células, etc.	10 – 500 mg.L ⁻¹
Enxofre	Sulfato, etc.	Fornecer S para proteínas e reações, etc.	1 – 200 mg.L ⁻¹
Sais inorgânicos	K, Ca, Na, Mg, etc.	Manter estrutura e atividade celular, etc.	0,1 – 100 mg.L ⁻¹
Elementos-traço	Fe, Zn, Mn, Pb, Cd, etc.	Ser fator coenzima, etc.	0,01 – 10 mg.L ⁻¹
Vitaminas	V _B , V _C , V _E , etc.	Ajudar na divisão celular, etc.	0,01 – 1000 µg.L ⁻¹

Muitos meios de cultivo de microalgas marinhas são formulados utilizando como base água do mar, que possui grande quantidade de sólidos e gases dissolvidos, estando presentes por volta de setenta elementos químicos. Um litro de água do mar possui em média 96,5 % da massa correspondente à água e 3,5 % corresponde às demais substâncias dissolvidas, com amplo predomínio de sais inorgânicos. A concentração salina é uma medida do total de sais dissolvidos presente na água. A água do mar, apesar da sua formulação bastante complexa, necessita ser suplementada com macronutrientes como, por exemplo, nitrogênio, fósforo, ferro e silício, a fim de obter respostas de crescimento mais rápidas das espécies (LOURENÇO, 2006).

Segundo LOURENÇO (2006), os maiores constituintes da fração sólida da água do mar são os íons Na⁺ e Cl⁻, que somados representam mais de 85 % da massa de sólidos dissolvidos. Por este motivo, muitos autores estudam o fator concentração salina através da quantidade de NaCl no meio de cultivo, como é o caso de LOSEVA *et al.* (1998), que estudou o efeito de uma condição de temperatura e concentração salina elevada em células de *Chlorella* utilizando 450 mM de NaCl.

Segundo HU (2004), um aumento na concentração salina do meio de cultivo pode resultar em um leve aumento no conteúdo lipídico total das microalgas com uma diminuição na proporção de ácidos graxos insaturados no total de ácidos graxos.

RAO *et al.* (2007) testaram concentrações de NaCl de 17 mM a 85 mM e

obtiveram, conforme aumento da concentração salina, aumento na produção de carotenoides, lipídeos totais e biomassa, o que foi atribuído a uma possível adaptação da microalga *Botryococcus braunii* à concentrações salinas mais elevadas.

Já FAZELI *et al.* (2006) utilizaram concentrações de NaCl de 0,05 M a 3 M para o crescimento da microalga *Dunaliella tertiolecta* e obtiveram a menor biomassa na condição de maior concentração salina, porém com maior produtividade de carotenoides em base celular.

TAKAGI *et al.* (2006) testaram concentrações iniciais de NaCl de até 2 M e descobriram que na concentração inicial de 2 M ocorre inibição no crescimento da microalga *Dunaliella tertiolecta*. Para avaliar a produção de lipídeos totais foram testadas as concentrações de NaCl entre 0,5 M e 1 M, obtendo respectivamente as porcentagens de lipídeos de 60 % e 67 %. Para avaliar o impacto do aumento da concentração salina durante os cultivos, problema frequente quando são utilizados cultivos em sistemas abertos, quantidades de sal foram adicionadas a partir da metade da fase *log* de cultivos com 1 M inicial de NaCl e os resultados foram bastante positivos, com adição de 1 M ocorreu aumento da porcentagem de lipídeos totais para em torno de 71 %, porém com diminuição na quantidade de biomassa obtida.

Entretanto, alguns pesquisadores obtiveram resultados contraditórios aos apresentados, como é o caso de RUANGSOMBOON (2011), que em cultivos de *Botryococcus braunii* obteve maior conteúdo lipídico utilizando concentração salina de 0 psu (unidades práticas de salinidade) do que utilizando as concentrações salinas de 5 psu, 10 psu, 15 psu e 20 psu. YEESANG & CHEIRSILP (2011) testaram quatro espécies de *Botryococcus* nas concentrações de NaCl de 0 mM, 43 mM e 86 mM, em meios com ou sem limitação de nitrogênio. Nos testes com limitação de nitrogênio, nenhuma microalga sobreviveu aos níveis salinos testados. Já em meio rico em nitrogênio, todas as microalgas sobreviveram, porém com o aumento da concentração salina, apenas uma manteve o mesmo crescimento, enquanto as demais tiveram sua taxa de crescimento prejudicada. Com relação à porcentagem de lipídeos, apenas uma manteve aproximadamente a mesma produção, enquanto as demais apresentaram uma diminuição da porcentagem de lipídeos produzida.

2.3.4. pH

A água do mar possui pH entre 7,8 e 8,3 e apresenta uma boa capacidade de tamponamento (LEKANG, 2007). A maioria das espécies de microalgas tem o seu crescimento favorecido em pH neutro, mas algumas espécies podem ser favorecidas por pH ácido ou alcalino (ZENG *et al.*, 2011).

O suprimento de CO₂ aos cultivos é necessário para atingir elevadas produtividades de microalgas e, além disso, é o método mais conveniente de controle de pH (GROBBELAAR, 2004).

O dióxido de carbono em meio aquoso participa do sistema de equilíbrio descrito pelas equações 2.2, 2.3 e 2.4 (LEKANG, 2007).



Onde:

CO₂ = dióxido de carbono

H₂CO₃ = ácido carbônico

HCO₃⁻ = íon bicarbonato

CO₃²⁻ = íon carbonato

A distribuição das espécies químicas é determinada pelo pH. Em pH baixo, há excesso de dióxido de carbono ou ácido carbônico. Em pH neutro, há excesso de íon bicarbonato e em pH elevado, há excesso de íon carbonato (LEKANG, 2007).

O consumo de CO₂ pelas microalgas através da fotossíntese leva a um aumento no pH do meio de cultivo (GROBBELAAR, 2004; ZENG *et al.*, 2011).

KARAM & SOCCOL (2007) testaram o efeito do pH em cultivos de *Spirulina major*. Foram testados quatro diferentes valores de pH do meio de cultivo (7,0; 8,0; 9,0 e 10,0) e os resultados mostraram que ocorre uma maior produção de biomassa em pH 8,0.

MOHEIMANI (2005) utilizou adição de dióxido de carbono para controlar o pH em cultivos de *Emiliana huxleyi* e *Pleurochrysis carterae*. Para a microalga *E. huxleyi* cultivada em fotobiorreator de placa, a adição de CO₂ diminuiu a produtividade em comparação com o cultivo sem controle de pH. Já para a microalga *P. carterae*, a produtividade em comparação com o cultivo sem controle de pH aumentou em fotobiorreator de placa (pH de 7,7 e 8,0) e em sistema aberto (pH de 9,1 e 9,6).

2.4. Cultivo de Microalgas Fotoautotróficas

No passado, para os cultivos de microalgas eram empregadas lagoas artificiais, porém recentemente cultivos em sistemas fechados têm sido também desenvolvidos e empregados para aumentar a produção de biomassa (KHAN *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2009).

Os sistemas abertos são empregados comercialmente para o cultivo de microalgas resistentes a condições extremas, denominadas extremófilas, como elevado pH (*Spirulina*), concentração salina (*Dunaliella*) ou temperatura. Essas condições evitam o crescimento de outras algas ou até mesmo bactérias (XU *et al.*, 2009; HARUN *et al.*, 2010). Segundo KHAN *et al.* (2009), no máximo seis espécies de microalgas têm sido utilizadas para produção de biomassa em sistemas abertos.

2.4.1. Sistemas Abertos

Diversos sistemas abertos para cultivo de microalgas foram criados e aplicados, existindo uma variedade de formas, tamanhos, materiais usados na construção, tipos de agitação e inclinação, porém apenas os seguintes três tipos têm sido usados e

operados em relativamente larga escala: (1) sistemas inclinados onde a mistura é obtida através de bombeamento e da gravidade, (2) tanques circulares com agitação através de braço mecânico e (3) tanques *raceway*. Apenas os dois últimos, juntamente com as piscinas naturais, são usados para produção comercial de microalgas, sendo que os tanques *raceway* são os mais usados e estão em vigor desde 1950 (TREDICI, 2004).

Os tanques *raceway* (Figura 4) são circuitos ovais fechados com profundidade de 0,15 a 0,5 m, com mistura e circulação contínua para prevenir sedimentação (XU *et al.*, 2009; BRENNAN & OWENDE, 2010). Geralmente são construídos em concreto, mas terra compactada e revestida com plástico branco também pode ser usada. Em uma produção contínua de microalgas, meio de cultivo e nutrientes são inseridos na frente das pás do misturador e circulam até o ponto de colheita da cultura, que é anterior ao misturador (CHISTI, 2007).

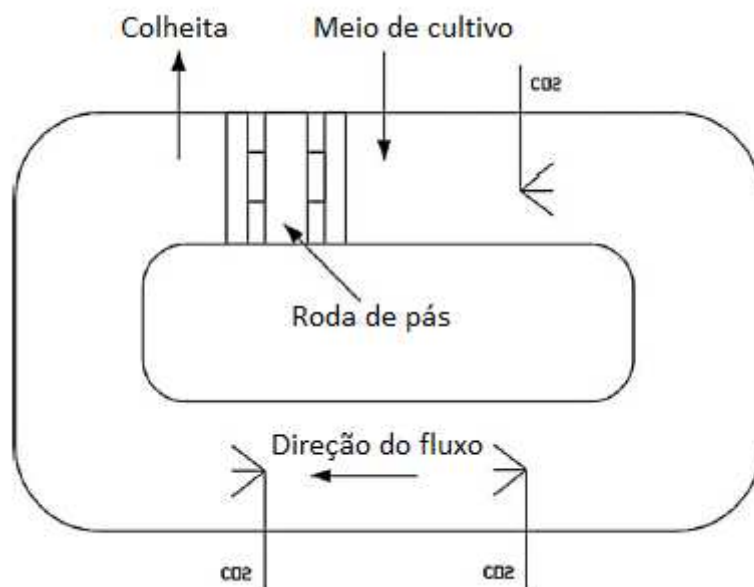


Figura 4. Sistema aberto tipo *raceway* para cultivo de microalgas (BRENNAN & OWENDE, 2010).

O sistema *raceway* é de fácil limpeza, baixo custo e fácil de operar, porém atinge produtividades baixas em virtude de ter uma mistura pobre e, por consequência, possuir uma zona escura, ou seja, as microalgas que estão abaixo da superfície não

possuem muito acesso à luz (CHISTI, 2007). Segundo KHAN *et al.* (2009), em sistemas *raceway* é possível obter concentrações de biomassa seca de 1 g.L^{-1} e produtividades de 60 a $100 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$.

Os sistemas abertos são bastante dependentes da localização em que são instalados, pois isto define a temperatura e a luz que as microalgas serão submetidas (HARUN *et al.*, 2010). A luz geralmente é um fator limitante para os sistemas abertos, pois ela está disponível apenas de dia e sujeita a variações sazonais (BRENNAN & OWENDE, 2010).

Com relação à temperatura, existem duas maiores limitações nos sistemas abertos. A primeira é que os cultivos estão sujeitos a uma flutuação da temperatura conforme o dia e a noite e a segunda é que os sistemas não possuem refrigeração, apenas por consequência da evaporação de água (BRENNAN & OWENDE, 2010).

2.4.2. Sistemas Fechados

As configurações de sistemas fechados para cultivo de microalgas mais comumente empregadas são: fotobiorreatores placa plana, coluna de bolhas anular e tubular (Figura 5). Ainda podem ser utilizadas configurações *airlift* e modificações das três configurações citadas anteriormente, como é o caso do reator de placa em forma de domo (POSTEN, 2009).

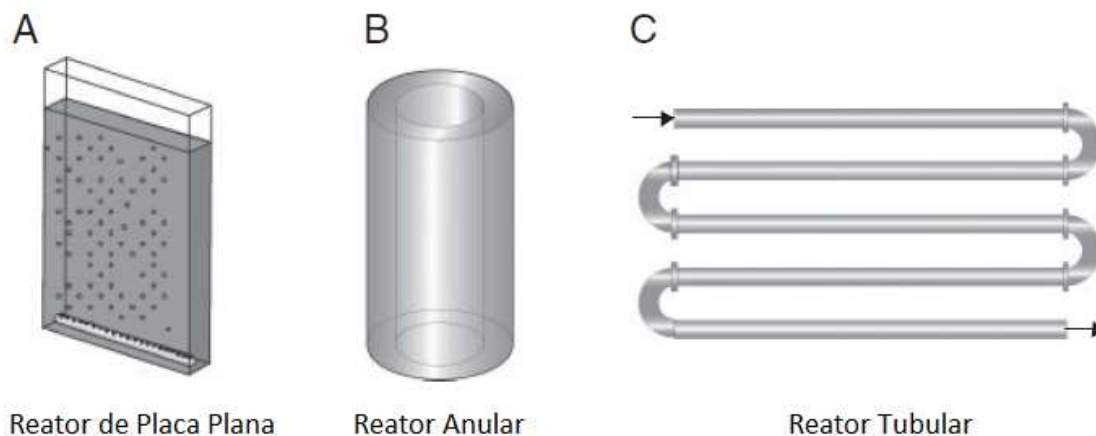


Figura 5. Geometrias mais comuns de fotobiorreatores fechados. A) Reator de Placa Plana. B) Reator Anular. C) Reator Tubular (POSTEN, 2009).

O fotobiorreator tubular (Figura 5.C) consiste em tubos transparentes feitos de plástico ou vidro com diâmetro de 0,1 m ou menos que podem ser arranjados de forma horizontal, vertical, helicoidal ou inclinados. O arranjo horizontal é mais fácil de escalonar, porém requer uma área terrestre maior enquanto o vertical proporciona maior transferência de massa e menor energia requerida (HARUN *et al.*, 2010). O meio de cultivo com microalgas circula nos tubos com fluxo produzido por bomba mecânica ou *airlift*. É aconselhável que o comprimento de um tubo não exceda 80 m, pois conforme as microalgas consomem CO_2 , o pH do meio de cultivo se eleva e O_2 é produzido, sendo que a uma concentração de 35 mg. L^{-1} ele se torna tóxico para a maioria das espécies de microalgas (CHISTI, 2007; XU *et al.*, 2009). O fotobiorreator tubular possui uma grande área superficial de iluminação, portanto, é bastante adequado para culturas em áreas externas (HARUN *et al.*, 2010).

O fotobiorreator de placa plana (Figura 5.A) é considerado o design de fotobiorreator mais robusto (POSTEN, 2009). Ele consiste em duas placas planas com paredes mais finas do que os reatores tubulares (XU *et al.*, 2009). A mistura é obtida através do suprimento de ar e CO_2 no fundo do reator utilizando um tubo perfurado. A agitação por bolhas é a forma mais suave de proporcionar uma mistura, pois ocasiona um menor estresse de cisalhamento nas microalgas, e além do mais, diminui o consumo de energia (POSTEN, 2009; HARUN *et al.*, 2010). Os reatores podem ser posicionados verticalmente ou inclinados em um ângulo ótimo com relação ao sol.

Essa geometria proporciona uma grande área superficial exposta à iluminação, não possui regiões escuras e, por consequência, proporciona uma elevada eficiência fotossintética. Ela também possui a vantagem de não ocasionar acúmulo de O₂ dissolvido no meio de cultivo. Como desvantagem, existe a dificuldade de escalonamento e a problemática do controle de temperatura, para o qual é possível usar aspersores de irrigação, para resfriamento evaporativo, ou trocador de calor interno em forma de tubo de aço inoxidável (XU *et al.*, 2009).

O fotobiorreator de coluna de bolhas consiste em um tubo vertical com aeração proveniente do fundo do reator que proporciona agitação e mistura do cultivo de microalgas. Da mesma forma que o reator tubular, o reator de coluna de bolhas apresenta a limitação de possuir uma região escura no meio do cilindro reacional. Para solucionar tal problema, o reator de coluna de bolhas anular (Figura 5.B) foi desenvolvido, sendo composto de um cilindro dentro de outro, tornando possível prover iluminação também na região interna. Esta geometria pode ser vista como um biorreator de placa plana arredondado, com a vantagem de utilizar menos espaço de terra (POSTEN, 2009).

Existe ainda o fotobiorreator *airlift*, que também faz uso de bombeamento de ar para promover agitação e mistura, porém possui uma divisória interna para direcionar o fluxo da cultura. Segundo XU *et al.* (2009), os fotobiorreatores *airlift* demonstram proporcionar crescimento de microalga superior aos fotobiorreatores colunas de bolhas, por proverem um padrão de ciclo de luz e sombra enquanto o fluxo nos reatores coluna de bolha ocorrem sem direcionamento, de forma aleatória.

Os fotobiorreatores possibilitam que um cultivo seja realizado com apenas uma espécie de microalgas e que tenha durações maiores, devido ao fato de o seu ambiente ser fechado, portanto, não estando sujeitos a contaminações de outras espécies de microalgas bem como outros microrganismos (KHAN *et al.*, 2009).

Além disso, os fotobiorreatores proporcionam um melhor controle dos parâmetros do cultivo, o que permite que maiores quantidades de biomassa e maiores produtividades sejam atingidas, sendo a produtividade o indicativo mais importante para o sucesso de uma tecnologia (HARUN *et al.*, 2010).

Pelo fato de os fotobiorreatores serem sistemas mais complexos e com maior controle, os custos de instalação e operação são superiores, portanto, os fotobiorreatores têm sido sugeridos para produção de produtos de maior valor agregado, como por exemplo, proteínas e ácidos graxos de cadeia longa, enquanto os sistemas abertos para biocombustíveis (ZENG *et al.*, 2011).

Resultados de trabalhos encontrados na literatura sobre cultivos de microalgas desenvolvidos em fotobiorreatores estão sintetizados na Tabela 5 (XU *et al.*, 2009).

Tabela 5. Comparação de diferentes sistemas fechados para cultivo de microalgas. Luminosidade (lx), caminho ótico ou diâmetro (D), volume (V), concentração de biomassa (X), produtividade de biomassa (Q_x) e coeficiente de transferência de massa ($k_L a$) (XU *et al.*, 2009).

Tipo de fotobiorreator	Fonte de Luz	Luminosidade (lx)	D (cm)	V (L)	X (g.L ⁻¹)	Q_x (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	$k_L a$ (x10 ⁻³ s ⁻¹)	Microalga	Referência
Tubular	Artificial	8.880	1,2	5,5	3,26	0,62	-	<i>Spirulina</i>	(CONVERTI <i>et al.</i> , 2006)
	Sol	95.386	6	200	2,38	1,19	~ 6	<i>Phaeodactylum</i>	(FERNÁNDEZ <i>et al.</i> , 2001)
		83.990	3	75	3,03	1,38	~ 4	<i>Phaeodactylum</i>	(HALL <i>et al.</i> , 2003)
Placa Plana	Artificial	74.000	3	3,4	-	1,5	-	<i>Dunaliella</i>	(BARBOSA <i>et al.</i> , 2005)
		74.000	3	5	7,3	1,38	-	<i>Phaeodactylum</i>	(MEISER <i>et al.</i> , 2004)
	Sol	-	10	200	2,6	0,225	-	<i>Nannochloropsis</i>	(RICHMOND & CHENGWU, 2001)
Coluna de Bolhas	Artificial	5.328	79	170	5,6 ^a	3,31	-	<i>Chaetoceros</i>	(KRICHNAVARUK <i>et al.</i> , 2007)
		37.000	8	1,9	0,9 - 1,0	-	20 - 25	<i>Phaeodactylum</i>	(BRINDLEY <i>et al.</i> , 2002)
	Sol	-	21	64	0,4 - 1,4	0,03 - 0,2	-	<i>Monodus</i>	(BOSMA <i>et al.</i> , 2007)
Airlift	Artificial	5.328	79	170	6,77 ^a	4,09	-	<i>Chaetoceros</i>	(KRICHNAVARUK <i>et al.</i> , 2007)
		1.480	10	3	1,77 ^a	0,8	-	<i>Haematococcus</i>	(KAEWPINTONG <i>et al.</i> , 2007)

^a Calculado a partir da concentração de biomassa (células.mL⁻¹) usando o valor de 2,228 g de peso seco para 1x10⁹ células (KAEWPINTONG *et al.*, 2007).

2.4.3. Comparativo entre os Sistemas Aberto e Fechado

A Tabela 6 mostra um comparativo entre os sistemas abertos e fechados para cultivo de microalgas, com relação a diversos aspectos (XU *et al.*, 2009).

Tabela 6. Comparação entre sistemas abertos e fechados para cultivo de microalgas (XU *et al.*, 2009).

	Sistemas abertos	Sistemas fechados
Risco de contaminação	Alto	Baixo
Perda de CO ₂	Alta	Baixa
Perdas por evaporação	Altas	Baixas
Eficiência do uso da luz	Pobre	Excelente
Razão área/volume	Baixa	Alta
Área requerida	Grande	Pequena
Controle de processo	Difícil	Fácil
Produtividade da biomassa	Baixa	Alta
Custo de investimento	Baixo	Alto
Custo de operação	Baixo	Alto
Custo de colheita	Alto	Relativamente baixo
Scale-up	Fácil	Difícil

Outro aspecto favorável para o cultivo de microalgas em sistemas fechados é que a qualidade da biomassa é bastante reprodutível, enquanto para sistemas abertos, é bastante variável (HARUN *et al.*, 2010).

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1. Microalga e Meio de Cultivo

Cepas das microalgas marinhas *Chlorella minutissima* e *Chlorella* sp. foram gentilmente cedidas pelo professor Sérgio Lourenço do Laboratório de Fisiologia e Cultivo de Algas do Departamento de Biologia Marinha da Universidade Federal Fluminense e estão sendo mantidas em banco de algas no Laboratório 117 do ICTA - UFRGS.

O meio de cultivo utilizado é o Guillard - "f1/2" (GUILLARD, 1975) contendo (por litro): 34 g de sal marinho (Red Sea), 75 mg de nitrato de sódio, 5 mg de fosfato de sódio, 30 mg de silicato de sódio, 1 mL de solução de metais-traço, 1 mL de solução de vitaminas e 1 mL de solução-tampão de pH. A solução de metais-traço contém (por litro): 9,8 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 22 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 180 mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 6,3 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4,36 g de Na_2EDTA e 3,15 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. A solução de vitaminas contém (por litro): 100 mg de tiamina, 0,5 mg de cianocobalamina e 0,5 mg de biotina. A solução tampão de pH serve para manter o pH entre 7,5 e 8,5 e foi feita com 50 g de tris, aproximadamente 30 mL de ácido clorídrico para ajustar o pH em valor de 7,1 a 7,3 e água destilada, sendo o volume total da solução de 200 mL. Para fazer o meio de cultivo foram preparadas soluções-estoque de acordo com LOURENÇO (2006). O meio de cultivo foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos. A solução de vitaminas foi esterilizada por microfiltração e adicionada após o resfriamento do meio de cultivo.

3.2. Banco de Algas

As microalgas recebidas em pipeta Pasteur de plástico lacradas no volume de 3 mL foram inoculadas em 50 mL de meio de cultivo estéril em frascos cônicos de 500 mL. Os frascos foram colocados em incubadora com agitação orbital com temperatura controlada de 30 °C e iluminação permanente através de uma lâmpada eletrônica de 30 Watts, correspondente a uma intensidade luminosa de aproximadamente 2.500 lx.

Após dez dias, 10 mL desses cultivos foram inoculados em 100 mL de meio estéril em frascos cônicos de 500 mL. A partir de então, os frascos de cultivo foram alocados no banco de algas.

O banco de algas é um local fechado com iluminação por lâmpada eletrônica de 30 Watts, correspondente a uma intensidade luminosa de aproximadamente 2.000 lx, com fotoperíodo de 12 horas (12:12 dia:noite). A temperatura no local é controlada em 20 °C.

Passado um mês, os cultivos foram renovados, ou seja, 10 mL do último cultivo foram transferidos para 100 mL de meio estéril em frascos cônicos de 250 mL, tornando-se respectivamente cultura-mãe e cultura-filha. As algas permaneceram no banco por três gerações, que corresponde ao tempo que as algas permaneceram como células ativas.

3.3. Testes Preliminares

A partir dos cultivos iniciais de 50 mL (descritos no primeiro parágrafo do item 3.2) também foram realizados testes preliminares em duplicata a fim de verificar o crescimento das algas. Da mesma forma que no banco, 10 mL desse cultivo foram inoculados em 100 mL de meio de cultivo estéril e colocados em incubadora com agitação orbital com temperatura controlada de 30 °C e iluminação permanente

através de uma lâmpada eletrônica de 30 Watts, correspondente a uma intensidade luminosa de 2.500 lx. O crescimento das algas foi monitorado através de leituras de densidade ótica da cultura a 570 nm (LOURENÇO, 2006) com espectrofotômetro Ultrospec 3100 Pro (Amersham Biosciences) de amostras retiradas dos cultivos em duplicata.

3.4. Pré-inóculo

Para inocular cada cultivo em reator, uma alíquota de 10 mL de algas da cultura-mãe do banco de cultivo foi inoculada em 100 mL de meio de cultivo estéril em frasco cônico de 500 mL, que foram colocados em incubadora com agitação orbital, temperatura controlada de 30 °C e iluminação permanente através de lâmpadas eletrônicas com intensidade luminosa de aproximadamente 5.800 lx. Após uma semana, mais 100 mL de meio de cultivo estéril foram adicionados. Depois de outra semana, os pré-inóculos puderam ser considerados prontos para serem utilizados.

3.5. Cultivos em Fotobiorreator

Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores de placa do tipo *airlift*, confeccionados em acrílico, com volume útil de 2,2 L, providos de camisa de aquecimento/resfriamento interna conectadas a banhos térmicos. Os reatores foram projetados e caracterizados quanto ao tempo de circulação, tempo de mistura, coeficiente de transferência de massa da fase líquida, coeficiente de troca térmica da camisa e coeficiente de perda de calor para o meio ambiente pelo próprio grupo de pesquisa (KOCHEM, 2010). A Figura 6 mostra a sua imagem 3D.

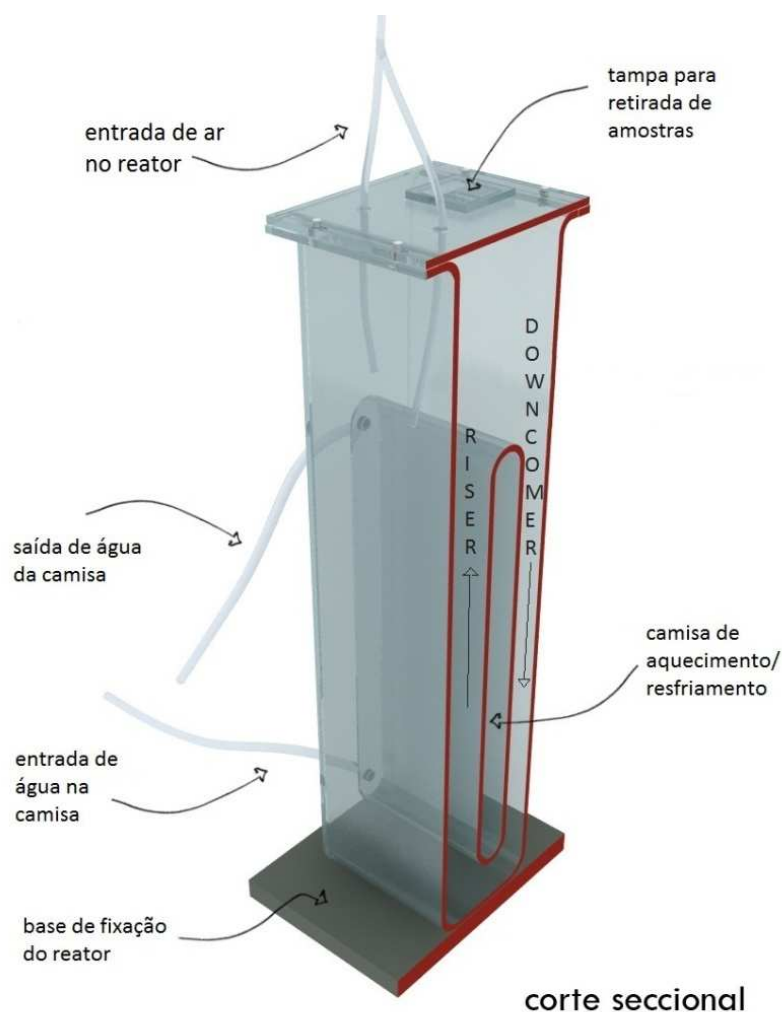


Figura 6. Imagem 3D do corte seccional do fotobiorreator.

A aeração foi realizada com vazão de $0,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ de ar comprimido filtrado com membrana de $0,22 \mu\text{m}$ Midisart[®] 2000 (Sartorius Stedim Biotech) utilizando-se duas pedras porosas conectadas em mangueiras inseridas pelo topo dos reatores até o fundo dos mesmos. As vazões de ar foram controladas utilizando rotômetros (Dwyer). A temperatura do fotobiorreator foi controlada através da passagem de água de banho termostático através da camisa de aquecimento/resfriamento.

Para realizar a limpeza/assepsia dos reatores, os mesmos foram totalmente preenchidos com água e 10 mL de solução comercial de hipoclorito de sódio (2,5 %). Após 15 minutos foram adicionados 2,5 mL de solução de tiosulfato de sódio 250

g.L^{-1} para realizar a neutralização do cloro. Depois de 2 horas, esta solução foi descartada e os reatores foram preenchidos com 2 litros de meio de cultivo “f1/2” estéril (ANDERSEN, 2005).

3.5.1. Estudo da Influência da Luz

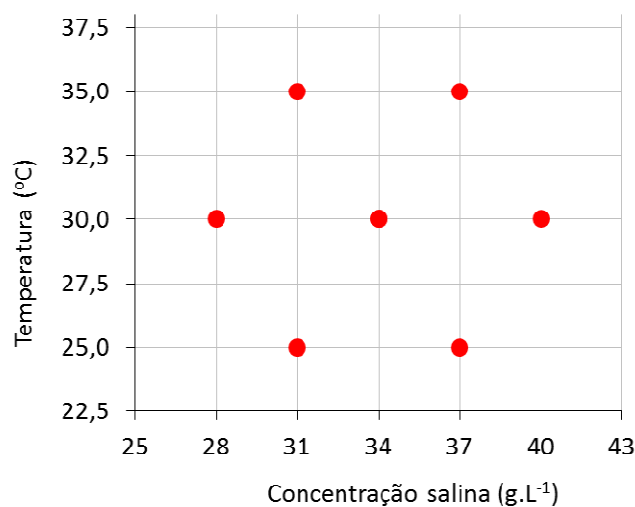
Oito fotobiorreatores foram distribuídos em duas prateleiras contendo cada uma, lâmpadas eletrônicas (12 × 13 W, luz branca, Tashibra). Cada prateleira foi dividida em duas partes por suportes de madeira, sendo que em cada parte foi ajustada a distância dos fotobiorreatores ao painel bem como a quantidade de lâmpadas que deveria ser ligada para promover as intensidades luminosas médias de 2.200 lx, 10.000 lx, 17.000 lx e 24.500 lx. Os cultivos foram feitos em duplicata, ou seja, para cada iluminação foram utilizados dois fotobiorreatores. A iluminação durante os cultivos ocorreu durante 24 horas.

3.5.2. Estudo da Influência da Concentração Salina e da Temperatura

A fim de determinar a influência das variáveis temperatura (T) e concentração salina (S) sobre o crescimento, produção de lipídeos e produção de pigmentos, foi utilizado um planejamento experimental para duas variáveis com arranjo hexagonal com pontos centrais conforme a Tabela 7 e a Figura 7. Os pontos 1 a 6 do planejamento foram realizados em duplicatas e o ponto 7 (ponto central) foi realizado 4 vezes, totalizando 16 ensaios divididos em 2 blocos (experimentos 1-6 e 2 pontos centrais cada). Os reatores receberam iluminação constante de 17.000 lx.

Tabela 7. Planejamento 2^2 hexagonal com pontos centrais.

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis reais	
	x_1	x_2	S (g.L ⁻¹)	T (°C)
1	1	0	40	30
2	0,5	0,866025	37	35
3	-0,5	0,866025	31	35
4	-1	0	28	30
5	-0,5	-0,866025	31	25
6	0,5	-0,866025	37	25
7	0	0	34	30

**Figura 7.** Desenho esquemático da distribuição de pontos de planejamento hexagonal utilizado.

Através da análise estatística dos dados dos experimentos, uma equação que representa o sistema estudado foi encontrada. Neste caso, uma equação polinomial quadrática, conforme a Equação 3.1.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1 x_1 + \beta_{22} x_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 \quad (3.1)$$

Onde x_1 e x_2 são as variáveis codificadas concentração salina e temperatura, respectivamente. O Y representa a variável dependente, no caso, a biomassa, a velocidade específica de crescimento máxima ou a taxa de biofixação de CO_2 . Os símbolos θ_0 , θ_1 , θ_2 , θ_{11} , θ_{22} e θ_{12} são os coeficientes de regressão do modelo.

3.6. Acompanhamento do Crescimento das Algas

A temperatura dos cultivos foi medida através de termômetros e a intensidade luminosa foi monitorada através de luxímetro digital MS6610 da Akso. O pH foi medido através de fita indicadora de pH Alkalit[®] da marca Merck, que mede na faixa de 7,5 a 14.

O crescimento das algas foi monitorado através de medida de densidade ótica da cultura a 570 nm (LOURENÇO, 2006) com espectrofotômetro Amersham Biosciences modelo Ultrospec 3100 Pro e relacionada com a biomassa (X) por medida de peso-seco.

Para medida de peso-seco, 10 mL de alga-mãe do banco de algas foram inoculados em 100 mL de meio de cultivo estéril em três frascos cônicos de 500 mL. Após seis dias, foram adicionados mais 100 mL de meio de cultivo estéril em cada frasco. Depois de outros cinco dias, o conteúdo dos três frascos foi agrupado e foram realizadas medidas de densidade ótica (OD) a 570 nm no espectrofotômetro com diferentes diluições. A cultura foi centrifugada em três tubos falcons previamente pesados a fim de encontrar o peso das algas. Para tal, inicialmente foram adicionados em cada tubo falcon 13 mL de cultura. Os tubos foram centrifugados por aproximadamente 15 minutos em centrífuga de mesa da marca Fanen modelo 204-NR e, após ocorrer a separação das algas e do meio de cultivo, o sobrenadante foi descartado e foi adicionada mais uma alíquota de 10 mL. O procedimento foi repetido até chegar a um total de 143 mL centrifugados em cada tubo. Os tubos falcons contendo as algas remanescentes das centrifugações foram

colocados em estufa a 75 °C. O peso dos tubos foi acompanhado diariamente até atingir um valor constante. A média dos três valores encontrados foi relacionada com as medidas de densidade ótica, conforme mostrado na Figura 8, de onde se obteve a Equação 3.2.

$$X \text{ (g.L}^{-1}\text{)} = 0,304 \times OD_{570 \text{ nm}} \quad (3.2)$$

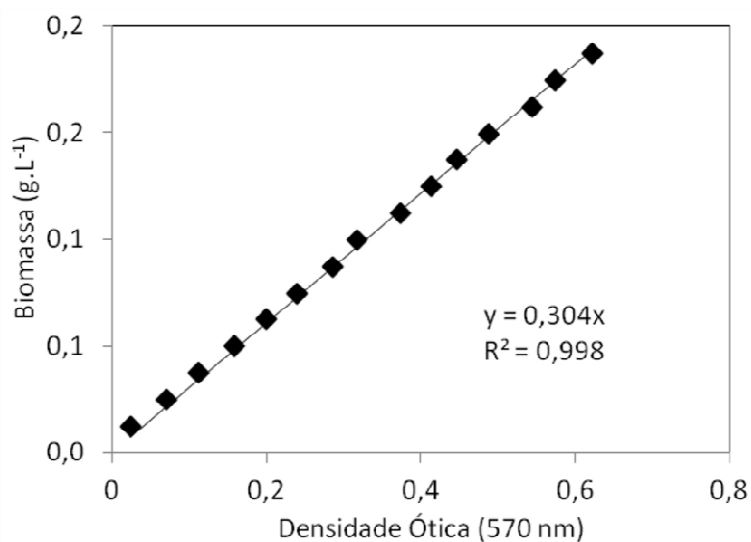


Figura 8. Relação de biomassa (g.L⁻¹) e densidade ótica a 570 nm.

3.7. Análises

Durante os cultivos, uma vez ao dia, foi retirada uma alíquota de 2 mL de microalgas e meio de cultivo. Essa alíquota foi centrifugada a 16000 × *g* durante 5 minutos e o sobrenadante foi descartado enquanto as microalgas precipitadas foram congeladas para posterior análise de pigmentos com solvente acetona.

No final do crescimento, todo o conteúdo dos fotobiorreatores foi centrifugado a fim de separar as algas do meio salino para análises de pigmentos por CLAE e de lipídeos por extrator Soxhlet e por cromatografia gasosa. As algas centrifugadas

foram liofilizadas.

3.7.1. Determinação de Carotenoides Totais

Dois (2) mL de acetona 90 % foram adicionados às amostras de microalgas coletadas diariamente e sedimentadas por centrifugação a $16.000 \times g$ durante 5 minutos. Os frascos com amostra e acetona foram colocados em local escuro à temperatura de 4 °C por 12 horas. Foram lidas as absorvâncias (*OD*) nos comprimentos de onda de 750 nm, 510 nm e 480 nm, sendo o caminho ótico do espectrofotômetro utilizado igual a 1 cm. As absorvâncias foram relacionadas à quantidade de carotenoides em $\mu\text{g.L}^{-1}$ (*C*) através da Equação 3.3 (STRICKLAND & PARSONS, 1968).

$$C = 7,6 \times OD_{480 \text{ nm}} - 3 \times OD_{750 \text{ nm}} - 1,49 \times OD_{510 \text{ nm}} - 2 \times OD_{750 \text{ nm}} \quad (3.3)$$

3.7.2. Identificação dos Carotenoides por CLAE

A extração de carotenoides foi preparada conforme metodologia de MERCADANTE & RODRIGUEZ-AMAYA (1998), específica para carotenoides.

Aproximadamente 0,01 g de algas liofilizadas de cada fotobiorreator foram pesadas em balança analítica em tubo de ensaio de vidro, hidratadas com 300 μL de água destilada por uma noite a 4 °C, depois foram congeladas por uma noite (ou mais) na tentativa de facilitar a extração dos pigmentos. Dois (2) mL de éter de petróleo, 1 mL de éter etílico e 1 mL de metanol foram adicionados ao tubo. A amostra hidratada e com solventes foi homogeneizada em vórtex e colocada em um banho de ultra-som, também para auxiliar na extração de todos os pigmentos do produto liofilizado, transferindo-os para os solventes.

O tubo de ensaio foi então centrifugado por 15 minutos a $2000 \times g$ e $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi recolhido com o auxílio de uma pipeta Pasteur para frasco âmbar. As etapas de adição de solventes, homogeneização em vórtex, banho de ultra-som e centrifugação foram repetidas até que não se verificasse mais a presença de pigmentos na amostra, marcada pela coloração final esbranquiçada da mesma.

Solução de NaOH 20 % em metanol foi adicionada ao frasco âmbar no mesmo volume total de solventes utilizados na extração, para promover a reação de saponificação do extrato. O frasco âmbar foi colocado em local ao abrigo da luz à temperatura ambiente e lá permaneceu por uma noite para reagir completamente.

No dia seguinte, todo o conteúdo do frasco âmbar foi transferido para um funil de separação contendo aproximadamente 500 mL de água destilada. Após foram adicionados aproximadamente 50 mL de éter de petróleo e 50 mL de éter etílico. Aguardou-se a separação das fases. A fase aquosa foi removida e água destilada novamente foi adicionada ao funil. Esse procedimento se repetiu até que o pH da água de lavagem atingisse um pH neutro. A fase orgânica então foi coletada em um frasco tipo erlenmeyer e sulfato de sódio anidro foi adicionado com a finalidade de eliminar possíveis resíduos de água. Por fim, o extrato foi transferido para balão de vidro para secagem do solvente à vácuo em evaporador rotatório a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Éter etílico foi adicionado ao balão no mínimo volume necessário para dissolver os pigmentos e transferir para frasco âmbar. Nitrogênio a uma baixa vazão foi utilizado para secar o éter etílico no frasco. O frasco com os pigmentos foi armazenado a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para análise de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), foi utilizada coluna de fase reversa C30 YCM. Como fase móvel, foi utilizado um gradiente constituído de água/metanol/éter tert-metil-butílico (MTBE) conforme mostrado na Tabela 8.

Imediatamente antes da injeção da amostra no CLAE, a mesma foi descongelada. Solvente MTBE foi adicionado ao frasco âmbar, que foi colocado em banho de ultra-som durante 5 minutos. A amostra foi transferida para uma seringa

e filtrada com membrana de 0,45 μm para solventes orgânicos (Millipore Indústria e Comércio Ltda.) para tubo de injeção no CLAE.

Estudos previamente realizados no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS serviram para a identificação dos tempos de retenção para os pigmentos Luteína (18 minutos), Zeaxantina (21 minutos) e β -Caroteno (42 minutos) notadamente presentes em microalgas. Foram geradas curvas de calibração a partir de padrões comerciais destes pigmentos, relacionando a área do pico obtido no cromatograma com a concentração da amostra injetada, que foram utilizadas para determinar a concentração desses pigmentos nas amostras analisadas.

Tabela 8. Gradiente utilizado como fase móvel na coluna de fase reversa C30 (ZANATTA, 2007).

Tempo (min)	Água (%)	Metanol (%)	MTBE (%)
0	5	90	5
12	0	95	5
25	0	89	11
40	0	75	25
60	0	50	50

3.7.3. Determinação de Lipídeos Totais

A análise de lipídeos totais foi realizada através de equipamento Soxhlet (Foss / Soxtec 2055™). Nesta metodologia, a amostra sólida é colocada em um cartucho composto por membrana que permite a permeação de vapor. Um solvente orgânico é disposto abaixo do cartucho e aquecido de forma a ser vaporizado e carregar consigo, na passagem pela amostra sólida, os lipídeos ali presentes. O equipamento é dotado de uma serpentina de resfriamento com a finalidade de condensar o vapor rico em lipídeos, retornando este condensado ao frasco de solventes para o solvente ser aquecido e vaporizado novamente.

Foram realizados três ciclos de extração a 135 °C com duração de 70 minutos, utilizando a cada ciclo 100 mL de éter de petróleo para amostras de algas liofilizadas de aproximadamente 0,10 g pesadas em balança analítica dentro do cartucho do equipamento.

Os copos de solvente foram inicialmente secos em estufa, permaneceram por 30 minutos dentro de dessecador e após foram pesados em balança analítica. No final da extração, os copos foram novamente colocados em estufa por 15 minutos, colocados 30 minutos no dessecador e pesados em balança analítica. A diferença encontrada entre o peso final e inicial dos copos de solvente foi referente ao conteúdo lipídico presente na amostra.

3.7.4. Cálculo da Taxa de Fixação de Gás Carbônico

A taxa de biofixação de carbono foi calculada considerando que a biomassa possui 45 % de carbono (SYDNEY *et al.*, 2010).

Depois de calculado o teor de carbono em cada ponto de medição do cultivo, foi calculada a derivada do teor de carbono com relação ao tempo, considerando-se, para cada ponto, o ponto anterior e posterior. Para calcular a fixação de gás carbônico, considerou-se a relação entre a massa molecular do carbono e a do gás carbônico.

3.7.5. Cálculo da Velocidade Específica de Crescimento

A velocidade específica de crescimento foi calculada na fase exponencial, fase em que o microrganismo cresce com velocidade máxima e constante ($\mu_{m\acute{a}x}$), diretamente proporcional à concentração de biomassa X , conforme Equação 3.4 (DORAN, 1995).

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{m\acute{a}x} \times X \quad (3.4)$$

Onde:

X = concentração de biomassa (g.L^{-1})

$\mu_{m\acute{a}x}$ = velocidade específica de crescimento máxima (h^{-1})

3.7.5. Cálculo da Produtividade

A produtividade foi calculada através da razão entre a concentração de biomassa obtida e a duração do cultivo em horas. Para tal cálculo, desconsiderou-se a biomassa presente no início do cultivo, ou seja, logo após a inoculação.

3.8. Análise Estatística

A análise dos dados foi realizada através de regressão linear múltipla, teste de Tukey e análise de variância pelo software Statistica 7.

3.9. Reagentes

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

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4.1. Escolha da microalga

Um teste preliminar em incubadora com agitação orbital foi realizado para comparar o crescimento das espécies *Chlorella sp.* e *Chlorella minutissima*. Pela Figura 9 é possível perceber que a microalga *C. minutissima* atingiu valores de densidade ótica mais elevados do que a *Chlorella sp.*. Portanto, a microalga *C. minutissima* foi utilizada para seguir os cultivos em fotobiorreator.

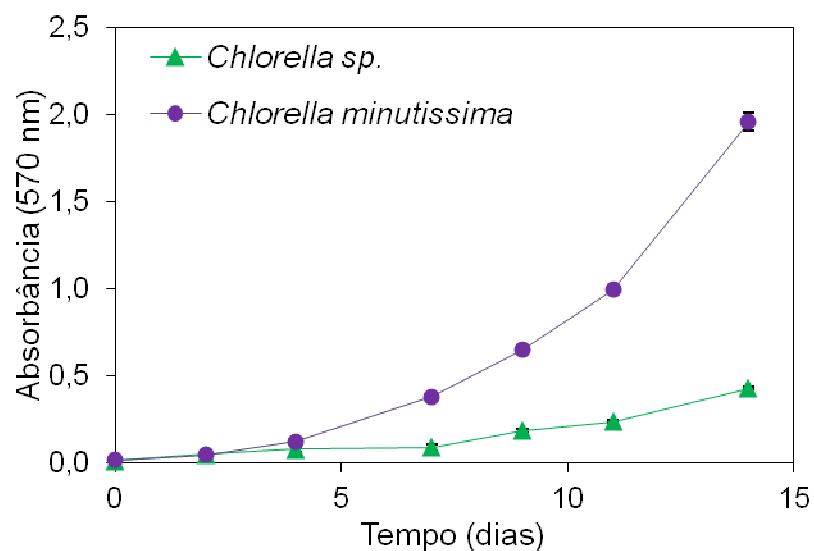


Figura 9. Densidade ótica a 570 nm média de dois cultivos em incubadora com agitação orbital de *Chlorella sp.* e *C. minutissima* em função do tempo.

4.2. Cultivos em Fotobiorreator

4.2.1. Estudo da Influência da Luz

As curvas de crescimento médias de dois cultivos de *C. minutissima* estão apresentadas na Figura 10. Todos os cultivos de *C. minutissima* apresentaram fase exponencial de crescimento entre as horas 35 e 80 de cultivo, independente da iluminação recebida (Figura 11).

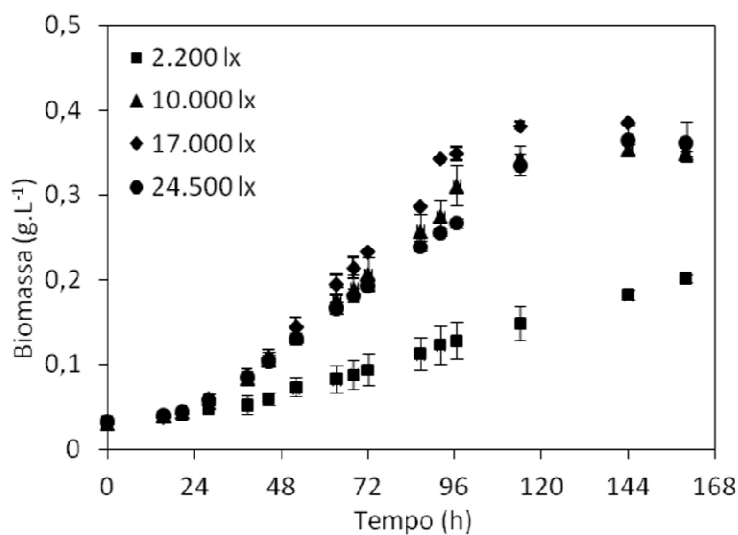


Figura 10. Curvas de crescimento médias de dois cultivos de *C. minutissima* em fotobiorreator sob luminosidades de 2.200 lx, 10.000 lx, 17.000 lx e 24.500 lx.

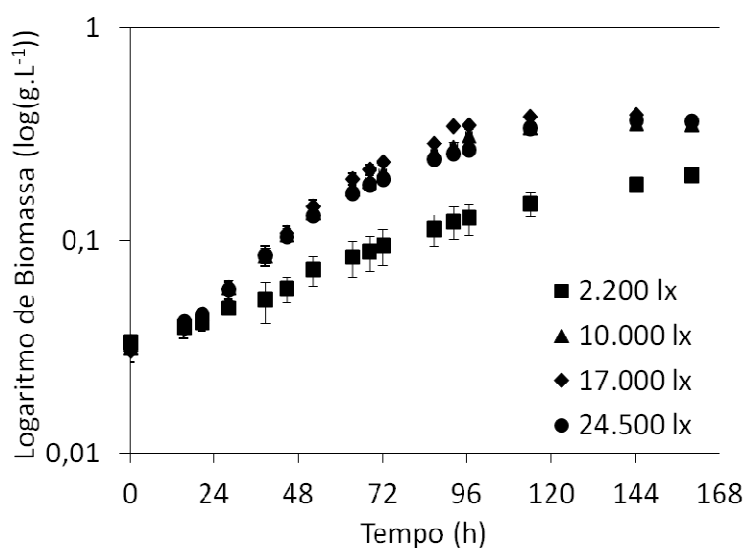


Figura 11. Curvas de crescimento médias de dois cultivos de *C. minutissima* em fotobiorreator sob luminosidades de 2.200 lx, 10.000 lx, 17.000 lx e 24.500 lx em escala logarítmica.

Os resultados de máxima biomassa obtida, produtividade e velocidade específica máxima de crescimento, calculada na fase exponencial de crescimento, estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Resultados de biomassa, velocidade específica máxima de crescimento e produtividade para os cultivos de *C. minutissima* em fotobiorreatores sob iluminações de 2.200, 10.000, 17.000 e 24.500 lx.

Iluminação (lx)	Biomassa (g.L ⁻¹)	Velocidade Específica Máxima de Crescimento (d ⁻¹)	Produtividade (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)
2.200	0,23 ± 0,01 ^a	0,41 ± 0,01 ^a	0,026 ± 0,001 ^a
10.000	0,35 ± 0,01 ^b	0,63 ± 0,02 ^b	0,048 ± 0,001 ^b
17.000	0,39 ± 0,00 ^b	0,72 ± 0,05 ^b	0,053 ± 0,001 ^b
24.500	0,37 ± 0,02 ^b	0,58 ± 0,03 ^b	0,050 ± 0,003 ^b

Letras iguais mostram resultados que não tem diferença significativa entre si.

A análise estatística dos dados experimentais mostrou que a iluminação possui influência significativa na produção de biomassa ($p = 0,000346$), na velocidade

específica máxima de crescimento ($p = 0,003298$) e na produtividade de biomassa ($p = 0,000203$).

A comparação das médias através do teste Tukey mostrou que os valores de biomassa, velocidade específica máxima de crescimento e produtividade obtidos com as iluminações de 10.000, 17.000 e 24.500 lx não diferem entre si, enquanto os valores obtidos com iluminação de 2.200 lx são significativamente menores que os demais.

Os cultivos que receberam iluminação de 17.000 lx atingiram maior biomassa com uma velocidade de crescimento mais elevada, equivalentes a $0,39 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,72 \text{ d}^{-1}$, respectivamente, enquanto os que receberam iluminação de 2.200 lx apresentaram os resultados inferiores, tanto de biomassa quanto de velocidade específica de crescimento máxima, equivalentes a $0,23 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,41 \text{ d}^{-1}$.

A produtividade máxima atingida foi $0,053 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ nos cultivos iluminados com 17.000 lx, estando bastante próxima dos resultados dos cultivos com iluminação de 10.000 lx e 24.500 lx, respectivamente, $0,048 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e $0,050 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, porém sendo bastante superior à produtividade atingida pelos cultivos que receberam iluminação de 2.200 lx, igual a $0,025 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$.

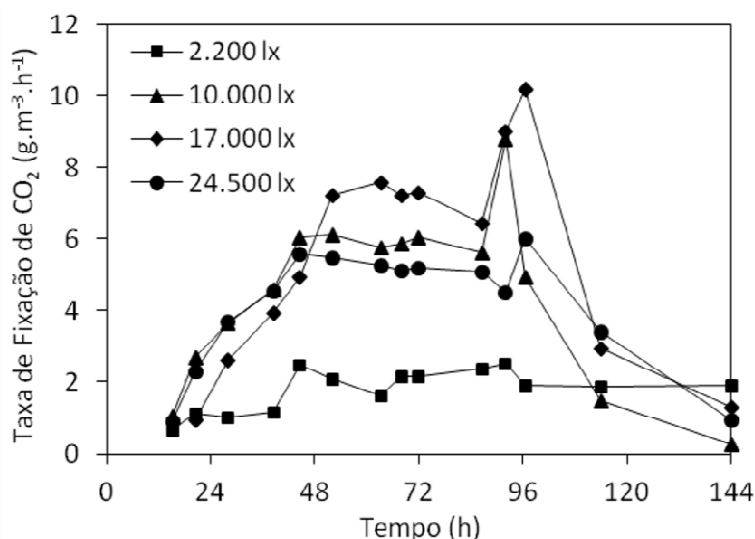


Figura 12. Taxa de fixação de CO₂ em função do tempo em cultivos de *C. minutissima* em fotobiorreatores sob luminosidades de 2.200 lx, 10.000 lx, 17.000 lx e 24.500 lx.

Com relação à taxa de fixação de gás carbônico (Figura 12), os cultivos que receberam iluminação de 2.200 lx fixaram em torno de $2 \text{ gCO}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ a partir da hora 48. Os que receberam entre 10.000 lx e 24.500 lx tiveram perfis semelhantes, iniciando com uma elevação, seguido de um patamar entre as horas 40 e 70, tendo-se observado um pico de fixação de CO₂ em torno de 96 horas e depois reduzindo, sendo que a iluminação que atingiu uma taxa de fixação de gás carbônico superior, por volta de $8 \text{ gCO}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ no patamar, foi a de 17.000 lx. A análise de variância com os dados da taxa de fixação de CO₂ na hora 72 do cultivo mostrou que a iluminação possui influência significativa na taxa de fixação de CO₂ ($p = 0,004734$). Foi realizada comparação das médias por teste de Tukey, sendo possível perceber que o valor obtido através da iluminação de 2.200 lx difere dos valores obtidos através das iluminações de 10.000, 17.000 e 24.500 lx, sendo que entre esses não há diferença significativa.

O percentual de lipídeos na biomassa está apresentado na Figura 13.

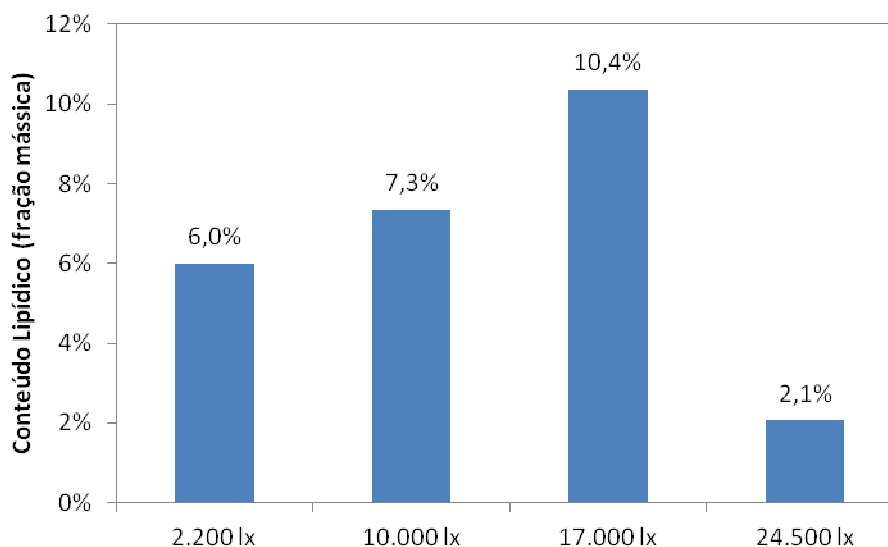


Figura 13. Resultado da análise de lipídeos totais contidos nas microalgas *C. minutissima* cultivadas em fotobiorreatores com diferentes luminosidades.

Os cultivos que receberam iluminação de 17.000 lx produziram mais lipídeos em porcentagem de biomassa do que os que receberam as demais iluminações, sendo o equivalente a 10,4 %.

Em virtude da iluminação de 17.000 lx apresentar os resultados numéricos mais elevados de biomassa, produtividade de biomassa, velocidade específica de crescimento máxima, taxa de fixação de CO₂ e porcentual de lipídeos na biomassa, esta foi escolhida para seguir os testes de influência da temperatura e da concentração salina do meio de cultivo em fotobiorreatores.

Os resultados obtidos através deste teste de iluminação estão de acordo com o resultado apresentado por DEGEN *et al.* (2001), que em cultivos de *Chlorella* a 22 °C, testaram iluminações de até 29.600 lx e encontraram o ponto de saturação da luz em 18.500 lx. Também estão de acordo com os resultados de MESECK *et al.* (2005), que testaram a influência da intensidade luminosa em cultivos de *Tetraselmi chui* utilizando luminosidades na faixa de 5.000 lx a 16.500 lx e obtiveram como resultado que quanto maior a intensidade da luz, maior a biomassa atingida.

Há relatos na literatura de grupos de pesquisa que utilizaram iluminações mais elevadas em fotobiorreatores e obtiveram bons resultados, como é o caso de FERNANDEZ *et al.* (2001), que em fotobiorreator tubular cultivaram a microalga *Phaeodactylum* com iluminação solar de aproximadamente 95.000 lx chegando a uma concentração de biomassa de 2,38 g.L⁻¹ e produtividade de biomassa de 1,19 g.L⁻¹.d⁻¹. HALL *et al.* (2003) também utilizaram fotobiorreator tubular para cultivar a mesma microalga com iluminação solar na faixa de 84.000 lx, atingindo biomassa de 3,03 g.L⁻¹ e produtividade de biomassa de 1,38 g.L⁻¹.d⁻¹. Já MEISER *et al.* (2004) cultivaram a microalga *Phaeodactylum* em fotobiorreator de placa plana em luz solar com luminosidade de 74.000 lx e obtiveram 7,3 g.L⁻¹ de biomassa e produtividade de biomassa de 1,38 g.L⁻¹.d⁻¹. Os grupos de pesquisa citados utilizaram injeção de CO₂ para controlar o pH dos cultivos na faixa de valores de 7,4 a 7,7.

O pH dos cultivos em todos os experimentos ficou entre 7,5 e 8,5, partindo de 7,5 no início do cultivo, sofrendo uma elevação até 8,5 em torno da hora 50 e novamente acidificando no final do cultivo.

4.2.2. Estudo da Influência da Concentração Salina e da Temperatura

As curvas de crescimento das médias dos cultivos de *C. minutissima* realizados em fotobiorreator estão apresentadas na Figura 14 com as respectivas condições de temperatura e de concentração salina utilizadas.

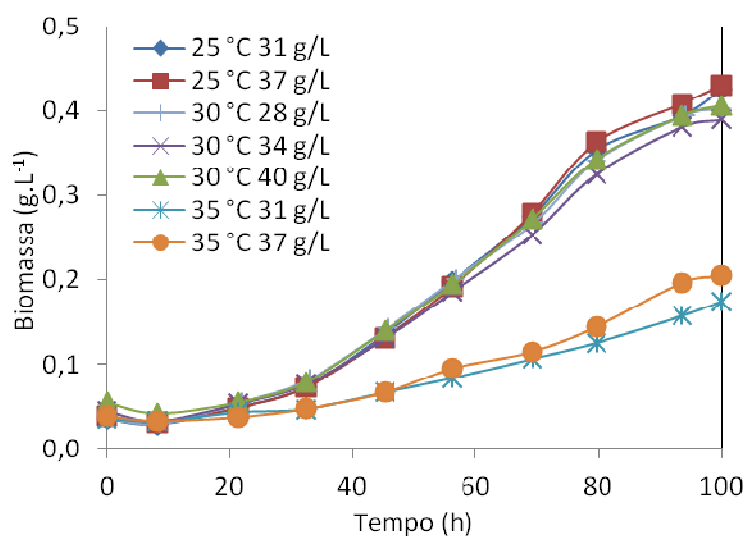


Figura 14. Curvas de crescimento dos cultivos de *C. minutissima* em fotobiorreator sob diferentes condições de concentração salina e temperatura.

Todos os cultivos de *C. minutissima* apresentaram fase exponencial de crescimento entre as horas 30 e 80 de cultivo, independente das condições de temperatura e concentração salina do meio de cultivo (Figura 15).

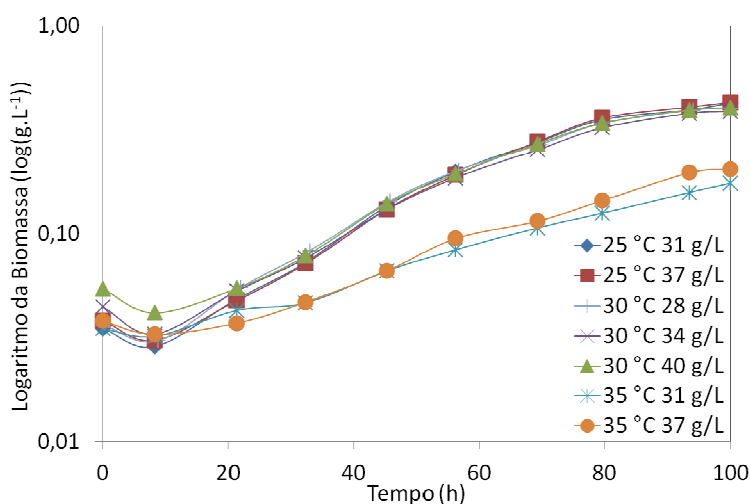


Figura 15. Curvas de crescimento dos cultivos de *C. minutissima* em fotobiorreator sob diferentes condições de concentração salina e temperatura em escala logarítmica.

Os resultados de máxima biomassa obtida, produtividade de biomassa e velocidade específica máxima de crescimento, calculada na fase exponencial de crescimento, estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Resultados de biomassa, velocidade específica máxima de crescimento e produtividade para cultivos de *C. minutissima* em fotobiorreator em diferentes condições de temperatura e concentração salina.

Temperatura (°C)	Concentração salina (g.L ⁻¹)	Biomassa (g.L ⁻¹)	Velocidade Específica Máxima de Crescimento (d ⁻¹)	Produtividade (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)
25	31	0,43 ± 0,03	0,79 ± 0,06	0,094 ± 0,005
25	37	0,43 ± 0,03	0,81 ± 0,05	0,094 ± 0,004
30	28	0,40 ± 0,03	0,70 ± 0,02	0,088 ± 0,006
30	34	0,39 ± 0,04	0,73 ± 0,04	0,083 ± 0,005
30	40	0,41 ± 0,03	0,74 ± 0,08	0,084 ± 0,003
35	31	0,17 ± 0,01	0,51 ± 0,08	0,033 ± 0,006
35	37	0,21 ± 0,02	0,58 ± 0,10	0,041 ± 0,005

A fim de determinar a equação polinomial quadrática (Equação 3.1) que representa o sistema estudado, foi feita uma análise estatística dos dados experimentais. Os coeficientes de regressão das variáveis codificadas e os parâmetros da regressão para biomassa, velocidade de crescimento e produtividade de *C. minutissima* estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Tabela de valores dos coeficientes de regressão das variáveis codificadas e dos parâmetros da regressão para biomassa, velocidade de crescimento e produtividade de *C. minutissima* em fotobiorreator.

	Biomassa		Velocidade de Crescimento		Produtividade de biomassa	
	Coeficiente	<i>p</i>	Coeficiente	<i>p</i>	Coeficiente	<i>p</i>
β_0	-2,067	0,0002	-0,4340	0,0004	-	-
β_1	-	-	-	-	0,00483	0,0295
β_{11}	-	-	-	-	-	-
β_2	0,1880	< 0,0001	0,0403	< 0,0001	0,0992	0,0143
β_{22}	-0,003528	< 0,0001	-0,0008	< 0,0001	-0,00209	0,0037
β_{12}	-	-	-	-	-	-
blocos	-	0,0039	-	0,560	-	0,0001
Regressão						
valor- <i>p</i>	< 0,0001		< 0,0001		< 0,0001	
F	108,68		55,63		103,96	
R ²	0,9645		0,9529		0,9630	
Valor- <i>p</i> da falta de ajuste	0,7864		0,4853		0,6646	

Foi observado que, para produção de biomassa, a temperatura possui influência significativa, tanto linear quanto quadrática, porém a concentração salina do meio de cultivo não. O modelo para a produção de biomassa se mostrou altamente significativo ($p < 0,0001$), com um R² elevado (0,9645) e com um bom ajuste, sendo o valor-*p* da falta de ajuste igual a 0,7864.

Para a velocidade de crescimento, a temperatura se mostrou significativa, com influência linear e quadrática, e a concentração salina mostrou ter influência significativa linear. O modelo foi considerado significativo ($p < 0,0001$), com um R² elevado (0,9530) e com um bom ajuste, sendo o valor-*p* da falta de ajuste igual a 0,4853.

A temperatura possui influência significativa, tanto linear quanto quadrática, para produtividade de biomassa, mas a concentração salina do meio de cultivo não. O modelo para a produtividade de biomassa se mostrou altamente significativo ($p <$

0,0001), com um R^2 elevado (0,9645) e com um bom ajuste, sendo o valor- p da falta de ajuste igual a 0,6646.

Para melhor visualização do efeito das variáveis independentes temperatura e concentração salina nas variáveis dependentes biomassa, velocidade específica de crescimento e produtividade, foram construídas as superfícies de resposta apresentadas na Figura 16, na Figura 17 e na Figura 18.

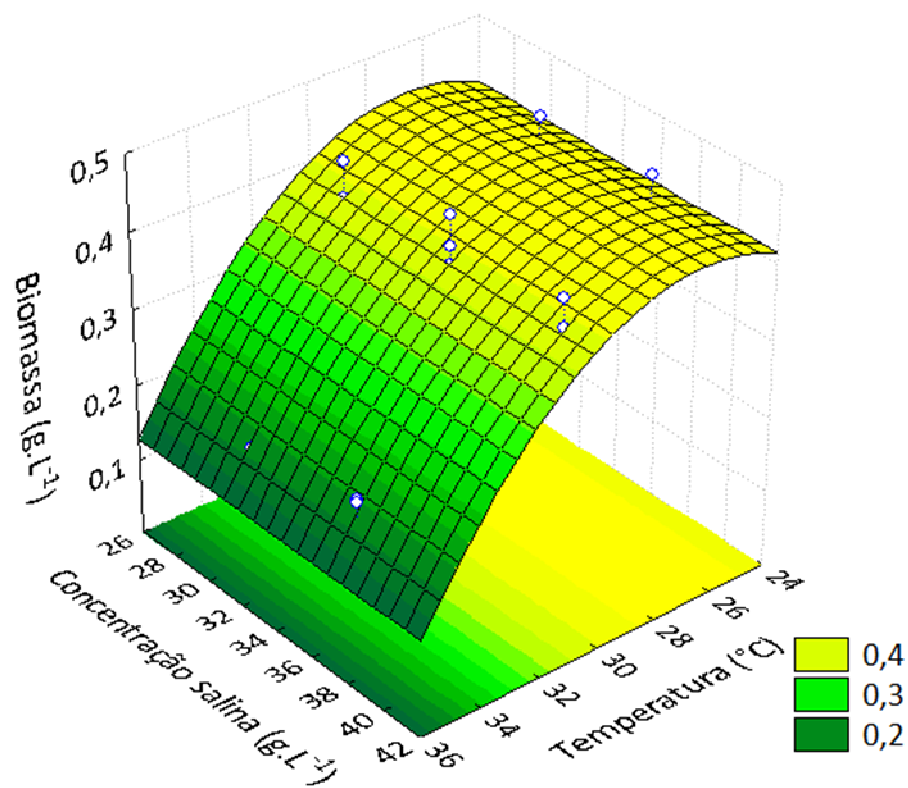


Figura 16. Superfície de resposta da biomassa de *C. minutissima* em função da temperatura e da concentração salina do meio de cultivo em fotobiorreator.

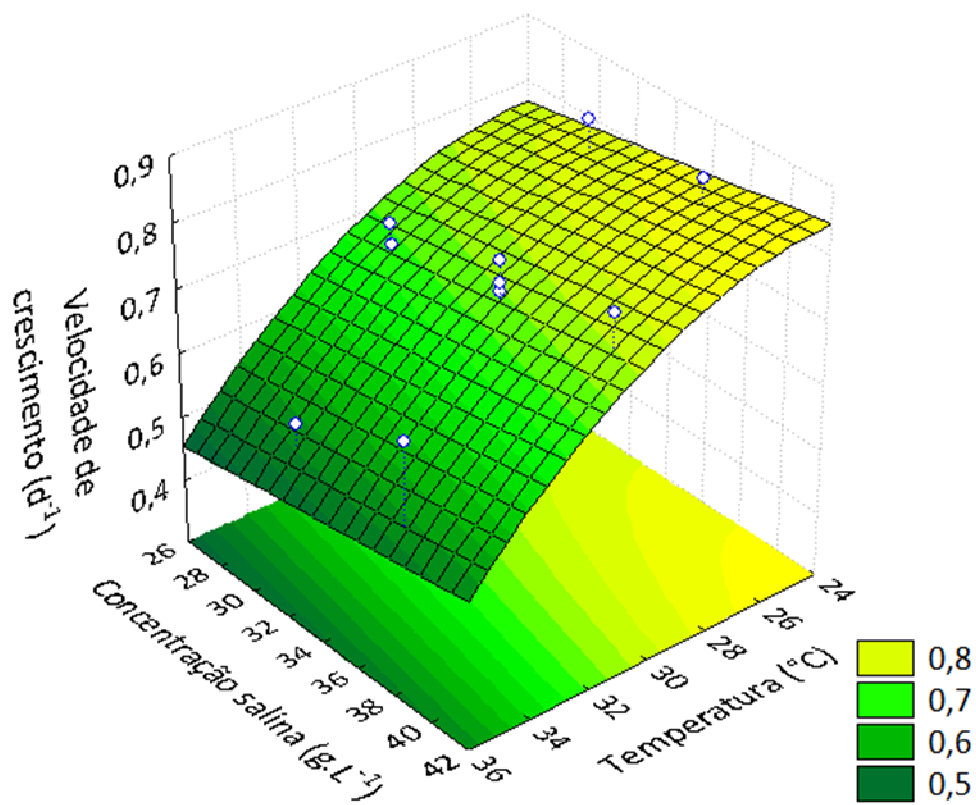


Figura 17. Superfície de resposta da velocidade específica de crescimento de *C. minutissima* em função da temperatura e da concentração salina do meio de cultivo em fotobiorreator.

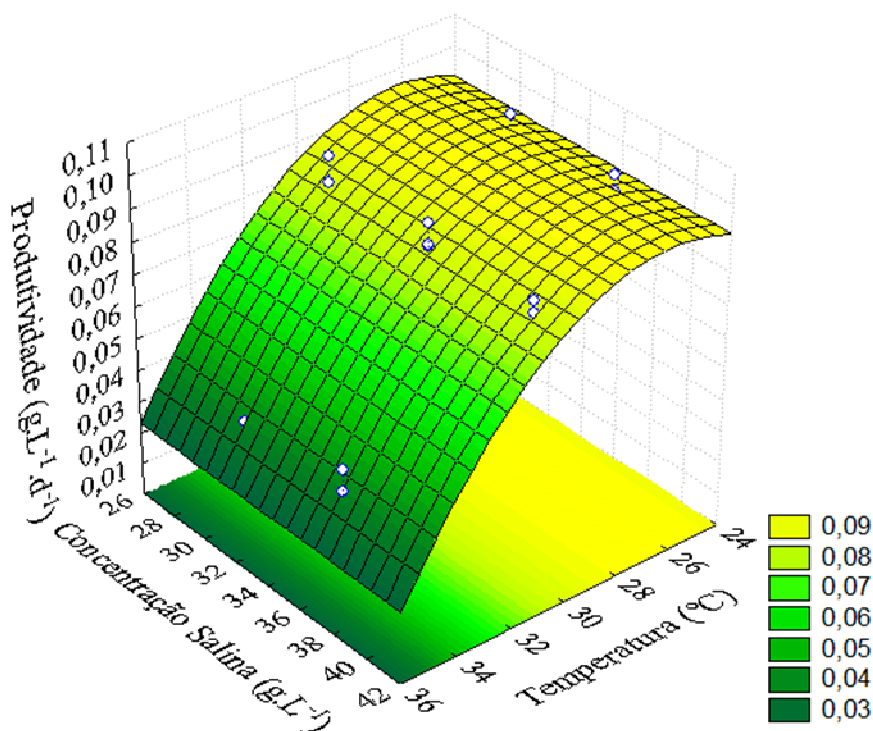


Figura 18. Superfície de resposta da produtividade de biomassa de *C. minutissima* em função da temperatura e da concentração salina do meio de cultivo em fotobiorreator.

Através da Figura 16 é possível observar que quanto menor a temperatura, maior a produção de biomassa. Após 100 horas de cultivos nas temperaturas de 25 °C e 30 °C foi obtida biomassa de aproximadamente 0,4 g.L⁻¹ enquanto que a 35 °C a biomassa atingida foi em torno de 0,2 g.L⁻¹. Na literatura, foram encontrados autores que obtiveram biomassas de microalgas mais elevadas, como é o caso de BORGHETTI (2009), que cultivou *C. minutissima* de forma mixotrófica utilizando resíduo agroindustrial a 30 °C e atingiu biomassa de 2,790 g.L⁻¹. Também foi encontrado resultado superior em cultivo de *C. minutissima*, igual a 8,3 g.L⁻¹, em condições mixotróficas em fotobiorreator com sistema de reciclo de células realizado por OH *et al.*(2010).

Já com outras microalgas cultivadas em fotobiorreatores, os resultados encontrados são bastante diversos. BOSMA *et al.* (2007) obtiveram biomassa de

Monodus entre 0,4 e 1,4 g.L⁻¹ em fotobiorreator coluna de bolhas utilizando luz solar, ar enriquecido com CO₂ e meio mineral com 1 % de agar. CONVERTI *et al.* (2006), em cultivo fotoautotrófico em fotobiorreator tubular com iluminação artificial, obtiveram 10,6 g.L⁻¹ de biomassa de *Spirulina* (aeração com ar comprimido e ajuste de pH para 9,5 através de adição de CO₂). Em fotobiorreator placa plana com iluminação solar, RICHMOND & CHENG-WU (2001), obtiveram biomassa de 2,6 g.L⁻¹ da microalga *Nannochloropsis* em condições fotoheterotróficas e controle de pH entre 7 e 8 através de injeção de ar comprimido com 1,5 % de CO₂. Em fotobiorreator *airlift* com meio de cultivo mineral, ar comprimido e iluminação artificial, KRICHNAVARUK *et al.* (2007) obtiveram 6,59 g.L⁻¹ de biomassa de *Chaetoceros*.

A Figura 17 mostra que quanto maior a concentração salina e menor a temperatura, maior é a velocidade específica de crescimento. A velocidade máxima obtida neste trabalho foi 0,81 d⁻¹ na condição de temperatura 25 °C e concentração salina 37 g.L⁻¹. MEHLITZ (2009), cultivando *Chlorella* em meio mineral com ar suplementado com CO₂ (controle de pH para 7,2) a aproximadamente 30 °C, obteve máxima velocidade de crescimento de 1,44 d⁻¹. BORGHETTI (2009), nas mesmas condições citadas anteriormente, atingiu velocidade específica de crescimento de 0,397 d⁻¹. Já DEGEN *et al.* (2001) conseguiram obter uma velocidade específica de crescimento máxima equivalente a 1,92 d⁻¹ utilizando cultivos fotoautotróficos de *Chlorella* a 22 °C com iluminação de 18.500 lx e ar comprimido.

A Figura 18 mostra que quanto menor a temperatura, maior a produtividade de biomassa. As máximas produtividades de biomassa obtidas foram de 0,094 g.L⁻¹.d⁻¹ nos cultivos a 25 °C. Foram encontrados na literatura resultados semelhantes, por CHIU *et al.* (2008), que obtiveram produtividade de biomassa de *Chlorella* sp. equivalente a 0,091 g.L⁻¹.d⁻¹ a 26 °C, e também resultados inferiores, por SCRAGG *et al.* (2002) que obtiveram produtividades de biomassa de *Chlorella vulgaris*, cultivadas a 25 °C, nos valores de 0,024 e 0,040 g.L⁻¹.d⁻¹, sendo que ambos grupos de pesquisa utilizaram aeração com ar sem suplementação de gás carbônico.

Já com uso de CO₂ para suplementar o ar utilizado nos cultivos, foram encontrados resultados superiores aos obtidos neste trabalho, como é o caso de CHIU *et al.* (2008), que em cultivo de *Chlorella* sp. a 26 °C obtiveram produtividades de 0,528, 0,491, 0,458 e 0,369 g.L⁻¹.d⁻¹ para as condições de aeração de 2 %, 5 %, 10 % e 15 %, respectivamente. YOO *et al.* (2010), obtiveram produtividade de 0,105 g.L⁻¹.d⁻¹ utilizando a microalga *C. vulgaris* a 25 °C com suplementação de 10 % de CO₂.

Outra alternativa para aeração é o uso de gás de combustão. DOUSKOVA *et al.* (2009) obtiveram uma produtividade bastante elevada, no valor de 2,5 g.L⁻¹.d⁻¹, utilizando gás de combustão contendo entre 10 % e 13 % de CO₂ e 8 % a 10 % de O₂, sendo esta produtividade superior à do cultivo controle (1,7 g.L⁻¹.d⁻¹) realizado com ar suplementado com 11 % de CO₂.

LI *et al.* (2011) obtiveram produtividade de biomassa superior às obtidas no presente trabalho, equivalente a 1,78 g.L⁻¹.d⁻¹, utilizando suplementação de carbono, nitrogênio e fósforo no meio de cultivo, em cultivo denominado fotoheterotrófico de *C. minutissima*.

A taxa de fixação de CO₂ em função do tempo está apresentada na Figura 19. Os cultivos realizados nas temperaturas de 25 °C e 30 °C apresentaram fixação em perfil parabólico, elevando-se até um máximo por volta da hora 70 e decrescendo em seguida. Os valores máximos atingidos foram entre 10 e 12 gCO₂.m⁻³.h⁻¹. Já para os cultivos na temperatura de 35 °C a taxa de fixação de CO₂ elevou-se do início ao fim do cultivo, atingindo valores máximos entre 4,0 e 5,5 gCO₂.m⁻³.h⁻¹.

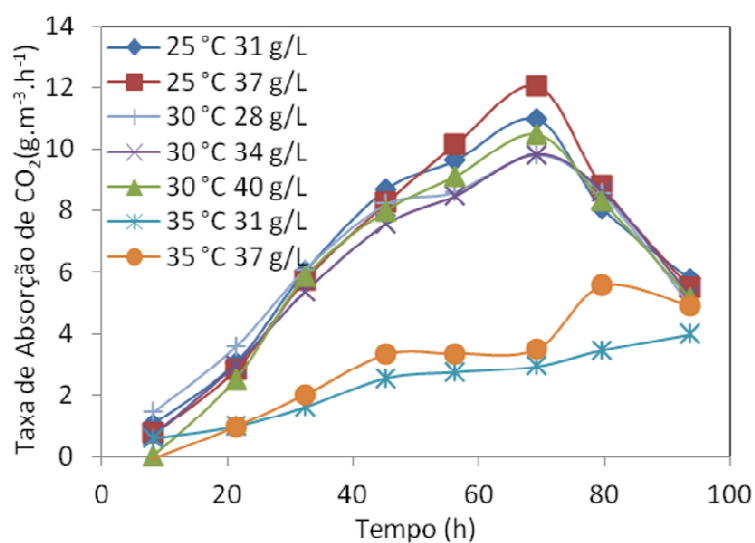


Figura 19. Taxa de fixação de CO₂ em função do tempo em cultivos de *C. minutissima* em fotobiorreatores sob diferentes condições de temperatura e concentração salina do meio de cultivo.

Para determinar a regressão para a taxa de fixação de CO₂ pela microalga *C. minutissima* em fotobiorreator, foi realizada análise estatística dos dados experimentais de biofixação na hora 70 do cultivo. Os coeficientes de regressão das variáveis codificadas e os parâmetros da regressão estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Tabela de valores dos coeficientes de regressão das variáveis codificadas e dos parâmetros da regressão para taxa de fixação de CO₂ pela microalga *C. minutissima* em fotobiorreator.

	Biofixação de CO ₂	
	Coeficiente	<i>p</i>
β_0	-59,6143	0,0129
β_1	-	-
β_{11}	-	-
β_2	5,4734	0,0018
β_{22}	-0,1051	0,0006
β_{12}	-	-
blocos	-	0,0203
Regressão		
valor- <i>p</i>	< 0,0001	
F	44,82	
R ²	0,9181	
Valor- <i>p</i> da falta de ajuste	0,8407	

Foi observado que, para taxa de fixação de CO₂, o modelo se mostrou altamente significativo ($p < 0,0001$), com um R² elevado (0,9181) e com um bom ajuste, sendo o valor-*p* da falta de ajuste igual a 0,8407.

Para melhor visualização do efeito das variáveis independentes, foi construída uma superfície de resposta (Figura 20) para a taxa de fixação de CO₂ na hora 70 em função da temperatura e concentração salina do meio de cultivo.

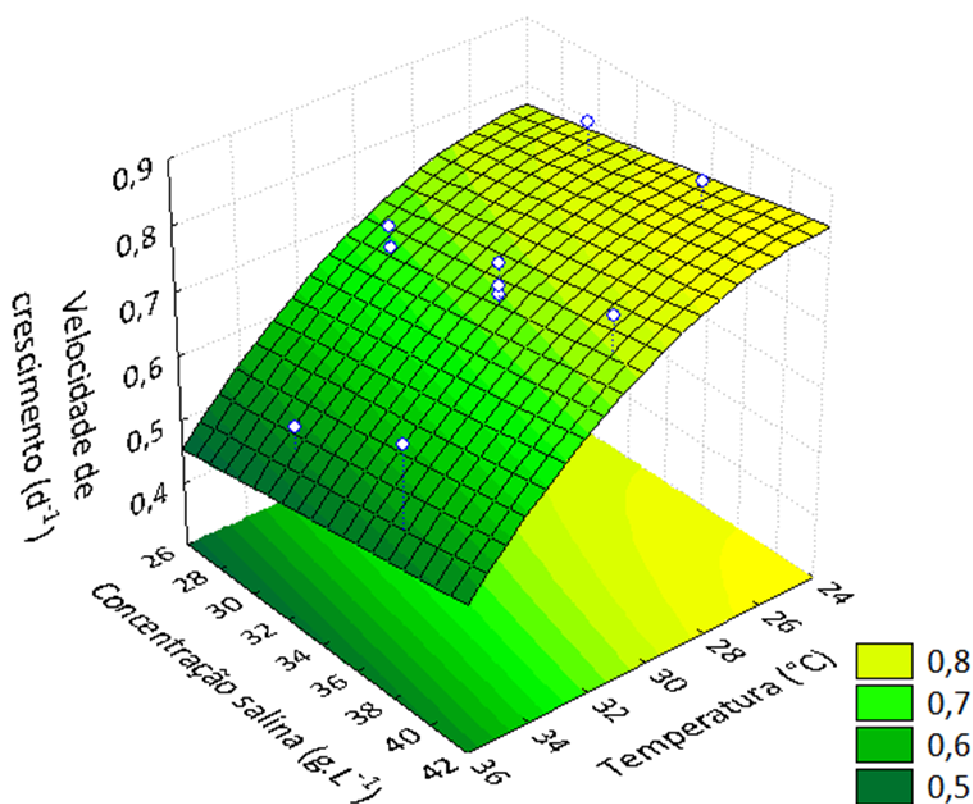


Figura 20. Superfície de resposta da taxa de fixação de dióxido de carbono em função da temperatura e da concentração salina do meio de cultivo em cultivos de *C. minutissima* em fotobiorreatores.

A superfície de resposta para a taxa de fixação de CO₂ ficou bastante semelhante à da biomassa, devido ao fato de a fixação de CO₂ ser diretamente proporcional à produção de biomassa. Portanto, para a taxa de fixação de CO₂ a temperatura possui influência significativa, tanto linear quanto quadrática, mas a concentração salina do meio de cultivo não. A máxima taxa de fixação de CO₂ atingida foi de aproximadamente 12 gCO₂.m⁻³.h⁻¹ no cultivo realizado a 25 °C e 37 g.L⁻¹.

O resultado da análise de carotenoides no final dos cultivos está apresentado na Figura 21.

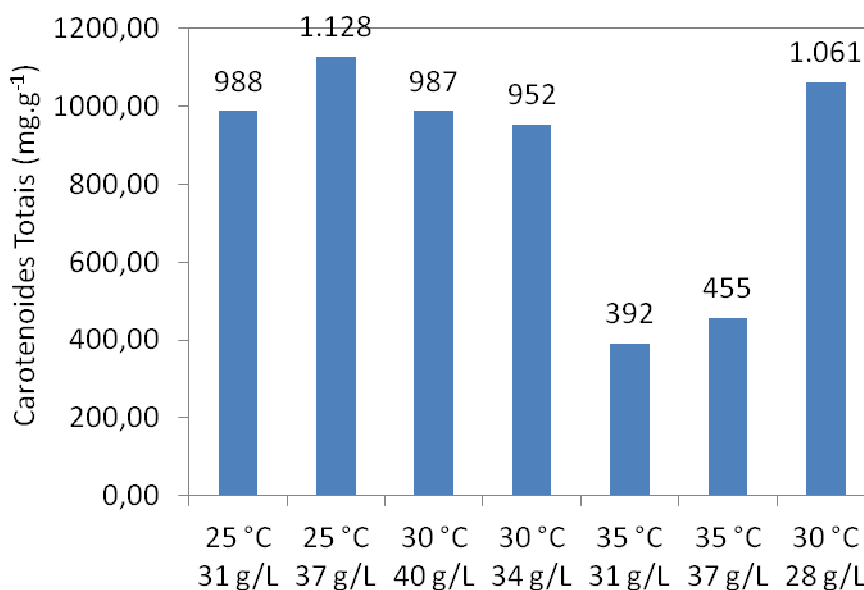


Figura 21. Resultado da análise de carotenoides presentes nas microalgas *C. minutissima* depois de cem horas de cultivos em fobiorreatores em diferentes condições de temperatura e concentração salina do meio de cultivo. Desvio padrão médio dos dados: 137 mg. L⁻¹.

Os cultivos realizados nas temperaturas de 25 °C e 30 °C apresentaram maiores quantidade de carotenoides por litro do que os cultivos realizados na temperatura de 35 °C. Esse resultado está de acordo com a quantidade de biomassa obtida. Portanto, uma relação entre carotenoides e biomassa foi calculada e está apresentada na Tabela 13, juntamente com o resultado da análise de lipídeos totais.

Tabela 13. Resultados da análise de lipídeos totais e carotenoides totais realizados com as microalgas coletadas no final dos cultivos e liofilizadas.

Temperatura (°C)	Concentração Salina (g.L ⁻¹)	Lipídeos Totais (%)	Carotenoides Totais (mg.g ⁻¹)
25	31	14,5 ^a	2,83 ± 0,93 ^a
25	37	13,8 ^a	2,48 ± 1,14 ^a
30	28	12,9 ^a	2,61 ± 1,00 ^a
30	34	12,4 ^a	2,55 ± 0,91 ^a
30	40	14,7 ^a	2,32 ± 1,19 ^a
35	31	12,0 ^a	2,17 ± 1,08 ^a
35	37	12,0 ^a	2,42 ± 1,29 ^a
MÉDIA		13,2	2,48 ± 1,08

Letras iguais mostram resultados que não tem diferença significativa entre si.

Todas as condições de concentração salina e temperatura apresentaram relação de carotenoides por biomassa por volta de 2,5 mg.g⁻¹ e porcentagem de lipídeos por biomassa entre 10 % e 15 %, sendo a média equivalente a 13,2 %. A análise de variância dos resultados mostrou que a temperatura e a concentração salina do meio de cultivo não influenciaram a produção de lipídeos e de carotenoides na faixa de valores testada.

Segundo HU (2004), a variação de temperatura não influencia no montante de lipídeos produzidos pelas microalgas, o que está de acordo com o resultado obtido no presente trabalho. Porém o mesmo autor afirma que um aumento na concentração salina do meio de cultivo das microalgas ocasiona um leve aumento no conteúdo lipídico das microalgas, fato que não foi verificado nos resultados.

Os resultados de porcentagens de lipídeos encontradas nas microalgas publicados por CHISTI (2007) e GOUVEIA & OLIVEIRA (2009) sintetizados na Tabela 2 do Capítulo 2, mostram que em microalgas da espécie *Chlorella* foram produzidos lipídeos em porcentagem de 14 % a 63 %, sendo superiores aos resultados obtidos neste trabalho. Já BORGHETI (2009), cultivando *C. minutissima* a 30 °C e 2.500 lx em resíduo agroindustrial do processamento da mandioca, obteve porcentagem de lipídeo de 11,08 %.

O resultado encontrado de carotenoides totais médios de $2,5 \text{ mg.g}^{-1}$ significa que 0,25 % do peso seco das microalgas é constituído por carotenoides, o que está de acordo com SPOLAORE *et al.* (2006), que afirmam que os carotenoides estão presentes nas microalgas geralmente na concentração de 0,1 a 0,2 % do seu peso seco.

Todos cultivos iniciaram com pH 7,0, sofrendo uma elevação até aproximadamente 8,5 por volta da hora 80, final da fase estacionária, e depois sofrendo acidificação até o pH em torno de 7,5.

4.3. Identificação dos Carotenoides

Os cromatogramas dos extratos saponificados da microalga liofilizada *C. minutissima* no final dos cultivos permitiram a identificação de picos dos carotenoides luteína, zeaxantina e β -caroteno, como pode ser visualizado na Figura 22. Os demais picos não foram identificados.

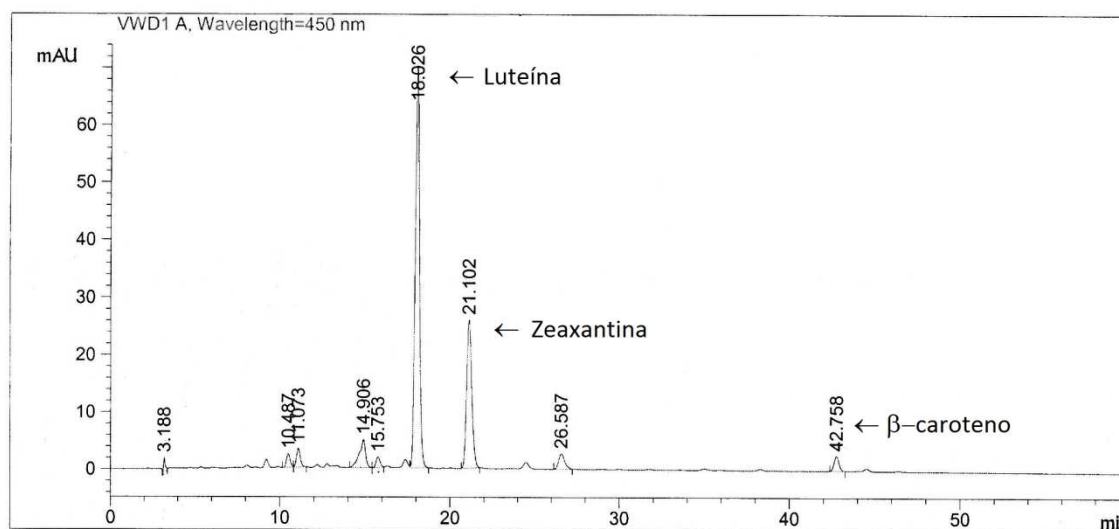


Figura 22. Cromatograma dos carotenoides do extrato saponificado de microalga liofilizada *C. minutissima* no final dos cultivos. Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C30 polimérica marca YMC, FM: gradiente de água/metanol/tert-metil-butil-éter (MTBE) proporção inicial 5:90:5, atingindo 0:95:5 em 12 minutos, 0:89:11 em 25 minutos, 0:75:25 em 40 minutos até concentração final de 0:50:50 em 60 minutos, vazão de $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, a 33°C .

O perfil dos carotenoides nos cromatogramas foi sempre o mesmo, apresentando uma maior quantidade do carotenoide luteína, seguido de zeaxantina e com uma pequena quantidade de β -caroteno, independentemente das condições de luz, concentração salina e temperatura utilizadas nos cultivos.

As porcentagens dos carotenoides identificados foram calculadas em todos os cromatogramas e comparadas, resultando na relação apresentada na Tabela 14.

Tabela 14. Porcentagens médias dos carotenoides presentes na microalga *C. minutissima* identificados por cromatografia líquida de alta performance.

Luteína (%)	Zeaxantina (%)	β -caroteno (%)	Demais (%)
$61,2 \pm 3,8$	$19,6 \pm 5,4$	$4,0 \pm 2,6$	$14,8 \pm 2,8$

Segundo PEREZ-GARCIA *et al.* (2011), a *Chlorella* é a principal espécie utilizada na produção de luteína e na Tabela 14 é possível perceber que o carotenoide luteína é o produzido em maior porcentagem pela microalga *C. minutissima*. A

luteína possui propriedades antioxidantes e sua ingestão proporciona diversos benefícios para a saúde humana, na prevenção de doenças visuais, cerebrais e do coração, e é um carotenoide que não possui forma sintética, ou seja, apenas é sintetizado naturalmente (VÍLCHEZ *et al.*, 2011).

GOUVEIA *et al.* (1996) monitoraram a variação da concentração de carotenoides ao longo do tempo na microalga *Chlorella vulgaris* em condições de deficiência de nutrientes, estresse salino (30 g.L⁻¹ de NaCl) e intensidade luminosa de aproximadamente 2.800 lx. Os carotenoides analisados foram β-caroteno, astaxantina, cantaxantina e luteína. O carotenoide luteína foi obtido em maiores quantidades nos dias 3 e 5, respectivamente 2,62 e 2,67 mg.g⁻¹, da mesma forma que o β-caroteno, igual a 0,43 e 0,33 mg.g⁻¹.

A proporção e a quantidade de luteína encontradas por INBARAJ *et al.* (2006), referentes a 93,07 % e 153,0 ± 0,1 mg.g⁻¹, foram superiores às encontradas neste trabalho e no trabalho de GOUVEIA *et al.* (1996), respectivamente, 61,23 % e 2,67 mg.g⁻¹.

Capítulo 5

Conclusões

Com base nos resultados experimentais obtidos no presente trabalho pode-se concluir que:

- a microalga *Chlorella minutissima* mostrou atingir concentrações de biomassa mais elevadas do que a microalga *Chlorella* sp.;
- os cultivos de *C. minutissima* que receberam iluminação de 17.000 lx produziram mais lipídeos em porcentagem de biomassa que os demais;
- a intensidade luminosa de 17.000 lx se mostrou melhor do que as demais para os cultivos de *Chlorella minutissima*;
- a temperatura possui influência significativa na produção de biomassa enquanto a concentração salina não influencia;
- para a velocidade específica máxima de crescimento, tanto a temperatura quanto a concentração salina apresentaram influência significativa;
- a temperatura possui influência significativa na biofixação de CO₂;
- a temperatura e a concentração salina do meio de cultivo não influenciaram a produção de lipídeos e carotenoides;
- a microalga *C. minutissima* apresenta maior porcentagem do carotenoide luteína, seguido de zeaxantina e β-caroteno.

5.1. Sugestões para Trabalhos Futuros

A fim de dar continuidade ao trabalho realizado nesta dissertação de mestrado, sugere-se:

- realizar teste de adição de nitrato no meio de cultivo a fim de avaliar a influência deste substrato no crescimento das microalgas;
- testar outros métodos de extração de lipídeos, bem como a associação de métodos;
- realizar a identificação e quantificação dos lipídeos;
- testar o uso de substrato orgânico de carbono para proporcionar uma produção mixotrófica de microalgas, sendo que uma possibilidade de baixo custo seria a utilização de resíduos agroindustriais;
- suplementar o ar com CO₂;
- realizar a quantificação dos carotenoides.

Apêndice A

Conversão de Unidades para Lâmpada Fluorescente Branca Fria

As conversões de unidades realizadas no presente trabalho foram de acordo com as conversões apresentadas na Tabela A. 1. O Sistema Internacional de Unidades utiliza a unidade Lux (lx) para descrever a grandeza Luminosidade, e da mesma forma foi feito neste trabalho.

Tabela A. 1. Tabela de Conversão de Unidades para Lâmpada Fluorescente Branca Fria (Adaptado de EGC, 2011).

Unidade	Símbolo	Equivalência
Fluxo Fotossintético de Fótons ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)	PPF	0,218 E_e 74 lx
Irradiância (W/m^2)	E_e	4,59 PPF 0,341 lx
Lux (lúmen/ m^2)	lx	0,014 PPF 2,93 E_e

Apêndice B

Correlação entre Medidas de Absorbância em $\lambda = 570$ nm e $\lambda = 750$ nm

Foram realizadas medidas de absorbância nos comprimentos de onda de 570 nm e 750 nm a fim de determinar se as absorbâncias lidas no espectrofotômetro poderiam estar sendo influenciadas pela presença dos pigmentos presentes nas microalgas *C. minutissima*. Essas medidas foram relacionadas em um gráfico através de regressão linear, de acordo com a Figura B. 1.

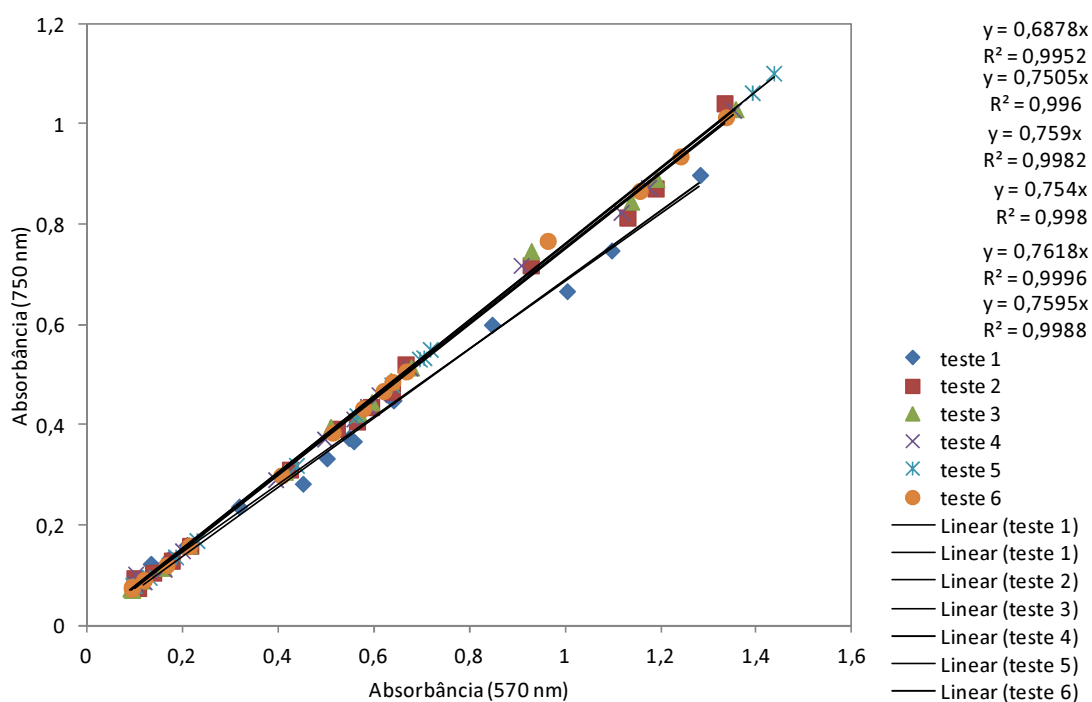


Figura B. 1. Medidas experimentais de absorbância de cultivos da microalga *C. minutissima* em fotobiorreator nos comprimentos de onda de 570 nm e 750 nm.

Todas as equações das regressões lineares apresentaram coeficiente de correlação (R^2) elevados, ou seja, pode-se afirmar que as medidas de absorvância em 570 nm e 750 nm são proporcionais, não sofrendo alteração em função dos pigmentos presentes na microalga *C. minutissima*.

Referências Bibliográficas

ANDERSEN, R. A. Algal Culturing Techniques: Elsevier. 2005

BACIOCCHI, R.; G. STORTI; M. MAZZOTTI. Process design and energy requirements for the capture of carbon dioxide from air. Chemical Engineering and Processing, v.45, p.1047-1058. 2006.

BARBOSA, M. J.; J. F. ZIJFFERS; A. NISWORO; W. VAES; J. V. SCHOONHOVEN; R. H. WIJFFELS. Optimization of biomass, vitamins, and carotenoid yield on light energy in a flat-panel reactor using the A-stat technique 2005.

BHATNAGAR, A.; M. BHATNAGAR; S. CHINNASAMY; K. DAS. Chlorella minutissima — A Promising Fuel Alga for Cultivation in Municipal Wastewaters. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.161, n.1, p.523-536. 2010.

BORGHETTI, I. A. Avaliação do Crescimento da Microalga Chlorella minutissima em Meio de Cultura com Diferentes Concentrações de Manipueira. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

BOSMA, R.; E. VAN ZESSEN; J. H. REITH; J. TRAMPER; R. H. WIJFFELS. Prediction of volumetric productivity of an outdoor photobioreactor. Biotechnology and Bioengineering, v.97, p.1108–1120. 2007.

BRENNAN, L.; P. OWENDE. 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.

BRINDLEY, C.; M. C. GARCIA-MALEA; F. G. ACIEN; J. M. FERNANDEZ; J. L. GARCIA; E. MOLINA. Influence of power supply in the feasibility of Phaeodactylum tricornutum cultures. Biotechnology and Bioengineering, v.87, p.723–733. 2002.

BUBRICK, P. Production of astaxanthin from Haematococcus. Bioresource Technology, v.38, p.237-239. 1991.

CENTI, G.; S. PERATHONER. Opportunities and prospects in the chemical recycling of carbon dioxide to fuels. Catalysis Today, v.148, n.3-4, p.191-205. 2009.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances, v.25, n.3, p.294-306. 2007.

CHIU, S.-Y.; C.-Y. KAO; C.-H. CHEN; T.-C. KUAN; S.-C. ONG; C.-S. LIN. Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. Bioresource Technology, v.99, n.9, p.3389-3396. 2008.

CONVERTI, A.; A. LODI; A. DEL BORGHI; C. SOLISIO. Cultivation of *Spirulina platensis* in a combined airlift-tubular reactor system. Biochemical Engineering Journal, v.32, n.1, p.13-18. 2006.

DE MORAIS, M. G.; J. A. V. COSTA. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. Journal of Biotechnology, v.129, n.3, p.439-445. 2007a.

_____. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. Energy Conversion and Management, v.48, n.7, p.2169-2173. 2007b.

DEGEN, J.; A. UEBELE; A. RETZE; U. SCHMID-STAIGER; W. TRÖSCH. A novel airlift photobioreactor with baffles for improved light utilization through the flashing light effect. Journal of Biotechnology, v.92, n.2, p.89-94. 2001.

DORAN, P. M. Bioprocess Engineering Process. United States of America: Elsevier Science & Technology Books. 1995.

DOUSKOVA, I.; J. DOUCHA; K. LIVANSKY; J. MACHAT; P. NOVAK; D. UMYSOVA; V. ZACHLEDER; M. VITTOVA. Simultaneous flue gas bioremediation and reduction of microalgal biomass production costs. Applied Microbiology and Biotechnology, v.82, n.1, p.179-185. 2009.

DUFOSSÉ, L.; P. GALAUP; A. YARON; S. M. ARAD; P. BLANC; K. N. CHIDAMBARA MURTHY; G. A. RAVISHANKAR. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? Trends in Food Science & Technology, v.16, n.9, p.389-406. 2005.

DUTTA, P. K.; R. RADNER. A strategic analysis of global warming: Theory and some numbers. Journal of Economic Behavior & Organization, v.71, n.2, p.187-209. 2009.

FAZELI, M. R.; H. TOFIGHI; N. SAMADI; H. JAMALIFAR. Effects of salinity on β -carotene production by *Dunaliella tertiolecta* DCCBC26 isolated from the Urmia salt lake, north of Iran. Bioresource Technology, v.97, n.18, p.2453-2456. 2006.

FERNÁNDEZ, F. G. A.; J. M. F. SEVILLA; J. A. S. PÉREZ; E. M. GRIMA; Y. CHISTI. Airlift-driven external-loop tubular photobioreactors for outdoor production of microalgae: assessment of design and performance. Chemical Engineering Science, v.56, n.8, p.2721-2732. 2001.

FLORIDES, G. A.; P. CHRISTODOULIDES. Global warming and carbon dioxide through sciences. Environment International, v.35, n.2, p.390-401. 2009.

GÓMEZ-VILLA, H.; D. VOLTOLINA; M. NIEVES; P. PIÑA. Biomass production and nutrient budget in outdoor cultures of *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae) in artificial wastewater, under the winter and summer conditions of Mazatlán, Sinaloa, Mexico. Vie et Milieu, Life and Environment, v.55, n.2, p.121-126. 2005.

GOUVEIA, L.; A. C. OLIVEIRA. Microalgae as a raw material for biofuels production. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, v.36, n.2, p.269-274. 2009.

GOUVEIA, L.; V. VELOSO; A. REIS; H. FERNANDES; J. NOVAIS; J. EMPIS. Evolution of pigment composition in *Chlorella vulgaris*. Bioresource Technology, v.57, n.2, p.157-163. 1996.

GROBBELAAR, J. U. Algal Nutrition - Mineral Nutrition. In: Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. In: A. RICHMOND (Ed.). Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology; Blackwell Publishing Ltd, 2004.

GUILLARD, R. L. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. Conference on Culture of Marine Invertebrate Animals. New York: Plenum Press, p. 29-60. 1975.

GUPTA, H.; L.-S. FAN. Carbonation-Calcination Cycle Using High Reactivity Calcium Oxide for Carbon Dioxide Separation from Flue Gas. Industrial & Engineering Chemistry Research, v.41, n.16, 2012/01/27, p.4035-4042. 2002.

HALL, D. O.; F. G. ACIÉN FERNÁNDEZ; E. C. GUERRERO; K. K. RAO; E. M. GRIMA. Outdoor helical tubular photobioreactors for microalgal production: Modeling of fluid-dynamics and mass transfer and assessment of biomass productivity. Biotechnology and Bioengineering, v.82, n.1, p.62-73. 2003.

HANSEN, J.; M. SATO; P. KHARECHA; D. BEERLING; R. BERNER; V. MASSON-DELMOTTE; M. RAYMO; D. ROYER; J. ZACHOS. Target Atmospheric CO₂: Where Should Humanity Aim? Journal of Open Atmospheric Science, v.2, p.217-231. 2008.

HARUN, R.; M. SINGH; G. M. FORDE; M. K. DANQUAH. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v.14, n.3, p.1037-1047. 2010.

HOFMANN, D. J.; J. H. BUTLER; P. P. TANS. A new look at atmospheric carbon dioxide. Atmospheric Environment, v.43, n.12, p.2084-2086. 2009.

HU, Q. Environmental Effects on Cell Composition. In: A. RICHMOND (Ed.). Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology: Blackwell Publishing Ltd, 2004.

HUANG, G.; F. CHEN; D. WEI; X. ZHANG; G. CHEN. Biodiesel production by microalgal biotechnology. Applied Energy, v.87, n.1, p.38-46. 2010.

HUNTLEY, M.; D. REDALJE. CO₂ Mitigation and Renewable Oil from Photosynthetic Microbes: A New Appraisal. Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change, v.12, n.4, p.573-608. 2007.

ILLMAN, A. M.; A. H. SCRAGG; S. W. SHALES. Increase in Chlorella strains calorific values when grown in low nitrogen medium. Enzyme and Microbial Technology, v.27, n.8, p.631-635. 2000.

INBARAJ, B. S.; J. T. CHIEN; B. H. CHEN. Improved high performance liquid chromatographic method for determination of carotenoids in the microalga Chlorella pyrenoidosa. Journal of Chromatography A, v.1102, n.1-2, p.193-199. 2006.

IWAMOTO, H. Industrial Production of Microalgal Cell-mass and Secondary Products – Major Industrial Species - Chlorella. In: A. RICHMOND (Ed.). Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology: Blackwell Publishing Ltd, 2004.

IWASAKI, I.; Q. HU; N. KURANO; S. MIYACHI. Effect of extremely high-CO₂ stress on energy distribution between photosystem I and photosystem II in a 'high-CO₂' tolerant green alga, Chlorococcum littorale and the intolerant green alga Stichococcus bacillaris. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v.44, n.3, p.184-190. 1998.

JACOB-LOPES, E.; C. H. G. SCOPARO; L. M. C. F. LACERDA; T. T. FRANCO. Effect of light cycles (night/day) on CO₂ fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, v.48, n.1, p.306-310. 2009.

KAERPINTONG, K.; A. SHOTIPRUK; S. POWTONGSOOK; P. PAVASANT. Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of Haematococcus pluvialis in airlift bioreactor. Bioresource Technology, v.98, n.2, p.288-295. 2007.

KARAM, L. M.; C. R. SOCCOL. Efeito da temperatura e pH no cultivo de *Spirulina major*. Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar, Umuarama, v.10, n.1, p.5-7. 2007.

KHAN, S. A.; RASHMI; M. Z. HUSSAIN; S. PRASAD; U. C. BANERJEE. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v.13, n.9, p.2361-2372. 2009.

KISHIMOTO, M.; T. OKAKURA; H. NAGASHIMA; T. MINOWA; S.-Y. YOKOYAMA; K. YAMABERI. CO₂ fixation and oil production using micro-algae. Journal of Fermentation and Bioengineering, v.78, n.6, p.479-482. 1994.

KOCHEM, L. H. Caracterização de fotobiorreator air-lift para cultivo de microalgas. Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 2010.

KOH, L. P.; J. GHAZOUL. Biofuels, biodiversity, and people: Understanding the conflicts and finding opportunities. Biological Conservation, v.141, n.10, p.2450-2460. 2008.

KRICHNAVARUK, S.; S. POWTONGSOOK; P. PAVASANT. Enhanced productivity of *Chaetoceros calcitrans* in airlift photobioreactors. Bioresource Technology, v.98, n.11, p.2123-2130. 2007.

LEKANG, O.-I. Aquaculture Engineering: Blackwell Publishing Ltd. 2007.

LI, Z.; H. YUAN; J. YANG; B. LI. Optimization of the biomass production of oil algae *Chlorella minutissima* UTEX2341. Bioresource Technology, v.102, n.19, p.9128-9134. 2011.

LIU, B.-H.; Y.-K. LEE. Secondary carotenoids formation by the green alga *Chlorococcum* sp. Journal of Applied Phycology, v.12, n.3, p.301-307. 2000.

LOAICIGA, H. A.; J. B. VALDES; R. VOGEL; J. GARVEY; H. SCHWARZ. Global warming and the hydrologic cycle. Journal of Hydrology, v.174, n.1-2, p.83-127. 1996.

LOSEVA, N. L.; A. J. ALYABYEV; G. G. RACHIMOVA; R. I. ESTRINA. The effect of high temperature and salt on the metabolic heat rate of *Chlorella* cells. Thermochimica Acta, v.309, n.1-2, p.129-131. 1998.

LOURENÇO, S. O. Cultivo de microalgas marinhas: Princípios e Aplicações: RiMa. 2006.

MASOJÍDEK, J. K., M.; TORZILLO, G. Photosynthesis in Microalgae. In: A. RICHMOND (Ed.). Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology: Blackwell Publishing Ltd, 2004.

MATA, T. M.; A. A. MARTINS; N. S. CAETANO. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v.14, n.1, p.217-232. 2009.

MEHLITZ, T. H. Temperature Influence and Heat Management Requirements of Microalgae Cultivation in Photobioreactors. Bioresource and Agricultural Engineering, Faculty of California Polytechnic State University, San Luis Obispo, 2009.

MEISER, A.; U. SCHMID-STAIGER; W. TRÖSCH. Optimization of eicosapentaenoic acid production by *Phaeodactylum tricornutum* in the flat panel airlift (FPA) reactor. Journal of Applied Phycology, v.16, n.3, p.215-225. 2004.

MENG, X.; J. YANG; X. XU; L. ZHANG; Q. NIE; M. XIAN. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. Renewable Energy, v.34, n.1, p.1-5. 2009.

MERCADANTE, A. Z. R.-A., D. B. Carotenoids from yellow passion fruit (*Passiflora edulis*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.46, p.4102-4106. 1998.

MESECK, S. L.; J. H. ALIX; G. H. WIKFORS. Photoperiod and light intensity effects on growth and utilization of nutrients by the aquaculture feed microalga, *Tetraselmis chui* (PLY429). Aquaculture, v.246, n.1-4, p.393-404. 2005.

MOHEIMANI, N. R. The culture of Coccolithophorid algae for carbon dioxide bioremediation. Murdoch University, 2005.

MURAKAMI, M.; M. IKENOUCI. The biological CO₂ fixation and utilization project by rite (2) - Screening and breeding of microalgae with high capability in fixing CO₂ - . Energy Conversion and Management, v.38, Supplement, n.0, p.S493-S497. 1997.

OH, S. H.; M. C. KWON; W. Y. CHOI; Y. C. SEO; G. B. KIM; D. H. KANG; S. Y. LEE; H. Y. LEE. Long-term outdoor cultivation by perfusing spent medium for biodiesel production from *Chlorella minutissima*. Journal of Bioscience and Bioengineering, v.110, n.2, p.194-200. 2010.

OLIVIER, J. G. J.; J. A. VAN AARDENNE; F. J. DENTENER; V. PAGLIARI; L. N. GANZVELD; J. A. H. W. PETERS. Recent trends in global greenhouse gas emissions: regional trends 1970-2000 and spatial distribution of key sources in 2000. Environmental Sciences, v.2, n.2-3, 2012/02/16, p.81-99. 2005.

PEREZ-GARCIA, O.; F. M. E. ESCALANTE; L. E. DE-BASHAN; Y. BASHAN. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. Water Research, v.45, n.1, p.11-36. 2011.

PHUKAN, M. M.; R. S. CHUTIA; B. K. KONWAR; R. KATAKI. Microalgae Chlorella as a potential bio-energy feedstock. Applied Energy, v.88, n.10, p.3307-3312. 2011.

POSTEN, C. Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. Engineering in Life Sciences, v.9, p.165-177. 2009.

RAO, A. R.; C. DAYANANDA; R. SARADA; T. R. SHAMALA; G. A. RAVISHANKAR. Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. Bioresource Technology, v.98, n.3, p.560-564. 2007.

RICHMOND, A. Biological Principles of Mass Cultivation. In: A. RICHMOND (Ed.). Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology: Blackwell Publishing Ltd, 2004.

RICHMOND, A.; Z. CHENG-WU. Optimization of a flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp. outdoors. Journal of Biotechnology, v.85, n.3, p.259-269. 2001.

RIDGWELL, A.; P. J. VALDES. Climate and climate change. Current Biology, v.19, n.14, p.R563-R566. 2009.

RUANGSOMBOON, S. Effect of light, nutrient, cultivation time and salinity on lipid production of newly isolated strain of the green microalga, *Botryococcus braunii* KMITL 2. Bioresource Technology, v.109, n.0, p.261-265. 2011.

SAKAI, N.; Y. SAKAMOTO; N. KISHIMOTO; M. CHIHARA; I. KARUBE. Chlorella strains from hot springs tolerant to high temperature and high CO₂. Energy Conversion and Management, v.36, n.6-9, p.693-696. 1995.

SCRAGG, A. H.; A. M. ILLMAN; A. CARDEN; S. W. SHALES. Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor. Biomass and Bioenergy, v.23, n.1, p.67-73. 2002.

SINGH, J.; S. GU. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v.14, n.9, p.2596-2610. 2010.

SPOLAORE, P.; C. JOANNIS-CASSAN; E. DURAN; A. ISAMBERT. Commercial applications of microalgae. Journal of Bioscience and Bioengineering, v.101, n.2, p.87-96. 2006.

STRICKLAND, J. D. H.; T. R. PARSONS. A practical handbook of seawater analysis. Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada, v.167, p.1-311. 1968.

SYDNEY, E. B.; W. STURM; J. C. DE CARVALHO; V. THOMAZ-SOCCOL; C. LARROCHE; A. PANDEY; C. R. SOCCOL. Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. Bioresource Technology, v.101, n.15, p.5892-5896. 2010.

TAKAGI, M.; KARSENKO; T. YOSHIDA. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. Journal of Bioscience and Bioengineering, v.101, n.3, p.223-226. 2006.

TEIXEIRA, C. M. L. L. M., E. Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel. I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel. Brasília, Brasil, 2008.

TJAHJONO, A. E.; Y. HAYAMA; T. KAKIZONO; Y. TERADA; N. NISHIO; S. NAGAI. Hyper-accumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures. Biotechnology Letters, v.16, n.2, p.133-138. 1994.

TOMASELLI, L. The Microalgal Cell. In: A. RICHMOND (Ed.). Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology: Blackwell Publishing Ltd, 2004.

TREDICI, M. R. Mass Production of Microalgae: Photobioreactors. In: A. RICHMOND (Ed.). Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology: Blackwell Publishing Ltd, 2004.

VÍLCHEZ, C.; E. FÓRJAN; M. CUARESMA; F. BÉDMAR; I. GARBAYO; J. M. VEGA. Marine Carotenoids: Biological Functions and Commercial Applications. Marine Drugs, v.9, p.391-333. 2011.

XU, L.; P. J. WEATHERS; X.-R. XIONG; C.-Z. LIU. Microalgal bioreactors: Challenges and opportunities. Engineering in Life Sciences, v.9, n.3, p.178-189. 2009.

YANG, H.; Z. XU; M. FAN; R. GUPTA; R. B. SLIMANE; A. E. BLAND; I. WRIGHT. Progress in carbon dioxide separation and capture: A review. Journal of Environmental Sciences, v.20, n.1, p.14-27. 2008.

YEESANG, C.; B. CHEIRSILP. Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand. Bioresource Technology, v.102, n.3, p.3034-3040. 2011.

YOO, C.; S.-Y. JUN; J.-Y. LEE; C.-Y. AHN; H.-M. OH. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. Bioresource Technology, v.101, n.1, Supplement, p.S71-S74. 2010.

YOUNG, A. J.; G. BRITTON. Carotenoids in Photosynthesis. London: Chapman & Hall. 1993

YUN, Y.-S.; S. B. LEE; J. M. PARK; C.-I. LEE; J.-W. YANG. Carbon Dioxide Fixation by Algal Cultivation Using Wastewater Nutrients. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, v.69, n.4, p.451-455. 1997.

ZANATTA, C. F. M., A. Z. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*). Food Chemistry, v.101, p.1526-1532. 2007.

ZENG, X.; M. K. DANQUAH; X. D. CHEN; Y. LU. Microalgae bioengineering: From CO₂ fixation to biofuel production. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v.15, n.6, p.3252-3260. 2011.

ZHU, C.; S. NAQVI; T. CAPELL; P. CHRISTOU. Metabolic engineering of ketocarotenoid biosynthesis in higher plants. Archives of Biochemistry and Biophysics, v.483, n.2, p.182-190. 2009.