MARTA CRISTINA PICARDO

DESEMPENHO DE *Isochrysis galbana* NA PRODUÇÃO DE ÓLEO E SEQUESTRO DE CO_2 COM FOTOBIORREATOR PILOTO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciências em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

RIO DE JANEIRO – RJ – BRASIL
2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Picardo, Marta Cristina.

Desempenho de *Isochrysis galbana* na Produção de Óleo e Sequestro de CO_2 com Fotobiorreator Piloto – Rio de Janeiro, 2012.
xvi, 201p. (EQ/UFRJ, D.Sc., 2012)

Tese de Doutorado – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2012.

1. Microalgas
2. Fotobiorreator
3. Biofixação de CO_2
4. Biocombustíveis

I. Araujo, Ofélia de Queiroz Fernandes (orientadora); Medeiros, José Luiz (orientador); Chaloub, Ricardo Moreira (orientador).
II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.
III. Título.

DESEMPENHO DE *Isochrysis galbana* NA PRODUÇÃO DE ÓLEO E SEQUESTRO DE CO_2 COM FOTOBIORREATOR PILOTO

MARTA CRISTINA PICARDO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciências em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

Aprovada por:

Ofélia de Queiroz Fernandes Araújo, PhD – Orientadora (Escola de Química, UFRJ)

José Luiz de Medeiros, DSc – Orientador (Escola de Química, UFRJ)

Ricardo Moreira Chaloub, DSc.- Orientador (Instituto de Química, UFRJ)

Magali Christe Cammarota, DSc. (Escola de Química, UFRJ)

Antonio Carlos Augusto da Costa, DSc. (Instituto de Química, UERJ)

Maria Alice Zarur Coelho, DSc. (Escola de Química, UFRJ)

Márcio Luiz Lyra Paredes, DSc. (Instituto de Química, UERJ)

Anita Ferreira da Silva, DSc. (Instituto de Química, UFRJ)

Rio de Janeiro, RJ - Brasil
2012

"Nunca alguém tão grande se fez tão pequeno
para nos ensinar as mais importantes lições de vida!"

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

Ao meu Senhor e Salvador Jesus Cristo, porque dele, e por ele, e para ele são todas as coisas, agora e para sempre amém;

Ao meu marido Neemias Pacheco, pela paciência interminável, pelo amor, companheirismo e apoio incondicionais;

Aos meus pais e meus irmãos que sempre estiveram do meu lado e cuidaram de mim;

À minha família, por todo incentivo e amor, em especial a minha avó Therezinha por seu incentivo, amor e intercessão;

Aos meus orientadores Ofélia de Queiroz, José Luiz de Medeiros e Ricardo Chaloub pelas sugestões, críticas, orientação, pela confiança em mim depositada, pelas valiosas contribuições para o meu crescimento profissional e pessoal que foram fundamentais para a minha formação;

Aos companheiros de trabalho e amigos do laboratório H2CIN, Bruna Emerenciano, Alejandra Irina, Claudia Mendieta, Mariana Bittar, Bruna Eckardt, Rosana, Gabriel Lima, Erick Gripp, Luiz Sacramento, Andressa Nakao, Camila Bueno, entre outros, por toda colaboração e incentivo;

À Profª Anita Ferreira da Silva do Instituto de Química da UFRJ pelos conselhos, sugestões e incentivo.

Aos Químicos Carlos Eduardo Carvalhido e Leonice Bezerra, do Laboratório de Inorgânica do Instituto de Química/UFRJ pelas determinações das análises elementares na primeira parte do presente trabalho;

Ao amigo Wagner pela construção, manutenção do fotobiorreator, por não desistir da difícil missão, enfim por todo apoio.

Aos amigos Soraya Gomes, Magda Felisberto, Marcelo Felisberto, Tatiane Duarte, Carlos Alberto Duarte, Cláudia Menezes e Giovanni Menezes pelo carinho e pelas orações.

Aos meus colegas da EQ-UFRJ e a todos os professores e funcionários da pós-graduação.

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

PICARDO, Marta Cristina. Desempenho de *Isochrysis galbana* na Produção de Óleo e Sequestro de CO_2 com Fotobiorreator Piloto. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Escola de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

A produção de matéria prima para obtenção de biocombustíveis está focada nos cultivos de cana de açúcar, milho, soja e plantas oleaginosas em geral. Estas culturas necessitam de solos férteis, água doce e apresentam sazonalidade. O cultivo de microalgas apresenta-se como uma alternativa, não competindo com a produção de alimentos e com o consumo humano ou industrial de água, além da vantagem de agregar o potencial de sequestro do CO_2, principal gás de efeito estufa. No entanto, o desempenho econômico de processos baseados em microalgas depende centralmente de altas produtividades em biomassa e no teor de lipídios alcançados. Com este propósito, o presente trabalho aborda a produção *outdoor* de biomassa algácea em escala piloto. No contexto de biocombustíveis, e consequente foco em produtividade, desenvolveu-se inicialmente uma metodologia de *Screening* de microalgas com resultados experimentais apresentados na literatura. A microalga marinha *Isochrysis galbana* foi selecionada em função do seu potencial de produção de biomassa, teor de carbono e produtividade de lipídios (métricas de seleção). Testes preliminares em reator de bancada com volume de 2L (testes *indoor*) comprovaram o potencial desta microalga na utilização do CO_2 e atendimento das metas de seleção adotadas na Metodologia de *Screening*. A produtividade máxima alcançada em cultivo semicontínuo nos testes *indoor* foi de 0,5 $g.L^{-1}.d^{-1}$ de biomassa e 0,078 $g.L^{-1}.d^{-1}$ de lipídios. Um fotobiorreator tubular de 670 L foi projetado para *scale-up* do processo de biofixação de CO_2, exibindo dimensões e fluidodinâmica peculiares (objeto de depósito de patente). Duas bateladas foram conduzidas na planta piloto, obtendo-se taxa de crescimento máxima de 0,45 d^{-1}, concentração de biomassa de 0,15 $g.L^{-1}$ e teor máximo de lipídios de 28% em biomassa seca. Uma fase "*Lag*" foi observada em ambas as bateladas devido à adaptação celular às novas condições de irradiância. O sistema provou ser adequado ao cultivo de microalgas; entretanto, melhorias no controle de variáveis como a temperatura, e ajustes na adaptação celular, bem como a escolha de outras métricas de seleção, são notadamente importantes para aumentar a produtividade em biomassa, tornando a produção de microalgas viável.

Palavras Chaves: Microalgas, Fotobiorreator, Biofixação de CO_2, Biocombustíveis.

ABSTRACT

PICARDO, Marta Cristina. Performance of *Isochrysis galbana* in Oil production and CO_2 biofixation in Photobioreactor. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Escola de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

The production of raw material for biofuels production is focused on the cultivation of sugar cane, corn, soybeans and oilseeds in general. These crops require fertile soils, fresh water and exhibit seasonality. The cultivation of microalgae is presented as an alternative, not competing with food production and human consumption or industrial water, besides the advantage of adding the potential for sequestration of CO_2, the main greenhouse gas. However, the economic performance of microalgae-based processes depend centrally high biomass productivity and lipid content achieved. For this purpose, this paper addresses the outdoor production of algal biomass in a pilot scale. In the context of biofuels, and the consequent focus on productivity, initially developed a Screening Methodology of microalgae to experimental results reported in the literature. The marine microalga *Isochrysis galbana* was selected by the procedure in terms of its potential for biomass production, carbon content and lipid productivity (metric selection). Preliminary tests in batch reactor with a volume of 2L (indoor tests) demonstrated the potential of *I. galbana* in the use of CO_2 according to the metrics adopted in the selection Screening Methodology. The maximum yield achieved in semi-continuous cultivation in indoor tests was 0.5 $gL^{-1}.d^{-1}$ of biomass and 0.078 $gL^{-1}.d^{-1}$ lipid. A tubular photobioreactor with 670 L in volume was designed for this scale-up with peculiar dimensions and hydrodynamic, it is in the patenting process. Two batches were conducted in the pilot plant, obtained maximum growth rate of 0.45 d^{-1}, 0.15 $g.L^{-1}$ yield and maximum lipid content of 28% in dry biomass. A phase "lag" was observed in both batches due to cellular adaptation to new conditions of irradiance. The system has proved suitable for the microalgae cultivation; however, improvements in control of variables such as temperature, and adjustment of cellular adaptation and selection of other metrics, are particularly important to increase the biomass yield, making the production of microalgae viable.

Keywords: Microalgae, Photobioreactor, CO_2 Biofixation, Biofuel.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS V
RESUMO VI
ABSTRACT VII
SUMÁRIO VIII
CAPÍTULO 1 1
INTRODUÇÃO 1
1.1. Objetivo 3
1.2. Estrutura da tese 3
CAPÍTULO 2 4
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 4
2.1. Biofixação do CO_2 4
2.2. Metabolismo de lipídios 7
2.3. Variáveis que impactam a taxa de crescimento e a produção de metabólitos de interesse 12
2.3.1. Fonte de carbono 12
2.3.2. Temperatura, concentração de CO_2 e pH 15
2.3.3. Intensidade luminosa 18
2.3.4. Aeração 19
2.3.5. Condições nutricionais 20
2.4. Fotobiorreatores 21
2.4.1. Reatores tubulares 23
2.4.2. Reator tubular vertical com borbulhamento 29
2.4.3. Reatores de placas paralelas (flat plates) 30
2.5. Colheita de microalgas 36
2.6. Extração de lipídios 39
2.7. Biodiesel de microalgas 42
2.8. Alternativas de processamento da biomassa 48
2.8.1. Digestão anaeróbica 50
2.8.2. Gaseificação 53
2.8.3. Liquefação ou pirólise 55
2.9. Motivação do trabalho 56
CAPÍTULO 3 58
SCREENING DE MICROALGAS 58

3.1. Metodologia para *screening* 58
3.2. Resultados da aplicação da metodologia de *screening* 69
3.3. Discussão de resultados e conclusões sobre a metodologia de *screening* 84
CAPÍTULO 4 89
METODOLOGIA DAS ANÁLISES QUÍMICAS E BIOQUÍMICAS 89
4.1. Obtenção de biomassa liofilizada 89
4.2. Determinação do peso seco 89
4.3. Medidas de densidade celular 89
4.4. Análise de nitrato residual 90
4.5. Análise de fosfato residual 90
4.6. Análise de carboidratos totais 92
4.7. Análise de lipídios totais 92
4.8. Análise elementar 93
4.9. Análise de proteínas totais 93
4.10. Citometria de fluxo 93
4.11. Análise de carbono inorgânico em solução no fotobiorreator 94
4.12. Medidas de fluorescência da Clorofila-a 96
CAPÍTULO 5 98
CULTIVO INDOOR DE *I.galbana* 98
5.1. Metodologia do cultivo *indoor* 98
5.1.1. Material biológico 98
5.1.2. Meio de cultura 98
5.1.3. Aclimatação prévia 99
5.1.4. Condições de cultivo 100
5.1.4.1. Cultivo batelada 100
5.1.4.2. Cultivo em Batelada Alimentada 101
5.1.4.3. Cultivo semicontínuo 102
5.2. Resultados para os cultivos indoor de *I.galbana* 102
5.2.1. Cultivo batelada 102
5.2.2. Cultivo em batelada alimentada 107
5.2.3. Cultivo semicontínuo 109
CAPÍTULO 6 114
PLANTA PILOTO – SISTEMA DE FOTOBIORREAÇÃO 114
6.1. Descrição do sistema de fotobiorreação do Lab. H2CIN..... 114

6.2. Calibração e curvas operacionais do sistema de fotobiorreação 127
CAPÍTULO 7 133
CULTIVO OUTDOOR DE *I.galbana* NO FOTOBIORREATOR PILOTO 133
7.1. Procedimento de partida do sistema de fotobiorreação 133
7.1.1. Salinização e desinfecção da água 133
7.1.2. Preenchimento da planta piloto com a água salinizada e desinfectada 134
7.1.3. Adição do inóculo e nutrientes ao fotobiorreator 134
7.1.4. Monitoramento dos cultivos no fotobiorreator piloto 137
7.2. Resultados dos cultivos no fotobiorreator piloto 139
CAPÍTULO 8 172
CONCLUSÕES E SUGESTÕES 172
8.1. Conclusões 172
8.2.Conclusão geral 173
8.3. Sugestões 173
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 175
ANEXO 1 - Planilhas do programa CO_2SYS 196
ANEXO 2 - ARTIGO 201

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1:	Esquema da Fotossíntese.	7
Figura 2.2:	Fluxo metabólico de células de *Chlorella* em cultivo autotrófico	9
Figura 2.3:	Formação de ácidos graxos.	10
Figura 2.4:	Biossíntese de triglicerídeos na microalga.	11
Figura 2.5:	Conversão fotossintética de energia solar.	11
Figura 2.6:	Esquema de Fotobiorreatores.	23
Figura 2.7:	Reator tubular com *degasser* para exaustão de O_2.	26
Figura 2.8:	Reator *Biofence*.	26
Figura 2.9:	Reator tubular horizontal.	27
Figura 2.10:	Reator tubular helicoidal.	28
Figura 2.11:	Colunas Verticais de Borbulhamento.	30
Figura 2.12:	Esquema de um reator de placas com borbulhamento.	31
Figura 2.13:	Reator *Flat Plate*.	31
Figura 2.14:	Fotobiorreator tubular com produção de 100 t de biomassa por ano.	34
Figura 2.15:	Produção de alga a partir de gás exausto de termoelétrica.	35
Figura 2.16:	Reator Vertical em Saco Utilizando Gás Exausto de Termoelétrica.	35
Figura 2.17:	Eficiência da floculação de *Thalassiosira pseudonana* (250 mL) induzido por aumento da concentração de NaOH com eletrólito LT-25 (0,05%) adicionado a 1 ml/l, Eficiência (%) = 94,28 - 295,2 * ($0,6831^{[NaOH]}$).	38
Figura 2.18:	Extração de lipídios.	40
Figura 2.19:	Extração de lipídios por eletroporação. Processo *Originoil*	41
Figura 2.20:	Processamento Primário da Biomassa: Alternativas em Destaque	49
Figura 2.21:	Digestão anaeróbica.	51
Figura 2.22:	Plantas de DA Instaladas na Europa e na América do Norte entre 1982 e 2002.	53
Figura 3.1:	Principais Etapas da Metodologia para *Screening* de Espécies de Microalgas	61
Figura 3.2:	Distinção das 45 espécies de microalgas (Tabela 3.2) por *pools* metabólicos. (a) teor de carbono (wi_{CARBON}),	69
	(b) teor de lipídios (wi_{LIPIDS}), (c) teor de carboidratos (w_{iCHO}),	70
	(d) teor de proteínas (w_{iPTN}).	71

Figura 3.3:	Distinção das 45 espécies de microalgas (Tabela 3.2) em (a) taxa de fixação de carbono (ξ x wi_{CARBON}), (b) produtividade em lipídios (ξ x wi_{LIPIDS}),	72
	(c) produtividade em carboidratos (ξ x wi_{CHO}), (d) produtividade de proteínas (ξ x wi_{PTN}).	73
Figura 3.4:	Simulação de Processos *Downstream* da Biomassa. (a) Poder Calorífico; (b) Produção de Syngas; (c) Produção de Bio-H_2.	75
Figura 3.5:	Distribuição do HHV (MJ/kg) para as 45 espécies de microalgas (Tabela 2), calculado via correlação (b) de Tillman (HHV = 0.4373C - 1.6701 MJ/kg).	79
Figura 3.6:	Rendimento de *syngas* e CO_2 produzido para as espécies mais promissoras no processo seletivo de acordo com o conteúdo e produtividade do *pool* de biomoléculas.	81
Figura 3.7:	Rendimento de Bio-H_2 e CO_2 produzido para as espécies mais promissoras no processo seletivo de acordo com o conteúdo e produtividade do *pool* de biomoléculas.	82
Figura 3.8:	Sensibilidade do Procedimento de *Screening* a Incertezas nas taxas específicas de crescimento (d^{-1}): (a) Produtividade lipídica (g L^{-1} d^{-1}) calculada a partir da Tabela 3.2; (b) produtividades lipídicas em quatro ruídos aleatórios e uniformemente distribuídos dentro de +10% e -10% dos valores experimentais das taxas de crescimento. Sobreposição dos pontos com o calculado pela Métrica 2.	83
Figura 5.1:	Reator (cultivo *indoor*)	101
Figura 5.2:	(a) crescimento de *I. galbana* em batelada *indoor* (b) consumo de nitrato - (■) ar Q = 2L.min^{-1} (♦) ar +CO_2 Q = 2L.min^{-1}, CO_2 5% (v/v).	103
Figura 5.3:	Composição bioquímica da biomassa cultivada em batelada *indoor*, aeração com mistura atmosférica (AR) e enriquecida com CO_2 5% (AR+CO_2).	106
Figura 5.4:	(a) Crescimento de *I. galbana* em batelada alimentada *indoor*, ar enriquecido com CO_2 (5% v/v) (b) Concentração de nitrato no meio de cultura na batelada alimentada. As setas indicam a reposição de nutrientes no meio.	108
Figura 5.5:	Perfil de crescimento de *I. galbana* e consumo de nitrato em cultivo semicontínuo *indoor*. As setas indicam a reposição de nutrientes.	110
Figura 5.6:	Curva de Luz Rápida – cultivo semicontínuo, concentração celular (♦) 0,642 g.L^{-1} (■) 0,321 g.L^{-1}.	112
Figura 6.1:	Esquema do Protótipo da Seção Solar do Fotobiorreator.	115
Figura 6.2:	Coluna 1 do Fotobiorreator (FBR) e sua Interligação à Coluna 3.	120
Figura 6.3:	Separador Gás-Líquido (SGL) e o Topo da Coluna 1 do FBR.	120

Figura 6.4:	Tubos de Vidro Boro-Silicato (FBR) e Aspersor de Névoa de Resfriamento.	121
Figura 6.5:	Aspersor de Névoa de Resfriamento em Operação.	121
Figura 6.6:	Vista de Oeste para Leste do FBR .	122
Figura 6.7:	Tanque de Retorno de Líquido (TRL) no *solarium* do Lab. H2CIN.	123
Figura 6.8:	Filtro-Prensa da Planta de Separação de Biomassa (SBM).	126
Figura 6.9:	Gasômetro de Medição de Gás Exausto do SGL.	127
Figura 6.10:	Taxa de Líquido (L/h) no Rotâmetro 2 vs Taxa de Ar (L/h) no Rotâmetro 1. Pontos Experimentais: Círculos Azuis; Equação Ajustada: Vermelho.	130
Figura 6.11:	Taxa Real de Ar Consumido (NL/h) vs Taxa de Ar (L/h) no Rotâmetro 1. Pontos Experimentais: Círculos Azuis; Equação Ajustada: Vermelho.	131
Figura 7.1:	Monitoramento da segunda batelada.	138
Figura 7.2:	Pontos de amostragem no Fotobiorreator (a) Entrada;	139
	(b) Saída.	140
Figura 7.3:	Curva de crescimento de *I. galbana* em cultivo batelada *outdoor*, (a) batelada 12/07, (b) batelada 08/11. Entrada e Saída correspondem aos pontos de amostragem no fotobiorreator (Figura 7.2).	141
Figura 7.4:	Cultivo de *I. galbana* em carboy no terraço do Lab H2CIN.	143
Figura 7.5:	Fotobiorreator piloto - primeira batelada.	145
Figura 7.6:	Fotobiorreator piloto - segunda batelada.	146
Figura 7.7:	Contaminação em cultivo *outdoor* de *I. galbana* no Fotobiorreator piloto.	147
Figura 7.8:	Nitrato residual (a) 12/07; (b) 08/11 e	149
	fosfato residual (c) 12/07 (d) 08/11 no meio de cultivo em batelada *outdoor* de *I. galbana.*	150
Figura 7.9:	Variação do pH em cultivo batelada *outdoor* de *I. galbana*. (a) batelada 12/07, (b) batelada 08/11. (b) pHe = pH na entrada do FBR e pHs = pH na saída do FBR.	152
Figura 7.10:	Distribuição da concentração de carbono inorgânico dissolvido (DIC) no meio em $\mu mol.L^{-1}$no cultivo de *I. galbana* em batelada *outdoor*. Amostras da entrada (●,■,♦) e saída (+,*,★)do FBR na primeira batelada, t = 0 corresponde ao início do monitoramento naquele dia do cultivo. Os dados compreendem amostragem em três dias de injeção de CO_2; (●,+) 29° dia do cultivo, (■,*) 31° dia do cultivo, (♦,★) 38° dia do cultivo. Não houve injeção de CO_2 (cilindro fechado) em t = 0 no 29° dia do cultivo e no 31° dia do cultivo.	156

Figura 7.11: Distribuição da concentração de carbono inorgânico dissolvido (DIC) no meio em µmol.L^{-1}no cultivo de *I. galbana* em batelada *outdoor*. Amostras da entrada (vermelho) e saída (azul) do FBR na segunda batelada. O t = 0 corresponde ao início do monitoramento no 21° dia do cultivo, os dados compreendem amostragem em seis dias de injeção de CO_2. As setas indicam que nestes pontos (161 e 209 h) não houve injeção de CO_2 (cilindro fechado). 157

Figura 7.12: Variação da temperatura (°C) em cultivo de *I. galbana* em batelada *outdoor*. (a) batelada 12/07, (b) batelada 08/11. Tmax = temperatura máxima e Tmin = temperatura mínima. 160

Figure 7.13: Temperatura, irradiância e Composição bioquímica da *I. galbana* no cultivo batelada *outdoor* no Fotobiorreator. 162

Figura 7.14: Composição celular de lipídios ao longo do dia em termos de fluorescência (a) lipídios neutros (b) lipídios polares. FL2 é o canal que detecta na faixa 590-650 nm (Fluorescência laranja - lipídios neutros) e FL3 é o canal que detecta a 682 nm (Fluorescência vermelha - lipídios polares). 165

Figura 7.15: População de *I. galbana*, FSC= Foward Scatter (tamanho de partícula), SSC= Side Scatter (complexidade celular). 166

Figura 7.16: População de *I. galbana* de cultivo *outdoor* corada com Nile Red em FL2 (lipídios neutros), (a) entrada (28° dia de cultivo), (b) saída (28° dia de cultivo). 167

Figura 7.17: População de *I. galbana* de cultivo *outdoor* corada com Nile Red em FL2 (lipídios neutros), (a) entrada (30° dia de cultivo), (b) saída (30° dia de cultivo). 168

Figura 7.18: Curva de Luz Rápida (RLC) das amostras de entrada e saída do FBR adaptadas ao escuro e adaptadas à luz. 170

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1:	Fontes de Carbono	14
Tabela 2.2:	Comparação da Taxa Específica Máxima de Crescimento em Cultivos Autotróficos, Heterotróficos e Mixotróficos	14
Tabela 2.3:	Variação do Rendimento Celular com a Temperatura em cultivo de *Crypthecodinium cohnii*	15
Tabela 2.4:	Variação da Composição em Ácidos Graxos de *Crypthecodinium cohnii* ATCC 30556 com Temperatura e Tempo de Cultivo	16
Tabela 2.5:	Produtividade em Diferentes Temperaturas e Intensidades Luminosas.	19
Tabela 2.6:	Produtividade em diferentes sistemas de cultivo.	25
Tabela 2.7:	Comparação entre sistemas de cultivo de microalgas.	32
Tabela 2.8:	Produtividade de sistemas fechados para cultivo de microalgas.	33
Tabela 2.9:	Comparação entre Fotobiorreatores e lagoas (*raceway*).	33
Tabela 2.10:	Eficiência na Floculação.	37
Tabela 2.11:	Equipamentos Principais para Extração de Óleo Cru de Microalga.	40
Tabela 2.12:	Culturas para produção de biodiesel e áreas requeridas para cultivo.	43
Tabela 2.13:	Teor de óleo para algumas espécies de microalgas.	44
Tabela 2.14:	Composição do óleo e biodiesel derivado da microalga *I. galbana.*	44
Tabela 2.15:	Comparação entre o óleo de microalga, o diesel comum e o padrão ASTM para biodiesel.	45
Tabela 2.16:	Composição do Óleo de Microalgas X Óleo de Plantas Oleaginosas.	47
Tabela 2.17:	Bioprodutos de Alto Valor Agregado.	50
Tabela 3.1:	Composição elementar das principais biomoléculas (% em peso, WI).	59
Tabela 3.2:	*Screening* de microalgas- Composição bioquímica e taxa de crescimento.	63
Tabela 3.3:	Fórmula Empírica das Espécies de Microalgas após Tratamento de Informação Composicional Tipo 1 ou Tipo 2.	65
Tabela 3.4:	Correlações para estimar o HHV da biomassa de microalga	77
Tabela 3.5:	Poder Calorífico Superior (HHV) para as espécies selecionadas.	78
Tabela 3.6:	Condições ótimas para o cultivo de *Isochrysis galbana.*	88
Tabela 4.1:	Relações obtidas com as Alcalinidades.	95

Tabela 5.1:	Concentrações finais dos constituintes do meio de cultura (meio f/2) foram desprezadas as concentrações dos nutrientes presentes na água do mar.	99
Tabela 5.2:	Produtividade na batelada em corte.	111
Tabela 5.3:	Parâmetros fisiológicos da *I. galbana* em cultivo semicontínuo (conc. celular = 0,642 $g.L^{-1}$).	113
Tabela 6.1:	Volumes da Planta Piloto de Biorreação.	124
Tabela 6.2:	Dimensões do Fotobiorreator (FBR).	124
Tabela 6.3:	Dados Coletados no Teste de Escoamento da Planta Piloto.	129
Tabela 7.1:	Concentrações de nutrientes no fotobiorreator no início dos cultivos considerando volume de diluição inicial = 622 L.	136
Tabela 7.2:	Condições iniciais dos cultivos *outdoor.*	136
Tabela 7.3:	Composição elementar (% CHN) na biomassa seca de *I. galbana.*	164
Tabela 7.4:	Parâmetros fisiológicos da *I. galbana* em cultivo *outdoor* em fotobiorreator.	169

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

O foco no desenvolvimento sustentável se fortaleceu nos últimos anos devido às mudanças climáticas. O interesse em fontes de energia e matérias primas renováveis é demonstrado nas esferas política e social. No cenário mundial de combustíveis, e especialmente no cenário brasileiro após as descobertas das reservas de óleo e gás da Bacia do Pré-Sal, torna-se claro que as fontes fósseis ainda permanecerão economicamente relevantes por um bom período de tempo. Este fato é sustentado pelas comprovadas grandes reservas de carvão mineral ainda existentes no hemisfério norte, pela contínua descoberta de novas reservas de óleo e gás em jazidas tipo Pré-Sal em todo o mundo, pelo aumento da exploração do gás natural em substituição ao petróleo, e pelo aumento de eficiência nas tecnologias de produção de energia e de processamento de óleo e gás. Entretanto, as alterações atmosféricas decorrentes do uso do combustível de origem fóssil aumentaram o interesse na utilização dos biocombustíveis. As empresas de petróleo estão cada vez mais investindo em pesquisas na área de energias limpas. No Brasil, a ANP já determina o uso de combustível Diesel B5, onde 95% deste tem origem fóssil e os 5% restantes correspondem a biodiesel (BICALHO, 2009).

O biodiesel é derivado de óleos vegetais ou gordura animal, tendo como principal fonte vegetal as sementes oleaginosas como soja, mamona e canola. Grandes áreas de plantio são requeridas no cultivo de oleaginosas e podem comprometer a produção alimentícia (MURPHY *et al.* 2011). Decorre desta competição de uso que os preços dessas *commodities* agrícolas sofrem, com o efeito da sazonalidade, impactos de estoques, cenários climáticos mundiais e a alta volatilidade dos preços do petróleo. Adicionalmente, os biocombustíveis baseados nestas culturas requerem, na sua produção, solos férteis e água doce, competindo, portanto, com usos humano e industrial. O cultivo de microalgas apresenta-se como alternativa a tais conflitos, por ser possível usar água com diferentes níveis de salinidade - sem uso para consumo humano ou industrial, e apresentar alta taxa de crescimento - quando comparada aos cultivos agrícolas. Destaca-se que microalgas, além de micro-organismos capazes de capturar CO_2 e transformá-lo, por meio da fotossíntese, em triglicerídeos para produção de biodiesel e em macromoléculas de alto valor agregado como pigmentos (betacaroteno, astaxantina) e ácidos graxos polinsaturados (ômega 3, ômega 6), podem utilizar resíduos de processos como CO_2 (cultivos autotróficos) e resíduos orgânicos (cultivos

heterotróficos) (PITTMAN *et al*. 2011). Adicionalmente, a grande biodiversidade e a consequente variabilidade na composição bioquímica das microalgas associadas às novas tecnologias de colheita permitem o cultivo em larga escala, em um leque variado de aplicações industriais.

Apesar do preço dos biocombustíveis ser majoritariamente formado pelo custo da matéria-prima agrícola empregada – cerca de 70%, a margem de lucro característica de combustíveis é pequena face ao acréscimo dos custos de produção (capital e operacional) associados ao cultivo de microalgas. O biodiesel de microalgas tem sido alvo de pesquisas há anos (MIAO & WU, 2006; CHISTI, 2008; WU *et al.* 2012), entretanto, a viabilidade da produção em grande escala ainda não foi alcançada. O biodiesel de microalgas ainda não é economicamente competitivo com os combustíveis fósseis ou mesmo com o biodiesel de oleaginosas (ROSENBERG *et al.* 2011). A redução dos custos de produção ocorreria em decorrência de um aumento da eficiência fotossintética com consequente aumento na produtividade de biomassa e do teor de lipídios na biomassa. Relata-se um rendimento de óleo de 446 L/ha para soja enquanto que para microalgas haveria um valor potencial de 58700 L/ha (CHISTI, 2007) admitindo-se 30% de teor de óleo na biomassa algal. A busca de espécies de microalgas com elevada produtividade de lipídios visando à produção de biodiesel tem orientado pesquisadores a construir bancos de dados de espécies cultivadas em condições distintas (GRIFFITHS & HARRISON, 2009; HU *et al*. 2008).

Por outro lado, as altas taxas de crescimento das microalgas resultam em produtividade e menores áreas requeridas para cultivo. Ao mesmo tempo, a tecnologia algal permite reciclar o CO_2 emitido pela combustão de combustíveis fósseis, como, por exemplo, a emissão de termoelétricas (MATA *et al.* 2010). Este tipo de tecnologia, baseada em matérias primas renováveis, é classificada como Tecnologia Verde. Outro atributo desejável de uma Tecnologia Verde é reduzir os impactos ambientais através da reciclagem e reutilização de massa e energia (ANASTAS & ZIMMERMAN, 2003). É digno de nota que, do ponto de vista ambiental, uma avaliação do ciclo de vida é necessária para decidir quão "verde" uma tecnologia baseada em microalgas pode ser (BRENTNER *et al.* 2011; CLARENS *et al.* 2010; LARDON *et al.* 2009). Destaca-se que, devido à fotossíntese, as microalgas crescem capturando e fixando CO_2, portanto, mitigando as emissões de gases de efeito estufa e produzindo matéria-prima renovável

(biomassa). Além disso, a utilização de biomassa em processos industriais (produção de energia ou de produtos químicos) constitui uma reutilização de CO_2, que substitui matérias-primas fósseis.

1.1 OBJETIVOS

Neste cenário, o objetivo geral do presente trabalho é a seleção de microalga e sua produção em cultivo *outdoor* em fotobiorreator solar tubular dimensionado e construído como parte integrante desta pesquisa. Os objetivos específicos são:

1. Desenvolvimento de Metodologia de *Screening* de espécies com potencial para produção de biocombustíveis, a partir de resultados reportados na literatura;
2. Levantamento de dados em laboratório da composição bioquímica e condições de cultivo da microalga *Isochrysis galbana*, apontada no Objetivo 1*;*
3. Dimensionamento, construção e operação de fotobiorreator solar em escala piloto;
4. Cultivo *outdoor* de *Isochrysis galbana* em escala piloto.

1.2 ESTRUTURA DA TESE

O texto está estruturado em Capítulos. No Capítulo 2, a pesquisa é contextualizada dentro do atual estado da arte. No Capítulo 3 é apresentada a Metodologia de *Screening* desenvolvida para seleção de microalgas e os resultados de prospecção, indicando a microalga *Isochrysis galbana* como apropriada para aplicações de produção de energia e biocombustíveis. Com a seleção da espécie de microalga realizada, apresenta-se no Capítulo 4 a metodologia de análises químicas e bioquímicas para acompanhamento experimental. Experimentos em escala de bancada com a microalga selecionada são relatados no Capítulo 5. O projeto de fotobiorreator solar para crescimento de microalgas é apresentado no Capítulo 6, enquanto que a mudança de escala experimental para o fotobiorreator é reportada no Capítulo 7. O Capítulo 8 reúne as principais conclusões obtidas na prospecção de microalgas, testes de crescimento em escala de bancada e na operação do protótipo do fotobiorreator.

CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste Capítulo, a pesquisa é contextualizada com base em revisão da literatura, destacando-se a produção de lipídios para a produção de óleo de microalgas, visando aplicações em energia renovável.

2.1 BIOFIXAÇÃO DE CO_2

Os oceanos são responsáveis pela maior absorção de CO_2 da atmosfera via ciclo do carbono. A biofixação do CO_2 por microalgas ocorre durante a fotossíntese, onde a energia solar é convertida em energia química via oxidação da água, reduzindo CO_2 e liberando O_2. Esta energia química é estocada na célula na forma de diversas moléculas como amido e lipídios (SCHENK *et al.* 2008). A energia armazenada nessas moléculas pode ser utilizada como matéria prima para produção de biocombustíveis e bioprodutos de interesse industrial.

O processo fotossintético ocorre em organelas especiais, chamadas de cloroplastos. Essas organelas possuem membrana dupla, à semelhança do que é observado em mitocôndrias. A membrana externa é pouco seletiva à passagem de solutos, enquanto a interna é bastante seletiva a essa passagem. A porção interior dos cloroplastos (como um "citoplasma" dos cloroplastos) é chamada de estroma. No estroma, encontra-se a membrana tilacóide – uma membrana biológica que separa o estroma propriamente dito do lúmen. Esse isolamento, que pode ser qualificado como físico-químico, é fundamental para o funcionamento da fotossíntese (ALBERTS *et al.* 2008).

A membrana tilacóide é a estrutura dos cloroplastos que contém os pigmentos fotossintetizantes responsáveis pela absorção da energia luminosa. Desse modo, é onde ocorre a chamada etapa biofísica ou as reações luminosas da fotossíntese. O estroma contém o aparato bioquímico necessário para a assimilação de CO_2, processo chamado de etapa bioquímica ou reações de carboxilação da fotossíntese (Ciclo de Calvin).

As reações luminosas são a etapa na qual ocorre a formação de compostos de alta energia, como ATP e NADPH, a partir da utilização da energia luminosa. A energia

luminosa é convertida em energia química por meio de unidades funcionais – localizadas na membrana tilacóide – chamadas de fotossistemas. Os fotossistemas são constituídos por cerca de 200 a 400 moléculas de pigmentos associadas a proteínas e possuem dois componentes intimamente ligados: um complexo do centro de reação e o chamado "complexo antena". Os pigmentos acessórios – como as clorofilas *b*, *c* e *d*, os carotenóides e as ficobiliproteínas – fazem parte do complexo antena e têm como função principal absorver os fótons e transferir a energia para o complexo do centro de reação, onde as moléculas de clorofila *a* são excitadas e seus elétrons são transferidos para uma molécula aceptora de elétrons (NELSON & COX, 2011).

Nas algas, a luz é capturada por complexos proteínas-pigmentos chamados LHCI e LHCII. Estes complexos são responsáveis pela captura de luz e dissipação do excesso de energia, evitando que o centro reativo da fotossíntese seja inibido (fotoinibição), em particular, o fotossistema II (PSII). Em uma primeira etapa, o PSII utiliza energia luminosa para converter água em prótons, elétrons e oxigênio. Os elétrons passam através da cadeia transportadora de elétrons via plastoquinona (*PQ*), citocromos (*cyt*), fotossistema *I*, ferrodoxina (*Fd*) e NADPH. Simultaneamente, H^+ é liberado pela membrana tilacóide e pelo ciclo PQ/PQH_2. O gradiente de prótons comanda a produção de ATP via ATPsintase e, ao mesmo tempo, prótons e elétrons são recombinados via oxiredutase ferrodoxina NADP (FNR) para produção de NADPH. Tanto ATP quanto NADPH participam do ciclo de Calvin para produção de carboidratos, lipídios e outras biomoléculas.

Na etapa bioquímica da fotossíntese (ciclo de Calvin), ocorre a síntese de açúcares monossacarídeos a partir da fixação de CO_2. Configura-se como um ciclo na medida em que o substrato inicial da via – ribulose 1,5-bisfosfato (RuBP) – é regenerado no final da mesma. Na primeira etapa, o CO_2 reage com RuBP catalisado pela enzima ribulose 1,5-difosfato carboxilase/oxigenase (rubisco), a qual promove a incorporação de 1 átomo de carbono, oriundo de uma molécula de CO_2, a um substrato de 5 carbonos, a ribulose 1,5-bisfosfato. Esta enzima é de grande importância na fixação de CO_2 em todos os organismos fotossintéticos e é considerada a proteína mais abundante no Planeta. A rubisco tem duas funções: (a) carboxilação, na fotossíntese, e (b) oxigenação, na respiração em condições aeróbias. O_2 e CO_2 competem pelo mesmo

sítio ativo o que faz com que o excesso de O_2 promova inibição da fotossíntese e aumento da fotorespiração.

A produção de 1mol de glicose segue a equação geral do ciclo de Calvin:

$$6CO_2 + 12H^+ + 18ATP + 12NADPH \rightarrow \text{glicose 6-fosfato} + 18ADP + 17Pi + 12NADP^+ + 6H_2O$$

Os mols de NADPH e ATP consumidos podem ser oriundos tanto da fase biofísica da fotossíntese quanto de reações de oxidação de compostos orgânicos (glicólise, ciclo de Lynnen, ciclo de Krebs, outras) e fosforilação oxidativa (ALBERTS *et al.* 2008).

A denominação etapa "escura" (biofísica), dada a esta fase da fotossíntese, é imprópria, uma vez que esta etapa também depende de energia luminosa. O transporte de elétrons da fase "clara" (bioquímica), que só ocorre durante a iluminação de um organismo fotossintetizante, ativa indiretamente a chamada fase "escura". A rubisco, localizada no estroma do cloroplasto, torna-se ativa apenas em situação de valor elevado de pH (condição alcalina) associada a elevadas concentrações do cátion Mg^{2+}. No estroma, esse cenário só é efetivamente atingido durante a fase "clara" da fotossíntese. Outras enzimas da etapa "escura", também localizadas no estroma – como frutose 1,6-bisfosfatase, sedoeptulose 1,7-bisfosfatase, ribulose 5-fosfato quinase – além de dependerem das mesmas condições descritas para rubisco, também dependem dos elétrons oriundos da foto-oxidação do fotossistema I (PS I) para exibirem atividade. Via tiorredoxina, esses elétrons mantêm os grupamentos tiol (-SH) destas enzimas no estado reduzido e ativo. Um esquema do processo de fotossíntese é apresentado na Figura 2.1 (NELSON & COX, 2011).

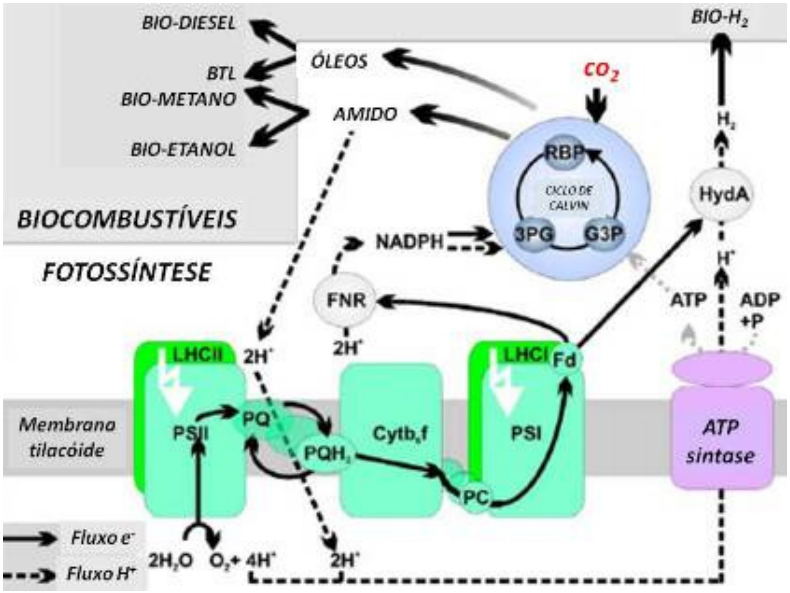


Figura 2.1: Esquema da Fotossíntese
Fonte: Adaptado de Schenk et al. (2008)

De acordo com WILHELM E SELMAR (2011), o "material biológico" não permite converter elevados fluxos de luz em crescimento com alta eficiência. Assim, a dissipação de energia é o ajuste da fisiologia das células à luz e, portanto, a produtividade da planta poderia ser maior se o "desperdício de energia" fosse utilizado para o crescimento. Especialmente em algas, a produtividade muito elevada tem sido buscada com a otimização e adequação de projetos de fotobiorreatores (POSTEN, 2009; SATO *et al.* 2010). No entanto, a fisiologia das células mostra os reais limites biológicos e físicos. Isto é, a disponibilidade de CO_2 e a elevada luminosidade decorrentes de projetos otimizados de fotobiorreatores promove o aumento da taxa de crescimento celular até atingir os limites impostos por saturação luminosa, diferenciados para cada espécie.

2.2 METABOLISMO DE LIPÍDIOS

A composição lipídica das microalgas varia de acordo com a espécie e as condições de cultivo. As classes de lipídios são basicamente divididas em lipídios neutros (triglicerídeos, colesterol) e lipídios polares (fosfolipídios). As principais rotas de síntese de lipídios em células vegetais são: (a) a formação de Acetil-CoA no citoplasma, (b) o alongamento e a dessaturação da cadeia carbônica na formação dos ácidos graxos e (c) a biossíntese de triglicerídeos (NELSON & COX, 2011).

Tanto no cultivo autotrófico como no heterotrófico, o fosfogliceraldeído é o intermediário-chave na formação da Acetil-CoA. O Ciclo de Calvin é responsável pela formação do fosfogliceraldeído (G3P), que é exportado para o citoplasma onde segue o fluxo de carbono via reações de formação de açúcares e reações de oxidação da via glicolítica (Figura 2.2). Com a formação da Acetil-CoA, a partir do piruvato via glicólise, tem início a biossíntese de lipídios – com a formação de ácidos graxos – catalisada pela enzima ACC (Acetil-CoA carboxilase) (Figura 2.3). Em células animais, a ACC é localizada no citoplasma e, portanto, utiliza a Acetil-CoA citosólica na formação da malonil-CoA e alongamento da cadeia acila. Nas plantas, a síntese de ácidos graxos ocorre inteiramente em plastídeos de sementes em desenvolvimento, e a ACC usa a Acetil-CoA que é encontrada nesta organela. A ACC plastídica tem uma estrutura diferente da ACC citosólica, sendo uma enzima do tipo procariótica de multi-subunidades, ao contrário do tipo multifuncional eucariótica localizada no citoplasma (COURCHESNE *et al.* 2009).

A ACC exerce forte controle metabólico na síntese de ácidos graxos e tem sido superexpressada na intenção de aumentar o rendimento em lipídios. ROESLER *et al.* (1997) superexpressou a ACC citosólica de *Arabidopsis* em plastídeos de *Brassica napus* (canola) com um aumento de até 2 vezes da atividade da ACC plastídica. No entanto, o teor de ácidos graxos foi apenas 6% superior ao do experimento Controle, sugerindo que um ponto de estrangulamento secundário, ou seja, mais um passo limitante, na via de síntese de ácidos graxos, pode ter surgido como resultado da remoção do gargalo primário. A ACC foi isolada de microalgas e superexpressa com sucesso em diatomáceas *Cyclotella cryptica* e *Navicula saprophila*. Não foi observado qualquer aumento significativo do acúmulo de lipídios em diatomáceas transgênicas (DUNAHAY *et al.* 1995; DUNAHAY *et al.* 1996). A observação pode ser atribuída a: (1) etapa catalisada pela ACC não ser o passo limitante nestas espécies, e/ou (2) etapa limitante secundária, isto é, um gargalo se manifestar quando a ACC é superexpressa (COURCHESNE *et al.* 2009).

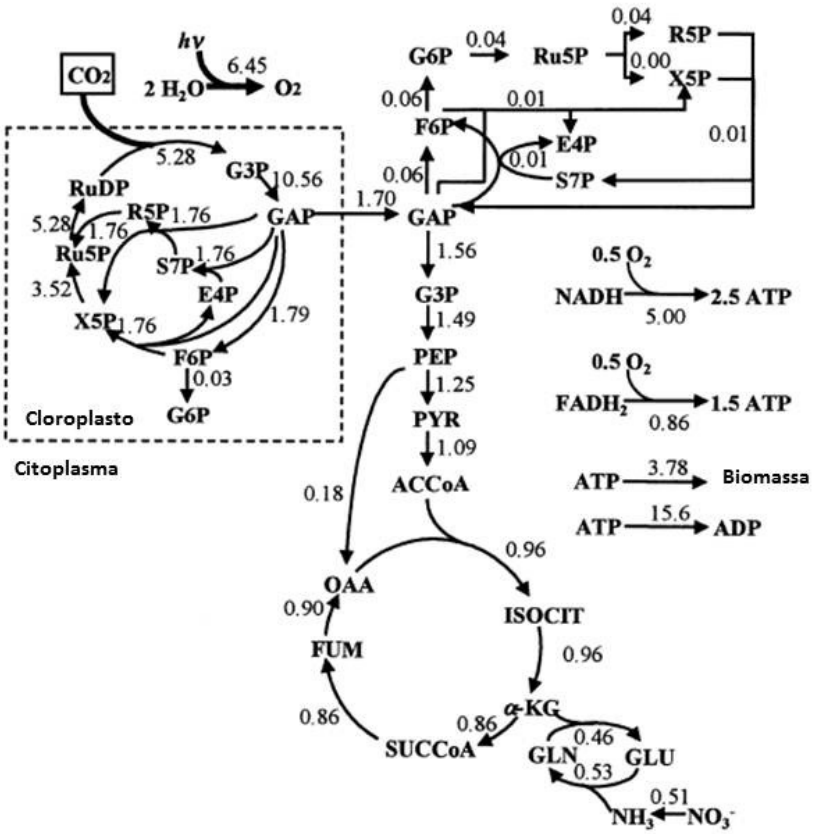


Figura 2.2: Fluxo metabólico de células de *Chlorella* em cultivo autotrófico: reações de assimilação de CO_2 ocorrem no cloroplasto (Ciclo de Calvin) onde ATP e NADPH são usados para reduzir CO_2 a trioses-fosfato, que segue através da via glicolítica e do ciclo de Krebs para a formação de compostos orgânicos como lipídios e carboidratos, bem como biomassa. Os valores de fluxo são expressos em mmol/g.h. (AcCoA- Acetil-coenzima A, αKG- α-cetoglutarato, ATP-Adenosina trifosfato, E4P-Eritrose-4-fosfato, F6P- Frutose-6-fosfato, FADH2- Adenina flavina dinucleotídeo, FUM- Fumarato,G3P- 3-Fosfoglicerato, G6P- Glicose-6-fosfato,GAP - Gliceraldeído-3-fosfato, GLC- Glicose, GLN-Glutamina, GLU-Glutamato, ISOCIT- Isocitrato, NADH- Adenina nicotinamida dinucleotídeo, OAA- Oxaloacetato, PEP- Fosfoenolpiruvato, PYR- Piruvato, R5P- Ribose-5-fosfato, Ru5P- Ribulose-5-fosfato, RuDP- Ribulose-1,5-bisfosfato,S7P- Sedoeptulose-7-fosfato, SUCCoA- Succinil-coenzima A, X5P- Xilulose-5-fosfato)**.** Fonte: Yang et al. (2000)

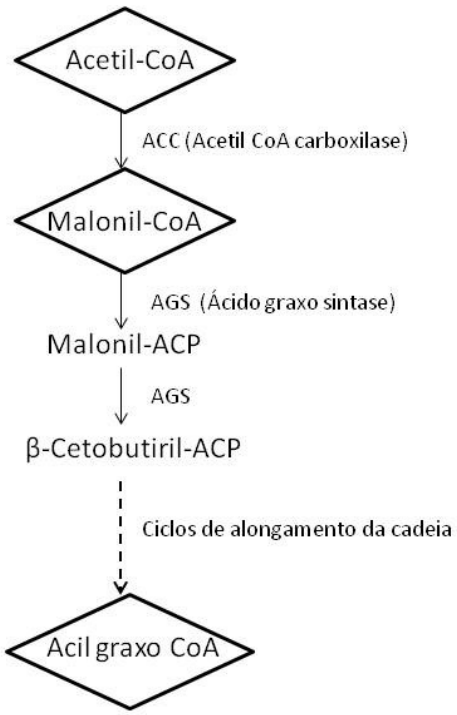


Figura 2.3: Formação de ácidos graxos. A malonil CoA é formada a partir de acetil CoA e bicarbonato, esta etapa é um processo irreversível catalisado pela acetil-CoA-carboxilase; nas etapas seguintes o complexo proteico AGS catalisa as etapas de formação do cetobutiril, a proteína ACP (*acil carrier protein*) é a transportadora de grupos acila do complexo AGS. Fonte: Courchesne et al. (2009)

Os triglicerídeos são lipídios neutros com a função de armazenamento de energia nas células. Geralmente, L-fosfoglicerol e Acetil-CoA são os dois grandes iniciadores na biossíntese de triglicerídeos. O L-α-fosfoglicerol deriva principalmente da fosfodiidroxiacetona que é o produto do processo de glicólise. As etapas de reação são apresentadas na Figura 2.4. Uma das hidroxilas no L-α-fosfoglicerol reage com Acetil-CoA para formar ácido lisofosfatídico e depois combina com outra molécula de Acetil-CoA para formar ácido fosfatídico. Estas duas reações são catalisadas pela enzima Fosfato Glicerol Acil-Transferase. Nas etapas seguintes, o ácido fosfatídico é hidrolisado pela enzima Fosfatase para formar diglicerídeo, que é então combinado com a terceira Acetil-CoA para completar a biossíntese de triglicerídeos. A última etapa da reação é catalisada pela enzima Gliceril Diéster Transacilase (NELSON & COX, 2011).

.

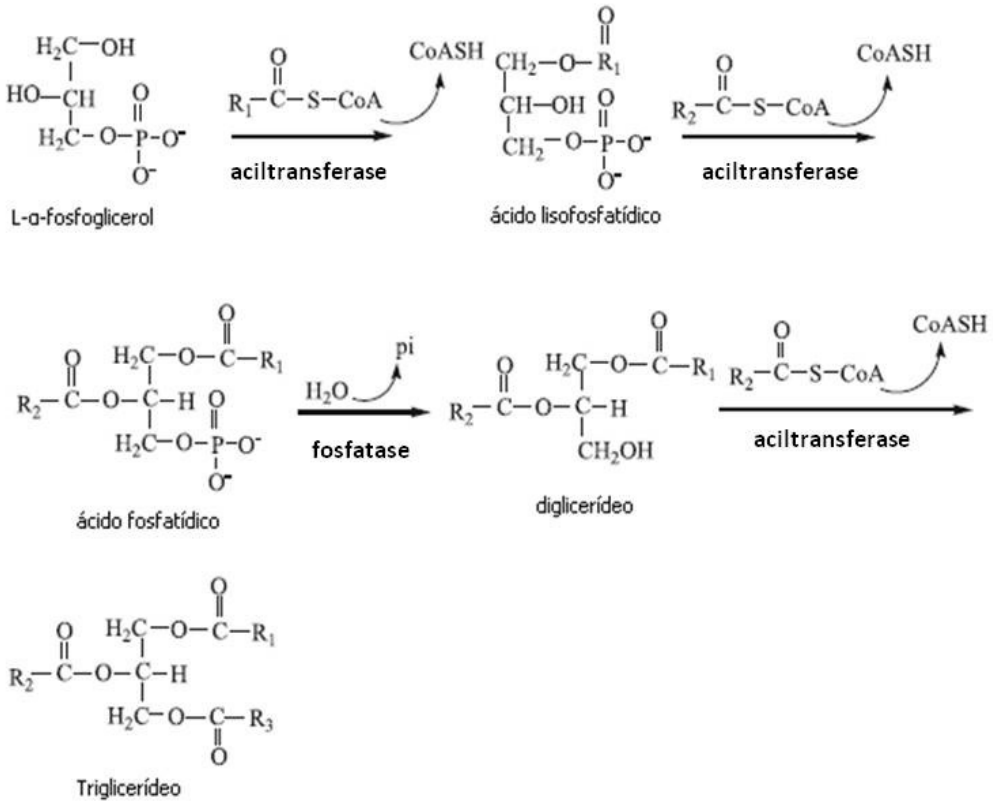


Figura 2.4: Biossíntese de triglicerídeos em microalgas.
Fonte: Adaptado de Huang et al. (2010)

STEPHENSON *et al.* (2011) considera que no cultivo massivo de algas marinhas para produção de biocombustíveis, a conversão da energia solar para lipídios (especificamente, lipídios neutros de armazenamento, tais como triacilglicerídeos, TAG) é o ponto crítico (Figura 2.5).

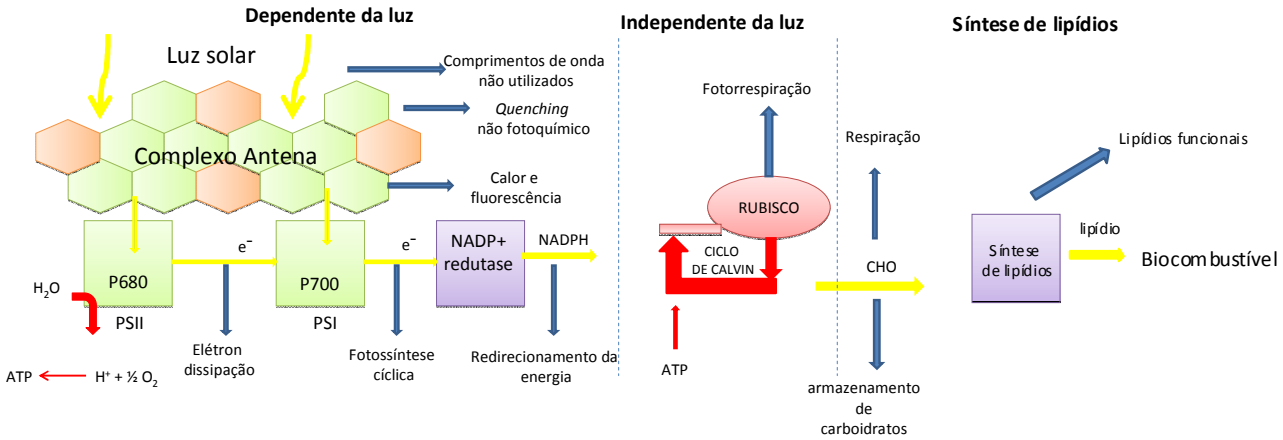


Figura 2.5: Conversão fotossintética de energia solar.
Fonte: Adaptado de Stephenson *et al.* (2011)

Para otimizar a eficiência de conversão de energia solar em lipídios, as fases indicadas pelas setas amarelas na Figura 2.5 devem ser maximizadas e os termos de perda, indicados pelas setas azuis, necessitam ser minimizados (STEPHENSON *et al.* 2011).

2.3 VARIÁVEIS QUE IMPACTAM A TAXA DE CRESCIMENTO E A PRODUÇÃO DE METABÓLITOS DE INTERESSE

O crescimento das microalgas pode ser afetado por condições relacionadas à região onde o cultivo está sendo realizado – e.g., radiação solar, vento, evaporação e temperatura, e as condições que podem ser estrategicamente administradas como salinidade, concentração de nutrientes, concentração de CO_2, mistura, aeração e tempo de residência. O local do cultivo deve ter uma boa incidência solar e temperaturas amenas e estáveis. Quanto às condições que podem ser controladas, a salinidade é normalmente empregada entre a concentração do ambiente nativo da espécie e a sua máxima tolerância. A concentração de nutrientes e de CO_2 é variada de acordo com o bioproduto desejado e a tolerância máxima a CO_2. Outros fatores são ajustados de acordo com o processo e a espécie cultivada.

2.3.1 FONTE DE CARBONO

O cultivo de microalgas pode ser autotrófico, heterotrófico ou mixotrófico. Em cultivos heterotróficos, fontes de carbono orgânico são adicionadas ao meio de cultivo. O uso de efluentes industriais ou domésticos como fonte de carbono é pouco reportado na literatura, pois pode levar à contaminação do cultivo com outras espécies que estabelecerão uma competição com as microalgas inibindo o seu crescimento, além de introduzirem possíveis agentes químicos tóxicos. WU *et al.* (2005) utilizaram glicose e outros açúcares no cultivo de *Schizochytrium sp.* para produção de DHA (ácido docosahexaenóico), obtendo melhor resultado com glicose na concentração de 20 g/L. CHISTI (2007) menciona que o crescimento heterotrófico não seria muito eficiente, pois requer fonte de carbono, que em última instância decorrem de plantas fotossintéticas. Outro problema muito comum, principalmente ao se utilizar uma fonte de carbono orgânico como a glicose, é a contaminação por bactérias. A Tabela 2.1 apresenta algumas espécies em cultivo heterotrófico com diferentes fontes de carbono e

a Tabela 2.2 mostra taxas específicas de crescimento para cultivos autotróficos, heterotróficos e mixotróficos.

O crescimento mixotrófico combina os metabolismos autotróficos e heterotróficos e tem sido utilizado como estratégia para aumentar a concentração de um bioproduto ou a taxa de crescimento (GARCIA *et al.* 2006). LIU & LIN (2001) observaram o aumento da concentração de DHA na célula de *Isochrysis* sp. em cultivo mixotrófico (acetato de sódio na concentração de 10mM). ARANTES *et al.* (2010) realizaram comparação entre diferentes espécies de microalgas cultivadas em meios de cultura autotróficos, mixotróficos e heterotróficos, em termos de custo e produção de biomassa. De acordo com os autores, o cultivo mixotrófico resultou no maior rendimento em biomassa, o que é justificado pelo uso de uma fonte adicional de carbono, o que minimizaria os efeitos do autossombreamento em cultivos autotróficos com elevada densidade celular. Entretanto, a microalga *I. galbana* apresentou o melhor desempenho em cultivo autotrófico, e o custo de produção foi o menor, entre todos os analisados, incluindo os cultivos mixotróficos e heterotróficos.

Tabela 2.1: Fontes de Carbono

Microalga	Substrato orgânico	Referência
Brachiomonas submarina	Acetato	Tsavalos e Day, 1994
Chlamydomonas reinhardtii	Acetato	Chen e Johns, 1996
Chlorella pyrenoidosa	acetato, glicose	Gladue e Maxey, 1994
	lactato, glutamato	Running et al.,1994
Chlorella regularis	acetato, glicose, etanol	Endo et al.,1977
Chlorella saccharophila	Glicose	Tan e Johns, 1991
Chlorella sorokinianna	Glicose	Chen e Johns, 1991
Chlorella vulgaris	acetato, glicose	Gladue e Maxey, 1994
	lactato, glutamato	Gladue e Maxey, 1994
Dunaliella salina	acetato, glicose	Gladue e Maxey, 1994
	lactato, glutamato	Gladue e Maxey, 1994
Dunaliella tertiolecta	Glicose	Gladue e Maxey, 1994
Euglena gracilis	acetato, glicose	Cook e Heinrich, 1965
	alanina, aspartato, asparagina	Ogbonna et al., 1998
	glutamina, etanol	Ogbonna et al., 1998
Haematococcus pluvialis	acetato, asparagina	Kobayashi et al., 1997
Nannochloropsis oculata	Glicose	Gladue e Maxey, 1994
Nitzschia alba	acetato, glicose	Lewin e Lewin, 1967
	Glutamato	Barclay et al., 1994
Poteriochromonas malhamensis	glicose, extrato de levedo	Gladue, 1991
Scenedesmus acutus	Glicose	Ogawa e Aiba, 1981
Tetraselmis chuii	Glicose	Gladue e Maxey, 1994
Tetraselmis suecica	acetato, glicose	Gladue e Maxey, 1994
	lactato, glutamato	Day et al., 1991
Tetraselmis tetrathele	acetato, glicose	Gladue e Maxey, 1994
	lactato, glutamato	Gladue e Maxey, 1994
Tetraselmis verrucosa	Glicose	Gladue e Maxey, 1994

Fonte: Lee, 2001.

Tabela 2.2: Comparação da Taxa Específica Máxima de Crescimento em Cultivos Autotróficos, Heterotróficos e Mixotróficos

Taxa específica de crescimento máxima (h^{-1})				
Espécies	**Autotrófico**	**Heterotrófico**	**Mixotrófico**	**Referência**
Chlorella vulgaris	0,082	0,038 (glicose)	-	Droop, 1974
Chlorella pyrenoidosa	0,11	0,098 (glicose)	0,198 (glicose)	Ogawa e Aiba, 1981
Chlorellla pyrenoidosa	0,081	0,050 (glicose)	0,131 (glicose)	Martinez e Orus, 1991
Haematococcus pluvialis	-	0,014 (acetato)	0,037(acetato)	Droop, 1955
Haematococcus pluvialis	0,013	0,009 (acetato)	0,024 (acetato)	Kobayashi et al., 1992
Scenedesmus acutus	0,061	0,040(glicose)	0,048 (glicose)	Ogawa e Aiba, 1981
Spirulina platensis	0,028	0,008(glicose)	0,026 (glicose)	Chen et al., 1996; Marquez et al., 1995

Fonte: Lee, 2001.

2.3.2 TEMPERATURA, CONCENTRAÇÃO DE CO_2 E pH

A operação em baixas temperaturas (menores que 20°C), normalmente associadas a baixa intensidade solar, apresenta menor produtividade, o que eleva os custos de produção (NEEMAN *et al.* 1986). Além disto, apesar de fatores como luz e nutrientes terem maior influência em culturas, a temperatura pode alterar a concentração e o perfil de lipídios. JIANG & CHEN (2000) avaliaram o crescimento e a composição em ácidos graxos da microalga *Crypthecodinium cohnii* (meio de cultura contendo 5 g/L de glicose) a 15, 20, 25 e 30°C, e observaram bom crescimento celular em todas as temperaturas, com uma taxa de crescimento específica um pouco superior ocorrendo a 30°C (Tabela 2.3). Entretanto, os autores registraram que a concentração em ácidos graxos poliinsaturados foi maior na menor temperatura (15°C) estudada, enquanto a concentração de ácidos graxos saturados apresentou tendência a se elevar com o aumento da temperatura. Os autores também notaram maior concentração lipídica no início da fase estacionária (72 h). Com a desaceleração do crescimento, ocorre acúmulo de lipídios como reserva energética da célula. A Tabela 2.4 apresenta a variação na composição de ácidos graxos com a temperatura e o tempo de cultivo observado pelos autores.

Tabela 2.3: Variação do Rendimento Celular com a Temperatura em cultivo de *Crypthecodinium cohnii*

Temperatura	15°C	20°C	25°C	30°C
Taxa Específica de Crescimento (h^{-1})	0,076	0,078	0,084	**0,092**
Concentração de Biomassa (g/l)	1,75	1,79	2,24	**2,42**
Rendimento em células (g/g)	**0,35**	**0,36**	**0,45**	**0,48**

Fonte: Jiang & Chen (2000)

Tabela 2.4: Variação da Composição em Ácidos Graxos de *Crypthecodinium cohnii* ATCC 30556 com Temperatura e Tempo de Cultivo

			Ácidos Graxos (% do total de ácidos graxos)					
		Tempo (h)	12:00	14:00	16:00	18:00	22:05	22:06
Temperatura	15 °C	24	2,1	15,15	17,14	12,13	0,2	52,31
		48	1,86	14,12	15,24	11,9	0,18	55,63
		72	0,75	13,92	14,83	10,8	0,92	57,64
		96	1,08	15,72	16,43	13,12	0,16	52,97
	20°C	24	2,12	15,43	17,7	12,06	0,08	51,6
		48	1,73	14,73	11,23	1,25	0,1	55,55
		72	1,78	13,98	14,73	10,29	0,38	57,32
		96	1,09	15,98	16,61	12,49	0,19	52,75
	25°C	24	2,57	16,65	19,44	9,56	0,32	51,03
		48	2,23	14,94	18,65	9,1	0,25	54,31
		72	2,12	14,17	18,35	8,26	0,26	56,41
		96	2,95	15,54	19,46	11,1	0,23	50,95
	30°C	24	5,81	25,67	29,89	12,71	0,58	24,49
		48	5,97	26,03	30,16	13,31	0,34	23,61
		72	5,23	28,75	31,45	14,03	0,26	19,81
		96	5,66	29,98	32,05	14,72	0,48	16,79

Fonte: Jiang & Chen (2000)

Apesar de grande parte das espécies de algas apresentarem temperatura ótima em termos de crescimento celular entre 20-30º C, algumas espécies – ditas termotolerantes – têm bom rendimento em temperaturas entre 40º-50ºC. KURANO *et al.* (1995) realizaram prospecção (*screening*) de microalgas objetivando identificar espécies termotolerantes, resistentes a altas concentrações de CO_2 e a meios extremamente ácidos. Com temperatura em 50ºC, pH=1, 10% de CO_2 e aeração com 50 ppm de NO_x, os autores identificaram três espécies: *Cyanidium caldarium, Galdieria partita e Cyanidioschyzon melorae*. Neste mesmo estudo, a tolerância a altas concentrações de CO_2 foi analisada e *Chlorococcum littorale* apresentou uma taxa de crescimento de 1,87 d^{-1} com 20% de aeração em CO_2 a uma vazão de 1L/min. Quando gás de chaminé (9.5-16.5% de O_2, 2.0-6.5% de CO_2, 287-321 ppm de SO_2 e 20-60 ppm de NO_x) foi utilizado como fonte de CO_2, apenas *Galdieria partita* manteve crescimento. De acordo com os autores, nenhuma planta terrestre sobrevive a tais condições de estresse e consideraram *Galdieria partita* a melhor espécie para fixação de CO_2 proveniente de emissões de gases industriais sem pré-tratamento.

Nota-se que o aumento da concentração de CO_2, em geral, é seguido pelo aumento da taxa de crescimento celular, com limites dependentes da espécie avaliada. Por exemplo, YANG & GAO (2003) observaram que elevadas concentrações de CO_2 na

cultura aumentaram a fotoinibição de *Chlamydomonas reinhardtii*, mas reduziram a fotoinibição em *Scenedesmus obliquus* e em *Chlorella pyrenoidosa*.

Com referência à assimilação de carbono por microalgas, ressalta-se que o carbono inorgânico apresenta-se em solução aquosa como CO_2, H_2CO_3, HCO_3^- e $CO_3^=$, cujo equilíbrio é descrito pelas equações químicas abaixo:

$$CO_2(aq) + H_2O \longleftrightarrow H_2CO_3 \longleftrightarrow H^+ + HCO_3^- \longleftrightarrow 2H^+ + CO_3^=$$

A predominância de uma forma ou de outra depende de pH e de temperatura: uma queda em pH resulta na predominância de CO_2. Duas enzimas são as principais responsáveis pelo transporte do CO_2 e pela assimilação no ciclo de Calvin: Anidrase Carbônica e Rubisco. Outros mecanismos como difusão e transporte ativo também ocorrem na célula. No ambiente marinho, o impacto da limitação de CO_2 na fotossíntese é minimizado por um mecanismo interno de acúmulo de carbono inorgânico (CCM), no qual as espécies marinhas realizam o transporte ativo de CO_2 e HCO_3^-, via anidrase carbônica externa, que interconverte CO_2 em HCO_3^- e vice-versa, mantendo um equilíbrio entre o exterior e a célula (BHATTI *et al.* 2002). Altas concentrações de CO_2 aumentam a carboxilação da enzima Rubisco e deprimem a sua oxidação, o que resulta no aumento da eficiência fotossintética. Por outro lado, a limitação a altas concentrações de CO_2 está ligada à presença de anidrase carbônica externa (enzima que catalisa a interconversão de HCO_3^- e CO_2) e de sua atividade (YANG & GAO, 2003). Desta forma, o uso de HCO_3^- ou CO_2 depende da espécie e das condições do meio. Isto é, se nutrientes e radiação estão em quantidades ótimas, a espécie que utiliza HCO_3^- assimilará maiores quantidades de CO_2, o que é uma vantagem em relação aos fitoplânctons que utilizam apenas CO_2. Muitas espécies utilizam tanto HCO_3^- quanto CO_2 e algumas utilizam um ou outro. Não há muitos estudos sobre este mecanismo bioquímico, poucas espécies foram avaliadas quanto à forma de carbono inorgânico preferencialmente assimilada. CAMIRO VARGAS *et al.* (2005) realizaram medidas de concentração de carbono inorgânico dissolvido no meio de cultura para *Isochrysis galbana e Rhodomonas sp.* e observaram que *I. galbana* teve crescimento até o terceiro dia quando ainda havia CO_2 e pH estava em nível inferior a 9, enquanto *Rhodomonas sp.* permaneceu crescendo em ausência de CO_2 com pH final maior que 10. Após o

terceiro dia, aeração apenas com ar não foi suficiente para manter a *I. galbana* crescendo e um suprimento extra de CO_2 foi necessário.

Quando o sistema é operado em condições ótimas, a eficiência na captura de CO_2 pode ser de 99% (ZEILER *et al.* 1995). Baseado na equação da fotossíntese, 1,47g de CO_2 são necessários para produzir 1g de glicose.

$$6CO_2 + 6H_2O + Luz + Clorofila = C_6H_{12}O_6 + 6O_2$$

De acordo com KURANO *et al.* (1995), para a fixação de 4g CO_2 $.L^{-1}.d^{-1}$ com uma taxa de crescimento de 2,5 $g.L^{-1}.d^{-1}$, a razão é de 1,6 g de CO_2 para 1g de alga produzida. Considerando-se a conversão de glicose em outros componentes como lipídios ou carboidratos dependendo das condições do meio, o consumo de CO_2 pode chegar a 2 g de CO_2 para 1g de alga. Para uma taxa de crescimento de 50 $g.m^{-2}$ dia, é possível, para um hectare de lagoas de alga, sequestros acima de 1 tonelada de CO_2 por dia. OLAIZOLA (2000) obteve uma produtividade de 13 g/m^2dia para *Haematococcus pluvialis* em fotobiorreator ($100m^2$), que resultou em taxa de captura de CO_2 de 24 g/m^2dia. NAKAMURA *et al.* (2005) descrevem que para uma planta de produção de astaxantina (*Haematococcus pluvialis)* com 12 ha de área total, sendo 7 ha de área de cultivo e 5 ha de área de sistemas auxiliares, uma produtividade de 8g $C.m^{-2}.d^{-1}$ e com uma eficiência de utilização do CO_2 de 12%, 1,6 toneladas de CO_2 por dia seriam captadas.

2.3.3 INTENSIDADE LUMINOSA

A eficiência da fotossíntese depende diretamente da quantidade de luz disponível para a célula. Os sistemas de cultivo, principalmente os fotobiorreatores, são otimizados em sua geometria para alcançar a maior área iluminada possível, o que resulta em maiores taxas de crescimento e também em culturas mais densas. Densificar culturas é o objetivo nos cultivos onde se deseja produtividade em biomassa, mas o aumento da densidade celular pode causar sombreamento, diminuindo a área iluminada e consequentemente a taxa específica de crescimento. Uma solução para este problema é o aumento da turbulência por sistemas eficientes de aeração (UGWU *et al.* 2005). A Tabela 2.5 apresenta variações de luz e temperatura resultando em diferentes produtividades para a microalga *Nannochloropsis oceanica*.

Tabela 2.5: Produtividade em Diferentes Temperaturas e Intensidades Luminosas

	Faixa de baixa temperatura			Faixa de média temperatura			Faixa de alta temperatura		
Produção máxima diária (mg/L/d)	434	434	783	395	463	688	244	313	539
Faixa de temperatura (º C)	19,28 ±0,84	17,47 ±0,64	18,70 ±0,97	23,34 ±1,09	23,77 ±1,47	24,11 ±1,21	28,53 ±0,91	29,52 ±1,12	29,43 ±1,12
Luminosidade total (µmol fótons/m^2 s)	742	763	1246	467	598	1032	475	598	1045

Fonte: Sandnes et al. 2005

Um fenômeno muito observado em culturas *outdoor*, que também afeta o crescimento das microalgas, é a fotoinibição. Ela reduz a taxa de crescimento, o que ocorre por danos reversíveis causados ao sistema responsável pela fotossíntese na biomassa. A resistência à fotoinibição é uma característica da espécie. Por exemplo, a microalga *Phaeodactylum tricornutum* tem uma constante de saturação luminosa de 185 µE/m^{2}s. O valor desta constante é normalmente bem menor que a intensidade luminosa ao meio dia nas regiões equatoriais que é da ordem de 2000 µE/m^{2}s (CHISTI, 2007). A diminuição da fotoinibição pode aumentar significativamente a produtividade em células. Fatores como turbulência, concentração de células, propriedades óticas da cultura, diâmetro do tubo e níveis de irradiação externa afetam diretamente as zonas de luz e de escuridão que se formam nos fotobiorreatores. Como, para uma alta produtividade, a concentração de células deve ser alta em fotobiorreatores, diferentes mecanismos como, por exemplo, misturadores estáticos (UGWU *et al.* 2005), são empregados para melhorar a distribuição das células e consequentemente a distribuição de luz em toda a cultura, o que aumenta a produtividade em relação a uma área única com iluminação constante (CHISTI, 2007).

2.3.4 AERAÇÃO

A aeração é importante para manter o fluxo de CO_2 e como mecanismo de exaustão de O_2, mantendo a sua concentração abaixo da saturação. A alta concentração de O_2 inibe a fotossíntese e a célula passa a realizar fotorrespiração, o que limita o crescimento. O acúmulo de CO_2 na célula pela aeração constante e em altas taxas pode eliminar este problema, mas o limite de cada espécie ao aumento da concentração de CO_2 deve ser observado. A remoção do oxigênio por sistemas de exaustão de gases também é largamente empregada. Uma aeração eficiente, reduzindo o tamanho das

bolhas de gás, contribui para o aumento da taxa de transferência de massa gás-líquido. Outra contribuição importante da aeração ocorre em culturas densas, onde uma boa mistura evita o acúmulo de células nos locais de baixa iluminação no sistema de cultivo (MOLINA GRIMA *et al*. 2001).

2.3.5 CONDIÇÕES NUTRICIONAIS

A composição bioquímica celular é altamente afetada pela composição nutricional do meio de cultura. As concentrações de nitrogênio, fósforo, ferro, zinco e outros metais podem influenciar a concentração de um determinado metabólito. A fonte química destes nutrientes também pode causar impacto na concentração celular de biomoléculas importantes como lipídios, carboidratos, proteínas e pigmentos.

Em condições de estresse, provocadas por fatores ambientais ou nutricionais, as células interrompem sua divisão e passam a fixar o CO_2 para sintetizar carboidratos e lipídios como reservas energéticas (XIN *et al.* 2010). A restrição de nitrogênio inorgânico em meios de cultura é um dos fatores que mais influenciam no crescimento e na composição bioquímica das algas. Esse estresse altera o fluxo fotossintético de fixação de carbono, induzindo um aumento no acúmulo de carboidratos e lipídios pelas células (HERZIG & FALKOWSKI, 1989).

FIDALGO *et al.* (1998) estudaram o efeito na composição bioquímica da microalga *Isochrysis galbana* para diferentes fontes de nitrogênio. Nitrato, nitrito e uréia foram avaliados pelos autores, que observaram não haver diferença significativa na composição bioquímica entre as diferentes fontes, mas constataram um acúmulo significativo de lipídios e carboidratos da fase exponencial para a fase estacionária, e a diminuição da concentração de proteínas na célula. A composição de lipídios também foi alterada nas fases de crescimento. Durante a fase exponencial, os fosfolipídios (lipídios polares) apresentam maior quantidade, enquanto na fase estacionária do crescimento os triglicerídeos (lipídios neutros de reserva energética) são acumulados. A disponibilidade de nutrientes mantém o aparato metabólico no sentido de formação de biomassa ativo, mantendo assim alta a produção de proteínas. Quando ocorre escassez de nutrientes a célula passa a acumular reservas energéticas como lipídios e carboidratos. CHAGAS (2010) cultivou *I. galbana* em diferentes razões N:P (15, 5 e

2,5) e verificou um aumento no teor de lipídios nos cultivos com N:P= 5,0 (teor de lipídios na fase estacionária foi de 33,90%) e N:P= 2,5 (teor de 31,41%), um aumento de 87,6% e 73,8% em relação ao controle (N:P=15), respectivamente.

Alguns metais podem ser dosados em maior quantidade para estimular a célula à produção de biomassa ou metabólitos. De acordo com YINGYING & CHANGHAI (2009), o zinco é essencial para manter a atividade da metaloenzima Anidrase Carbônica Externa. A concentração de 10 μmol/L de Zn^{+2} manteve o crescimento ótimo de *Isochrysis galbana,* enquanto concentrações acima de 1000 μmol/L levaram à inibição do crescimento e poderiam provocar a morte celular por toxicidade.

2.4 FOTOBIORREATORES

Os principais sistemas utilizados para produção de microalgas são as lagoas e os fotobiorreatores. As lagoas mais empregadas são do tipo *raceways* que consistem de um tanque em canais com recirculação, dotados de sistema de agitação com pá giratória. Este arranjo é utilizado há vários anos para produção de microalgas com fins alimentícios, por ser de fácil operação, simples e não requer grandes investimentos em engenharia para construção e operação. Em geral, a produtividade das lagoas é de 0,5 $g.L^{-1}d^{-1}$ no máximo - bem inferior à apresentada por fotobiorreatores - pois altas densidades celulares não podem ser atingidas devido à baixa eficiência do sistema de agitação. Outros fatores que contribuem negativamente para este arranjo são:

- a evaporação, que causa perdas para a atmosfera tornando a eficiência no uso de CO_2 bem inferior à exibida por fotobiorreatores,
- risco de contaminação com outras espécies de algas ou micro-organismos,
- maiores áreas são necessárias para cultivo quando comparadas a fotobiorreatores (CHISTI, 2007), e
- agitação deficiente, provocando menor eficiência fotossintética. Por terem profundidade média de 20 cm, a agitação insuficiente, além de resultar em baixas taxas de transferência de massa gás-líquido, aumenta o tempo de residência da cultura no fundo da lagoa (zona escura), reduzindo a eficiência fotossintética.

Os fotobiorreatores (Figura 2.6) podem ser iluminados naturalmente (luz solar) ou artificialmente (por lâmpadas fluorescentes), ou ambos. Sistemas naturalmente iluminados incluem as lagoas, placas paralelas e reatores tubulares horizontais, verticais, helicoidais e inclinados. No caso de cultivos *outdoor,* a superfície exposta à radiação solar de alguns fotobiorreatores aumenta a eficiência do sistema biológico responsável pela fotossíntese nas algas. Reatores do tipo placas paralelas, tubulares horizontais e inclinados têm vantagem em termos de área exposta à radiação, mas apresentam limitações de *scale-up* por ocuparem maiores áreas (UGWU *et al.* 2008). Alguns reatores tubulares são colunas verticais de borbulhamento, outros possuem sistema *air-lift* ou tanques de mistura, que permitem a exaustão do oxigênio produzido durante a fotossíntese, que em excesso causaria inibição. Estes sistemas também promovem turbulência, aumentando assim a transferência de massa gás-líquido (MOLINA GRIMA *et al.* 2001). A produtividade volumétrica ($kg.m^{-3}.d^{-1}$), de acordo com CHISTI (2007), é 92% maior para fotobiorreatores, de modo que, para um mesmo volume de cultura, a concentração celular é maior nos fotobiorreatores. Por outro lado, os fotobiorreatores possuem um custo de instalação e operação maior comparativamente às lagoas e exibem limitações na distribuição espacial (i.e., ao longo dos tubos) do pH, da quantidade de oxigênio dissolvido, da concentração de CO_2, além do acúmulo de biomassa nas paredes. Para evitar que estas variações afetem a produtividade, soluções de engenharia e controle têm sido utilizadas, tais como: (i) uso de tanques desgaseificadores; (ii) sistemas *air-lift*, onde ar comprimido e CO_2 são injetados para transporte (elevação), remoção do oxigênio e controle de pH; e (iii) injeção distribuída de CO_2 ao longo do comprimento do reator. Em resumo, dentre as vantagens dos sistemas fechados citam-se: (a) maior possibilidade de controle do processo, resultando em alta produtividade; (b) culturas axênicas são possíveis de serem obtidas; (c) com projeto adequado, pode-se explorar o espaço vertical, reduzindo-se o *footprint* do reator e aumentando-se a área iluminada, o que possibilita o emprego de culturas densas. Um dos fatores mais importantes na escolha da geometria do fotobiorreator é a razão área iluminada/volume, pois o aumento da eficiência fotossintética leva a um aumento na produtividade em biomassa. Nesta direção, as concepções geométricas mais utilizadas são com painéis e tubulares.

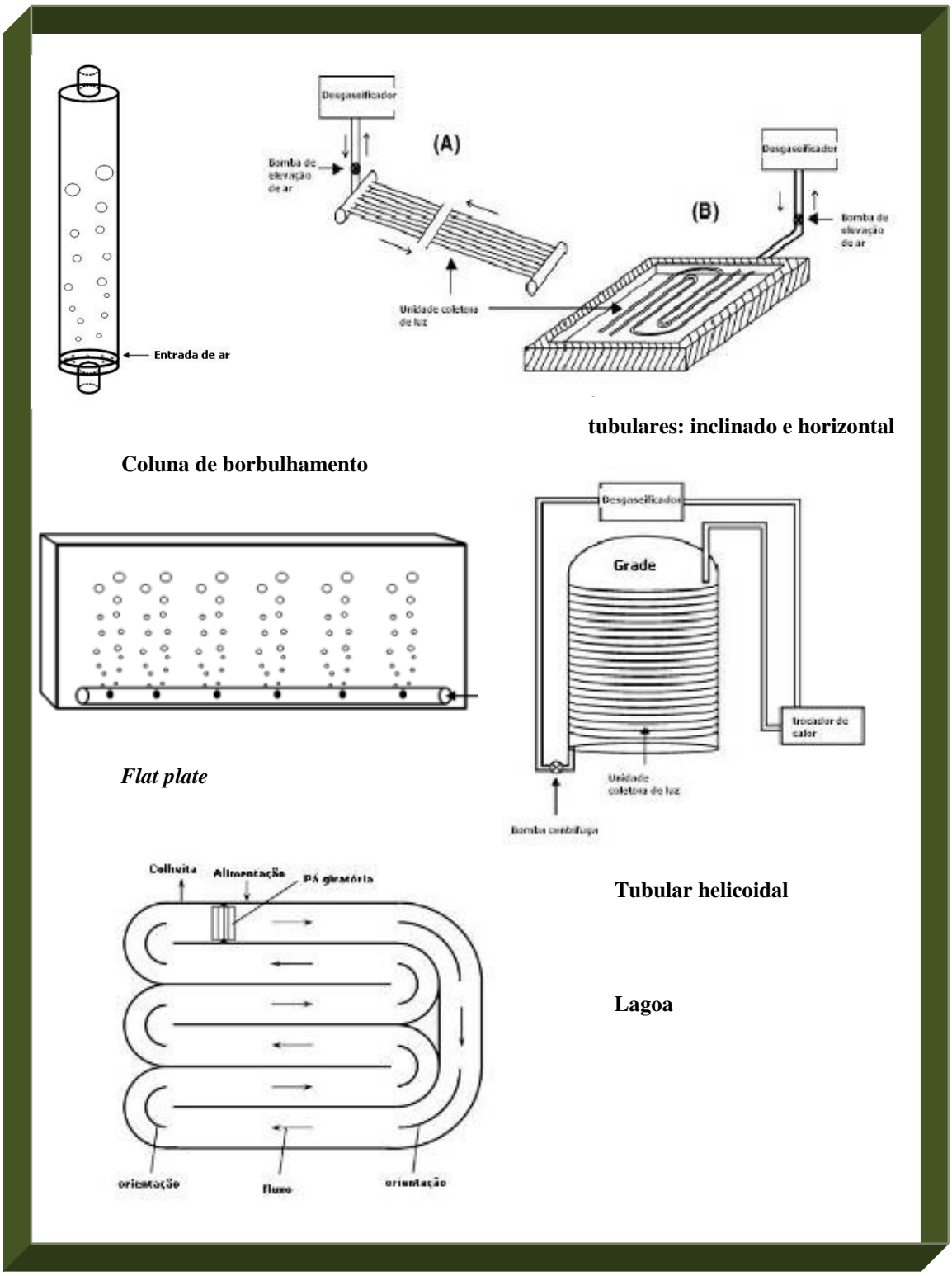


Figura 2.6: Esquema de Fotobiorreatores. Fonte: Carvalho et al. 2006

2.4.1 REATORES TUBULARES

Os reatores tubulares têm sido amplamente utilizados, principalmente em escala piloto, para produção de microalgas. São sistemas que consistem de um conjunto de

tubos lisos e transparentes geralmente fabricados em plástico ou vidro, também chamados de coletores solares. O diâmetro dos tubos varia de 2 a 10 cm e os arranjos dos tubos podem ser horizontal, vertical (grade), inclinado ou helicoidal.

A aeração nestes reatores é normalmente realizada com o auxílio de bomba ou com sistema *air-lift*. O CO_2 é adicionado na entrada dos tubos. O ar pode ser adicionado na entrada juntamente com o CO_2 e/ou em tubo conectado a sistema para remoção do oxigênio formado na reação fotossintética (*degasser*). Sistemas fechados têm maior produtividade, pois permitem melhor controle das condições operacionais (como pH), e possibilitam maior aproveitamento do CO_2, devido à redução de perdas para a atmosfera quando comparada a de sistemas abertos (lagoas). Além disso, pelo uso de sistema adequado de mistura, como misturadores estáticos (UGWU *et al.* 2005), borbulhamento (MIRÓN *et al.* 2003) ou *air-lift* (TRAVIESO *et al*. 2001), promove-se aumento da taxa de transferência de massa gás-líquido o que também elevará a produtividade. O diâmetro dos tubos é um parâmetro relevante. Diâmetros grandes requerem sistemas de promoção de turbulência, para iluminação mais homogênea por diminuição do período que a cultura permanece no centro do tubo, onde a iluminação é mínima. Uma mistura eficiente também diminui a possibilidade de ocorrer fotoinibição, onde o excesso de radiação poderá reduzir a produtividade.

Outra questão importante na operação de reatores tubulares é a concentração de oxigênio. O excesso de O_2 inibe a fotossíntese e pode causar fotoxidação em cultivos *outdoors* (MOLINA GRIMA *et al.* 2001) danificando o sistema celular responsável pela fotossíntese. Tanques chamados *degassers* (Figura 2.7, MASOJÍDEK *et al.* 2003) são utilizados para exaustão do oxigênio, onde ar enriquecido com CO_2 é injetado no fundo para remoção do O_2. O pH é também uma variável que requer controle de processo, gradientes de pH podem se formar ao longo dos tubos, o que requer injeções de CO_2 ao longo do processo. Por outro lado, os fotobiorreatores permitem este controle (controladores de pH, de oxigênio dissolvido), resultando em vantagens de produtividade em relação às lagoas, como é apresentado na Tabela 2.6.

SANDNES *et al.* (2005) realizaram experimentos em reator tubular com os tubos dispostos na vertical formando uma grade (*Biofence*, Figura 2.8). Três grades foram utilizadas com um volume total de 600 L, cada grade com 48 tubos de 2,44 m de comprimento e 30 mm de diâmetro interno. A maior produtividade foi de 0,8 $g.L^{-1}d^{-1}$

para uma concentração inicial de 10 mg/L de biomassa. Esta produtividade foi alcançada para a maior irradiância experimentada pelos autores, indicando que maiores incidências de luz trazem ganhos de produtividade.

Tabela 2.6: Produtividade em diferentes sistemas de cultivo

Tipo de Cultivo	Faixa de Produtividade		Cepa	Localização	Produto	Referências
	Por área ($g\ p.s.\ .m^{-2}.d^{-1}$)	Volumétrica ($g\ p.s..L^{-1}.d^{-1}$)				
			SISTEMA FECHADO (FOTOBIORREATOR)			
Anular (airlift design)	3.7-5.3	0.25-0.35	*Nannochloropsis sp.*	Itália	Produção de PUFA	Zittelli, *et al.* 2003
	1.9-3.8	0.12-0.35				
Placas paralelas inclinadas	11	23 (Peso seco, sem cinza)	*Nannochloropsis sp.*	Israel	Produção de EPA	Zou & Richmond 1999
Placas paralelas inclinadas	39-51	0.09-0.3	*Spirulina platensis*	Israel	Produção para alimentação	Hu *et al.* 1996
Placas paralelas verticais	30-39	4.1-5	*Synechocystis aquatilis*	Japão	Tratamento de efluentes	Zhang *et al.* 1999
Tubular						
Sistema air-lift	9.2	0,28	*Spirulina platensis*	Canadá	Alimentação	Watanabe *et al.* 1995
Circulação por bomba	9.4	0,33				
Tubular em cone	7,07	0,55	*Spirulina platensis*	Japão	Alimentação	Watanabe & Hall 1996
Tubular helicoidal vertical (Biocoil)	_	0.5-1.20	*Tetraselmis chuii*	Austrália	Alimentação de espécies aquáticas	Borowitzka, 1997
			LAGOAS			
Circular	1.61-16.47	0.02-0.16	*Chlorella sp*	Japão	Alimentação	Kanazawa *et al.* 1958
	2.43-13.52	0.03-0.13	*Scenedesmus. Sp*			
Raceway	14.47±0.16	0.183±0.02	*Spirulina platensis*	Itália	Alimentação	Pushparaj *et al.* 1997
Raceway	9.4-23.5	≈ 0.031-0.078	*Anabaena sp.*	Espanha	Suplemento alimentar	Moreno *et al.* 2003
Raceway	_	0.006-0.07	*Spirulina sp.*	Espanha	Alimentação	Jimenez *et al.* 2003
Raceway	1.6-3.5	_	*Dunaliella salina*	Espanha	β-caroteno	Acién-Fernandez et al. 2003
Raceway	15-27	0.06-0.18	*Spirulina platensis*	Israel	Alimentação	Richmond *et al.* 1990
Raceway	2.4-11.3	0.0028-0.13	*Phaeodactylum tricornutum*	Hawaii	Produção de EPA e PUFA	Laws *et al.* 1983
Raceway	16-30	0.11-0.21	*Pleurochrysis carterae*	Austrália	Biorremediação de CO_2	Moheimani & Borowitzka, 2006

g p.s.= grama (peso seco), PUFA = ácidos graxos poliinsaturados, EPA = ácido eicosapentaenoico

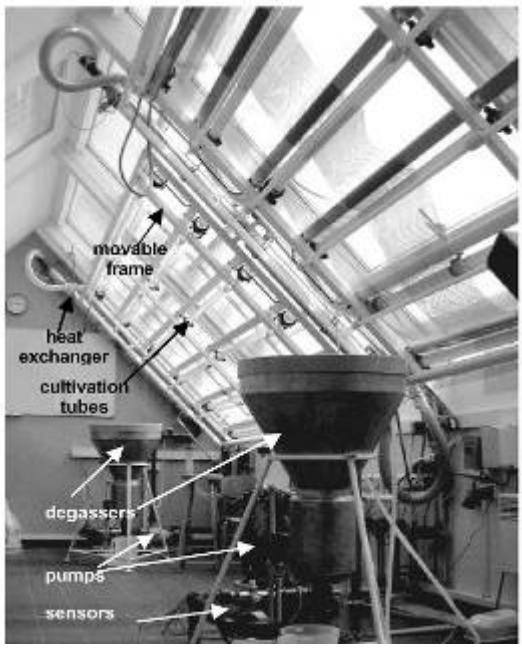


Figura 2.7: Reator tubular com *degasser* para exaustão de O_2.
Fonte: Masojídek et al., 2003

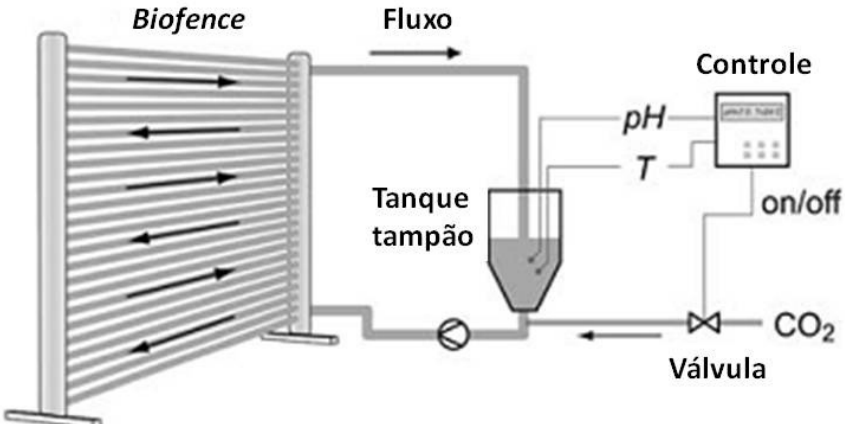


Figura 2.8: Reator *Biofence.*
Fonte: Sandnes et al., 2005

FUENTES *et al*. (1999) cultivaram *Porphyridium cruentum* em reator tubular horizontal acoplado a um sistema de exaustão de gás (Figura 2.9). O fotobiorreator horizontal tem 0,05m de diâmetro interno, 98,8 m de comprimento total e está imerso em uma piscina com 21,4 m^2, o volume total de cultura no fotobiorreator é de 0,22 m^3. A produtividade alcançada no 3º dia foi de 1,76 $g.L^{-1}.d^{-1}$ com uma concentração celular inicial de 1,2 $g.L^{-1}$.

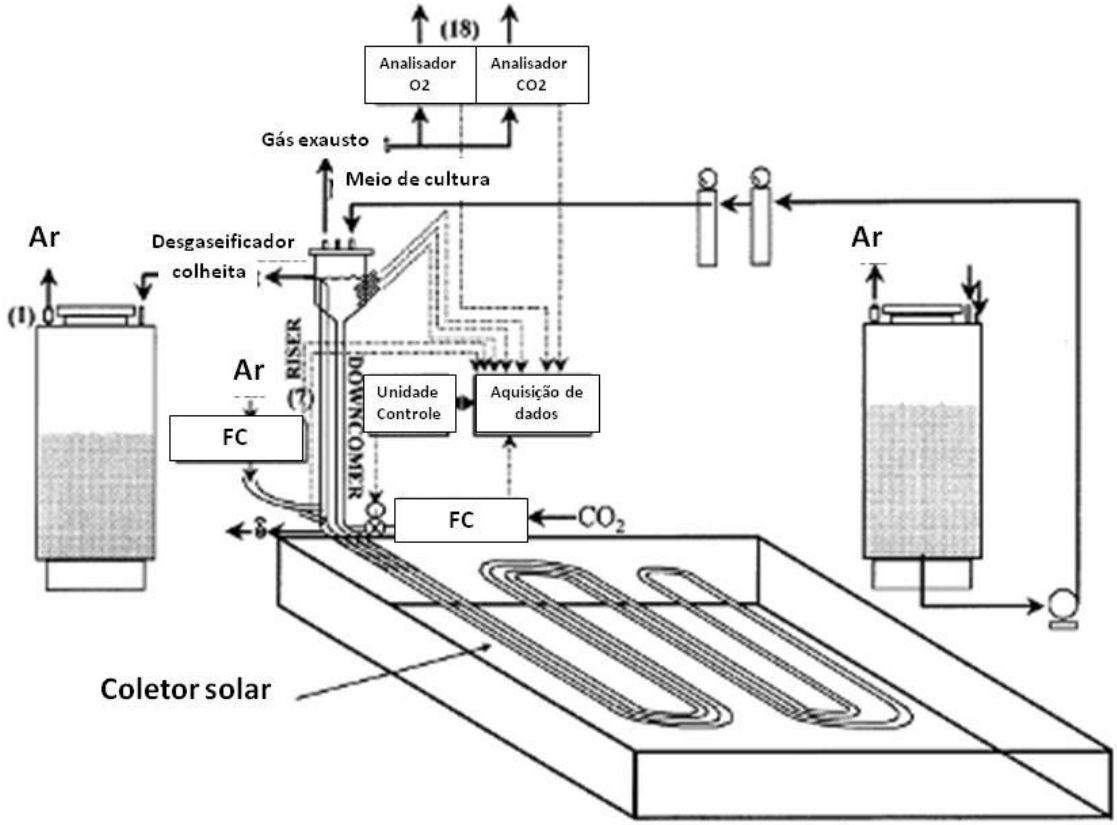


Figura 2.9: Reator tubular horizontal.
Fonte: Fuentes *et al.*, 1999

ACIÉN FERNÁNDEZ *et al.* (2003) cultivaram *Phaeodactylum tricornutum* em reator tubular helicoidal (Figura 2.10) com 75 L de volume, 106 m de comprimento total e 0,03 m de diâmetro interno. O reator contava com um sistema *air-lift* para dessorção do oxigênio e para manutenção do fluxo de líquido. A produtividade foi de 3,5 $g.L^{-1}.d^{-1}$ para uma concentração inicial de biomassa de 0,5 $g.L^{-1}$.

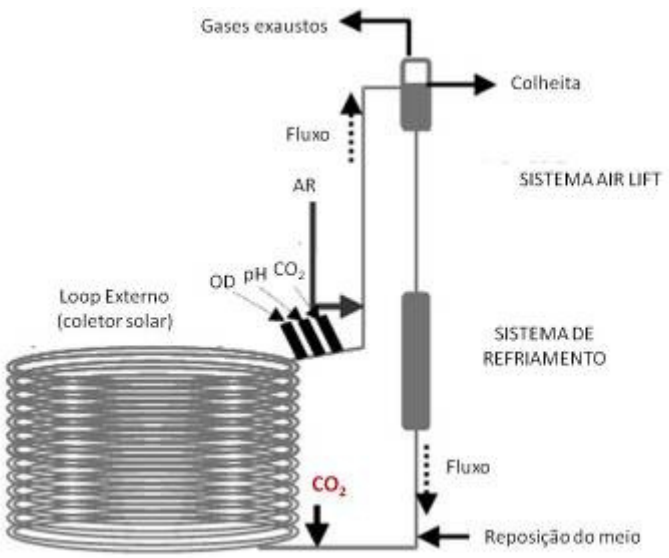


Figura 2.10: Reator tubular helicoidal.
Fonte: Acién Fernández *et al.*, 2003

Uma das questões mais importantes no cultivo de microalgas ou cianobactérias é a razão área iluminada/volume. CARVALHO *et al*. (2006) citam, em seu trabalho, um reator horizontal com 8000 L ocupando uma área de 80 m^2, com uma produtividade de 0,25 $g.L^{-1}.d^{-1}$ para *Spirulina platensis*. Reatores tubulares horizontais têm vantagem em relação à área superficial iluminada, mas têm razão área iluminada/volume que, quando comparada à das lagoas, não resulta em uma eficiência fotossintética muito maior. Os autores também apontam para o problema de controle da temperatura em reatores tubulares e apresentam três possíveis soluções: a sobreposição dos tubos, o sombreamento dos tubos e o uso de *spray* de água na superfície dos tubos. Outra solução para manter a temperatura do cultivo é o uso de trocadores de calor (TRAVIESO *et al.* 2001). Algumas espécies são termotolerantes como *Spirulina* sp., que suporta temperaturas de até 46ºC e *Haematococcus pluvialis,* que tolera mudanças de temperatura (OLAIZOLA, 2000), o que diminui o uso de água para resfriamento da cultura.

O aumento de escala dos reatores tubulares é possível colocando-se mais módulos em operação e utilizando-se o mesmo sistema de exaustão para vários módulos, embora haja limitações para cada projeto. No caso dos horizontais, um aumento no número de módulos resulta em maior área ocupada. Em relação aos helicoidais e verticais, um maior número de tubos é acompanhado de um aumento da carga hidráulica para levar o fluido até o último tubo. Quando isto é realizado por

bomba centrífuga, as células podem sofrer estresse mecânico, o que diminuiria a produtividade. Uma alternativa às bombas é o sistema de transporte *air-lift* que reduz o estresse e minimiza o dano à célula.

Outro parâmetro que aumenta a produtividade é a concentração inicial de células: maiores concentrações iniciais geram maior produtividade, principalmente em sistemas com maiores áreas superficiais iluminadas e turbulência suficiente para diminuir o tempo na zona escura (centro do tubo) sem causar danos à célula.

2.4.2 REATOR TUBULAR VERTICAL COM BORBULHAMENTO

Nas colunas de borbulhamento, o ar é injetado na base promovendo boa mistura e consequente aumento da transferência de massa gás-líquido, aumenta o suprimento de CO_2 e a remoção de O_2 pelo topo (CARVALHO *et al*. 2006). MIRÓN *et al.* (2003) utilizaram três colunas de borbulhamento com geometrias variadas para o *riser* e o *downcomer* (Figura 2.11). As três colunas de borbulhamento têm 0,193 m de diâmetro interno, altura total de 2 m, e volume total de 0,06 m^3, com produtividade de 1kg/m^3.d. Os autores compararam a produtividade das colunas de borbulhamento com um reator tubular horizontal de 0,03 m de diâmetro e produtividade de 2,76 $kg.m^{-3}.d^{-1}$. Eles apontaram que, apesar da produção diária das colunas de borbulhamento ser menor, a produtividade por área foi aproximadamente quatro vezes maior. As colunas verticais de borbulhamento são de baixo custo e de fácil operação, mas o seu aumento de escala é prejudicado em razão do decréscimo de área iluminada devido ao ângulo relativo à direção do sol, além disso, para que se tenha volume de cultura e alta taxa de transferência de gás, o diâmetro deve ser elevado, o que também diminui a área iluminada e, consequentemente, a eficiência fotossintética.

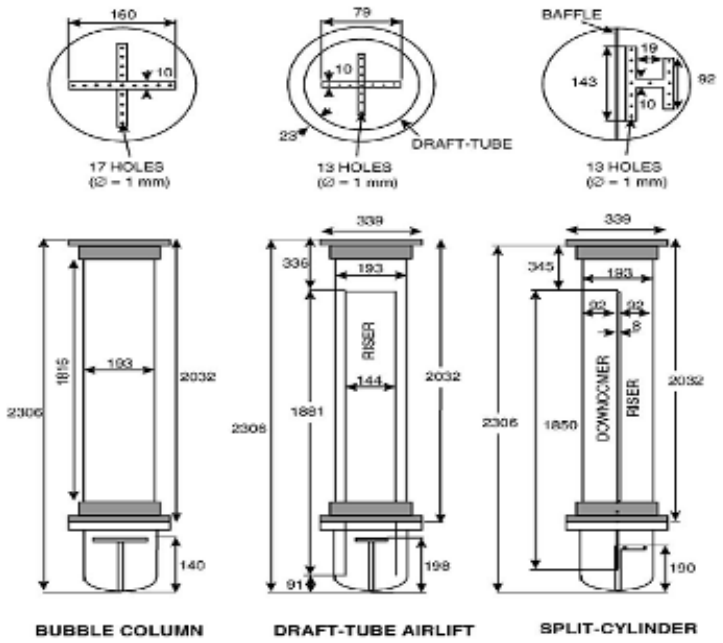


Figura 2.11: Colunas Verticais de Borbulhamento.
Fonte: Mirón et al., 2003

2.4.3 REATORES DE PLACAS PARALELAS (*FLAT PLATES*)

O conceito de cultivo de microalgas em painéis ou placas foi criado com a intenção de maximizar o aproveitamento da luz solar. Quanto mais estreitos os painéis maior a razão área iluminada/volume. A cultura pode circular por bombas ou por um sistema de borbulhamento de ar (enriquecido com CO_2) em que um tubo de ar é colocado na seção vertical do painel, conectado a outro tubo na base horizontal do painel, e libera o ar na forma de pequenas bolhas (Figura 2.12). As principais vantagens do reator em placas são a produtividade e a distribuição uniforme da radiação. TREDICI (1991) relata uma produtividade de 2,15 $g.L^{-1}.d^{-1}$ para a *Spirulina platensis* comparada a uma produtividade de 0,15 $g.L^{-1}.d^{-1}$ em lagoa para condições semelhantes. O acúmulo de oxigênio dissolvido nos reatores em painel é relativamente menor comparado com os fotobiorreatores tubulares. Para o aumento de escala do fotobiorreator em placa, vários compartimentos são necessários, o que implica em maior área (*footprint*) (Figura 2.13).

A Tabela 2.7 apresenta um resumo das vantagens e limitações dos principais sistemas de cultivo de microalgas.

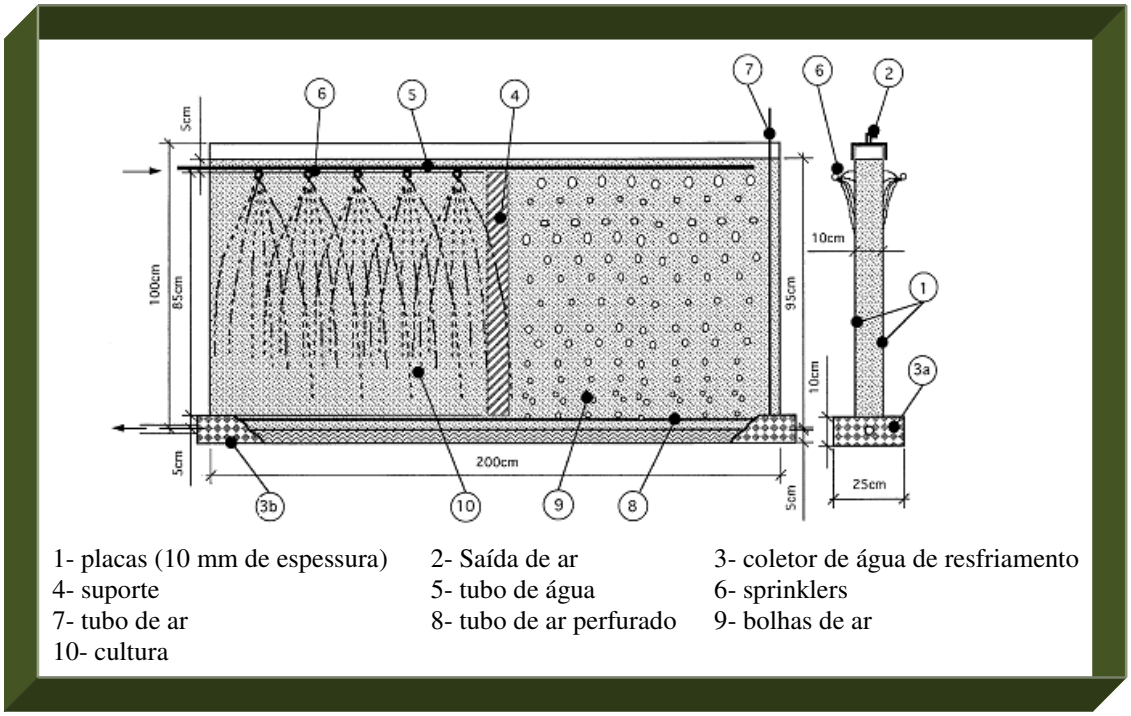


Figura 2.12: Esquema de um reator de placas com borbulhamento.
Fonte: Wu *et al.*, 2001

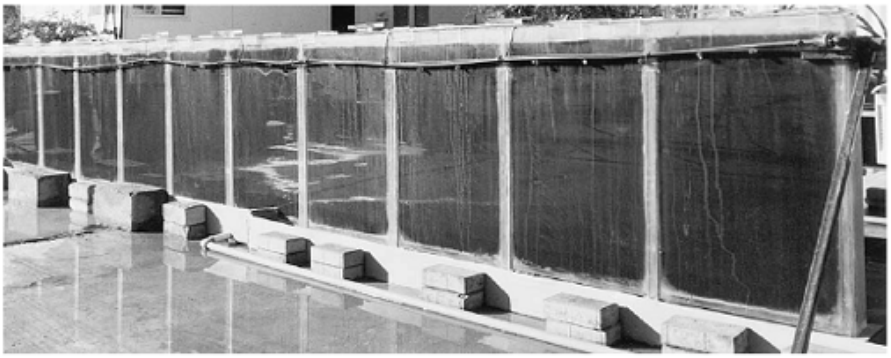


Figura 2.13: Reator *Flat Plate*.
Fonte: Wu et al., 2001

Tabela 2.7: Comparação entre sistemas de cultivo de microalgas

Sistema de cultivo	Vantagens	Limitações
Lagoas	Instalação e operação de baixo custo, fácil limpeza, bom para cultivo de biomassa algal.	Baixo controle das condições de cultivo, baixa produtividade, ocupação de grandes áreas, limitado a poucas espécies de algas, fácil contaminação por outras espécies ou micro-organismos.
Coluna vertical com borbulhamento	Alta transferência de massa, boa mistura com baixo stress celular, baixo consumo de energia, fácil esterilização, redução de fotoinibição e fotoxidação.	Pouca área superficial iluminada, construção requer materiais sofisticados, e apresenta decréscimo de superfície iluminada em caso de aumento de escala.
Fotobiorreator de placas	Grande área superficial iluminada, possibilidade para culturas outdoor, boa produtividade de biomassa, fácil limpeza, baixo acúmulo de oxigênio.	O aumento de escala requer muitos compartimentos e material de suporte, dificuldade no controle da temperatura. Acúmulo de biomassa na parede.
Fotobiorreator tubular	Grande superfície iluminada, possibilidade para culturas outdoor, boa produtividade de biomassa.	Gradientes de pH, oxigênio dissolvido, CO_2 não dissolvido ao longo dos tubos (baixa taxa de transferência), acúmulo de biomassa na parede, tubos na horizontal ocupam grandes áreas.

Fonte: Ugwu et al., 2008

Dentre os sistemas apresentados, o fotobiorreator com tubos verticais formando uma grade é o sistema mais promissor, pois ocupa menor área quando comparado com os tubos horizontais e as placas paralelas, que têm alta produtividade (Tabela 2.8), mas tem *scale-up* prejudicado pelo excessivo aumento do *footprint*. Se um sistema de aeração eficiente for utilizado, baixas concentrações de O_2 e altas taxas de transferência gás-líquido são atingidas. Desta forma, maiores produtividades em biomassa são obtidas em reatores tubulares comparativamente às lagoas (Tabela 2.9). OLAIZOLA (2000) descreve a produção comercial de astaxantina por *Haematococcus pluvialis* em reatores tubulares chamados AGM (*Aquasearch Growth Module*), onde cada módulo tem 25000 L, em total de 3 módulos (75000 L). Após o crescimento (produção de biomassa) nos reatores tubulares, a cultura é transferida para um sistema com 6 lagoas – a cada dia uma lagoa é inoculada e uma é coletada – onde as células são induzidas a produzir o metabólito desejado.

Em 1995, na Alemanha, um projeto surgiu com a intenção de reduzir as emissões de CO_2 de instalações industriais por meio de microalgas. Atualmente, uma planta de produção de *Chlorella vulgaris* com 500 km de tubos de vidro, de aproximadamente 6.10^5 L, distribuídos em 20 unidades, atinge produção de mais de 100 t de biomassa por ano (www.algomed.de) (Figura 2.13).

Tabela 2.8: Produtividade de sistemas fechados para cultivo de microalgas

Fotobiorreatores Fechados							
Biorreator	**Orientação**	**Diâmetro interno (cm)**	**Localização**	**Espécie**	**Produtividade máxima**		**Ref.**
					(g/m²/dia)*	**(g/Ldia)**	
Tubular	Horizontal	12,3	Itália	*Spirulina maxima*	25	0,25	3
		2,6	Itália	*Spirulina sp.*	27,8	-	3
		2,5	Israel	*Spirulina platensis*	27	1,6	4
		2,6	Espanha	*Isochrysis galbana*	-	0,32	5
		6	Espanha	*Phaeodactylum*	-	2,02	6
		3	Espanha	*Phaeodactylum*	-	2,76	7
		6	França	*Porphyridium cruentum*	25	0,36	8
	Inclinado	2,5	Singapura	*Chlorella pyrenoidosa*	72,5	2,9	9
		1,2	Singapura	*Chlorella pyrenoidosa*	130	3,64	10
Helicoidal	Vertical	2,4	Austrália	*Tetraselmis chuii*	-	1,2	11
Coluna	Vertical	20	Espanha	*Phaeodactylum*	-	0,69	12
		2,6	Israel	*Isochrysis galbana*	-	1,6	13
Placas paralelas	Inclinado	10,4	Israel	*Spirulina platensis*	33	0,3	14
		1,3	Israel	*Spirulina platensis*	51	4,3	14
		3,2	Itália	*Spirulina platensis*	24	0,8	15

Referências: 1. Richmond et al., 1990; 2. Doucha e Livansky,1995; 3. Torzillo et al., 1986; 5. Molina Grima et al., 1994; 6. Acién-Fernadez et al., 1998; 7. Molina Grima et al., 1996; 8. Chaumont et al., 1988; 9. Lee et al., 1995; 10. Lee e Low, 1991; 11. Borowitzka, 1997; 12. Miron et al., 1999; 13. Hu e Richmond, 1994; 14. Hu et al., 1996; 15. Tredici et al., 1991. * Produtividade em área (*footprint*)

Tabela 2.9: Comparação entre Fotobiorreatores e lagoas (*raceway*)

Variável	Fotobiorreator		Lagoas (*raceway*)
Produção anual de biomassa (kg)	100000		100000
Produtividade volumétrica (kg m^{-3} d^{-1})	1,535		0,117
Produtividade por área (kg m^{-2} d^{-1})	0,048 [a]	0,072 [b]	0,035
Concentração de biomassa no caldo (kg m^{-3})	4,00		0,14
Taxa de diluição (d^{-1})	0,384		0,250
Área necessária (m^2)	5681		7828
Rendimento em óleo (m^3 ha^{-1})	136,9[a]	58,7[b]	99,4[a] 42,6[b]
Consumo anual de CO_2 (kg)	183333		183333
Geometria do sistema	132 tubos paralelos/unidade		978 m^2/lagoa; 12 m de largura
	80 m de comprimento de tubo		82 m de comprimento
	0.06 m de diâmetro de tubo		0.30 m de profundidade
Número de unidades	6		8

a - Baseado em 70% de óleo por peso seco de biomassa b - Baseado em 30% de óleo por peso seco de biomassa.Fonte: Chisti 2007

Figura 2.14: Fotobiorreator tubular com produção de 100 t de biomassa por ano.
Fonte: www.algomed.de

As recentes inovações tecnológicas incluem crescimento vertical em reatores em sacos (*bag reactors*) (Figuras 2.14 e 2.15) feitos de polietileno montados sobre armações metálicas. Os sacos de algas apresentados estão instalados em termoelétricas (Phoenix, Arizona) e absorvem CO_2 produzindo 5000 litros de biodiesel por ano em um acre (BOUNE, 2007). Considerando-se a densidade do óleo de 850 kg/m^3 e uma cepa com 25% de lipídios, a produtividade equivalente em biomassa é de $4{,}2 \times 10^{-6} g.m^{-2}.d^{-1}$, adotando-se 340 dias de operação por ano, o que demonstra o caráter exploratório do projeto.

Um sistema vertical de reatores em sacos está em desenvolvimento pela Valcent Products, Inc de El Paso, Texas (www.valcent.net) utilizando 340 dias anuais de sol e CO_2 disponível em emissões da termoelétrica, conforme apresentado na Figura 2.16 (HITCHINGS, 2007). Investigam-se as melhores espécies de algas para a produção de óleo e os métodos de extração do óleo, que incluem pressão, extração com solvente e extração com fluido supercrítico. O autor menciona que a extração do óleo é a etapa mais onerosa no processo.

Figura 2.15: Produção de alga a partir de gás exausto de termoelétrica.
Fonte: Borne, 2007

Figura 2.16: Reator Vertical em Saco Utilizando Gás Exausto de Termoelétrica.
Fonte: Hitchings, 2007

Comparando os modelos atualmente mais empregados de Fotobiorreatores fechados, alguns pontos podem ser destacados. Em relação às colunas de borbulhamento as principais vantagens associadas são seus baixos custos de capital, elevada razão área superficial e volume, poucas peças móveis, transferência de massa e calor satisfatórias e eficiente liberação de O_2. O fotobiorreator de placas paralelas relata maior produtividade em condições de saturação luminosa e uma produtividade volumétrica em massa 1,7 vezes maior do que a coluna de borbulhamento. A forma horizontal do fotobiorreator tubular é vantajosa em cultura *outdoor* devido a sua orientação para a luz, resultando em uma alta eficiência na conversão de luz. Além disso, a eficiência fotossintética e a produtividade volumétrica são maiores do que em

fotobiorreatores de placas paralelas. O fotobiorreator helicoidal apresenta vantagem em relação aos outros modelos de biorreatores por causa do reduzido *footprint*, boa transferência de CO_2 da fase gasosa para fase líquida, mas a grande desvantagem deste reator são as incrustações no interior do reator e a energia requerida pela bomba centrífuga para circulação da cultura e o estresse associado ao uso da bomba, o que limita sua utilização comercial (SINGH & SHARMA, 2012).

2.5 COLHEITA DE MICROALGAS

As técnicas mais empregadas na colheita das microalgas são decantação, flotação, centrifugação e filtração. Estas técnicas são auxiliadas pela floculação das células, seja por adição de agentes químicos floculantes ou por autofloculação. Na floculação, as células se aproximam formando agregados celulares, que decantam mais rapidamente por gravidade ou por aceleração (centrifugação).

A necessidade da utilização de grandes centrífugas e sistemas de filtração, e o uso de solventes, no caso da extração de bioprodutos, elevam os custos totais desta etapa do processo (em capital e operação). Alguns fatores influenciam positivamente para reduzir os custos, como a microalga selecionada, pois algumas espécies são mais facilmente separadas devido ao formato ou ao maior tamanho celular. A umidade final na biomassa depende da finalidade do cultivo: quanto menor a umidade requerida pelo processo a jusante mais elevado será o custo de secagem. Não existe apenas um único e melhor processo de separação da biomassa. Contudo, para uso em biocombustíveis de forma competitiva, a colheita deverá ser de baixo custo e apresentar eficiência energética.

A floculação ocorre por quatro formas: floculação química, autofloculação, biofloculação e eletrofloculação. A floculação química requer a adição de agentes químicos (cloreto de alumínio, cloreto férrico) que aumentam consideravelmente o rendimento em biomassa na colheita, principalmente para espécies unicelulares pequenas. Entretanto, não há possibilidade com a presença do agente químico no meio de reciclo da água no processo. A salinidade influencia diretamente a eficiência da floculação, quando a força iônica do meio é alta, a interação entre floculante e células é reduzida. Doses elevadas de agentes floculantes são necessárias em altas salinidades.

A autofloculação pode ocorrer naturalmente dependendo da espécie e das condições do meio, como por exemplo, ela pode ser promovida pelo aumento do pH do meio – ao longo dos dias de cultivo – causado pelo crescimento celular. A autofloculação também é menos eficiente a altas salinidades. Na biofloculação, outro micro-organismo pode ser adicionado ou estar presente no sistema. Um exemplo de co-biofloculação foi apresentado por Ami Ben-Amotz (2009) que utilizou a alga *Skeletonema*, que flocula naturalmente, para formar flocos com a *Nannochloropsis* que tem alta concentração de lipídios. Na eletrofloculação, a cultura é submetida a um campo elétrico e, por serem negativamente carregadas em sua superfície, são atraídas pelo anodo, onde se neutralizam e formam agregados celulares (flocos) (UDUMAN *et al.* 2010).

Espécies muito pequenas e geralmente com mobilidade (flagelos) crescem mais rápido, entretanto a colheita é dificultada. A escolha da microalga a ser cultivada deve levar em consideração se esta espécie pode ser separada pelos métodos atualmente utilizados ou em desenvolvimento. As condições do meio podem ser manipuladas para aumentar a agregação celular visando à formação de floco. A força das cargas superficiais da célula é afetada por mudanças na força iônica do meio, e o tamanho da célula também pode variar. Contudo, é necessário verificar como estas mudanças afetam a produtividade. A Tabela 2.10 e a Figura 2.17 apresentam algumas espécies e a eficiência na floculação por aumento do pH ou adição de ferro.

Tabela 2.10: Eficiência na Floculação

Classe de algas	Espécie	Densidade celular (células/ml)	Método de floculação	Eficiência na floculação (%)
Cryptophyceae	*R. salina*	(1-2) * 10^6	pH	85-90
Bacillariophyceae	*A. septentrionalis*	(1-1,5) * 10^6	Ferro e pH	85-95
	C.calcitrans	(1-2) * 10^7	pH	95-99
	C.muelleri	(2-3) * 10^6	pH	95-97
	N.closterium	(1-2) * 10^6	pH	90-95
	T. pseudonana	(2-4) * 10^6	Ferro e pH	80-95
	Skeletonema sp.	(3-6) * 10^6	pH	95-98
Eustigmatophyceae	*N. oculata*	(1-2) * 10^7	pH	<30
Prasinophyceae	*T. suecica*	(4-8) * 10^5	pH	85-95
Prymnesiophyceae	*Isochrysis* sp. *(T.ISO)*	(3-4) * 10^6	Ferro e pH	<30

Fonte: Knuckey et al., 2006

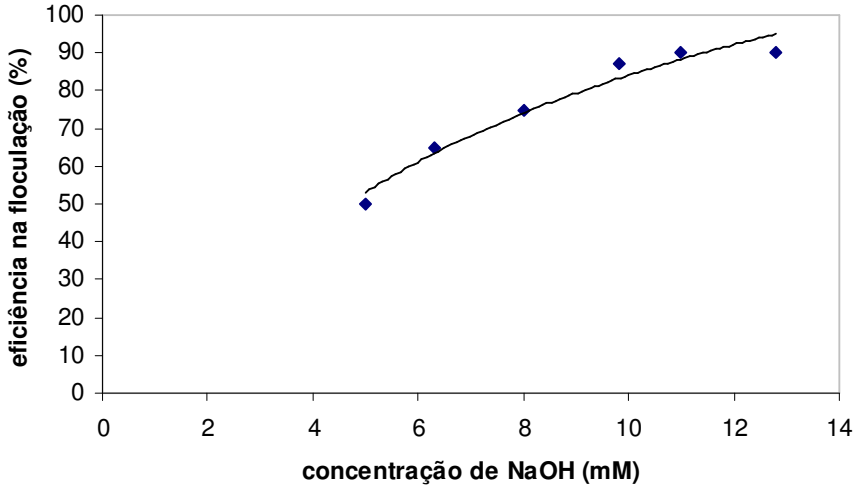


Figura 2.17: Eficiência da floculação de *Thalassiosira pseudonana* (250 mL) induzido por aumento da concentração de NaOH com eletrólito LT-25 (0,05%) adicionado a 1 ml/l, Eficiência (%) = 94,28 - 295,2 * (0,6831$^{[NaOH]}$). Fonte: Knuckey et al., 2006

O desempenho da colheita depende primeiramente do tamanho da célula, o que determinará a decantabilidade e a filtrabilidade da espécie. A mobilidade de algumas espécies também interfere na sua sedimentação. Cargas superficiais e propriedades de agregação da célula na cultura afetam a colheita. Devido ao impacto no custo de capital e operacional, o tempo de colheita deve ser analisado. Tempos longos resultarão em altos tempos de residência no equipamento, demandando maiores volumes com consequente elevação do custo de capital. Deve-se considerar também que grandes tempos de separação poderão incorrer em morte celular seguida de decomposição, resultando em desenvolvimento de processos bacterianos. Assim, no caso de grandes tempos de residência na colheita, perdas devido à atividade biológica devem ser consideradas (NEENAM *et al.* 1986). Adicionalmente, o armazenamento de células no escuro pode levá-las a utilizar suas reservas, diminuindo o produto de interesse.

O custo efetivo de filtração é limitado a organismos filamentosos e a formadores de colônia. A filtração é muito aplicada em escala de laboratório, mas problemas como obstrução da membrana, formação de torta e elevados custos operacionais podem ocorrer em aplicações em larga escala. A sedimentação tem sido muito utilizada em fazendas de aquicultura, mas, de acordo com SCHENK *et al.* (2008), com o consumo de tempo e espaço do método, esta não é uma boa escolha para produção de biodiesel.

As centrífugas são empregadas comercialmente, entretanto, o seu custo e a energia requerida são altos para utilização como primeiro processo de separação na colheita da microalga. BENEMANN & OSWALD (1996) estimaram a energia consumida na centrifugação em 3000 kWh/ton. SCHENK et al. (2008) relatam que o processo de centrifugação é um bom método secundário de colheita, concentrando o caldo de 10-20 g/L de célula em uma pasta de algas com 100-200 g/L. Na produção comercial de astaxantina, utilizam-se centrífugas, onde a técnica é considerada mais confiável e pouco mais cara que as demais. Neste caso, há a vantagem de *Haematococcus pluvialis*, após o estresse nutricional, aumentar a concentração intracelular de carotenóides, o volume celular e a formação natural de flocos que sedimentam rapidamente a uma velocidade maior que 1cm/min (OLAIZOLA, 2003).

A ausência de água na biomassa aumenta a recuperação de astaxantina e β-caroteno. A biomassa pode ser desidratada por *spray-dryers* (atomização), secadores de tambor, *freeze-dryers* e secadores solares. Em alguns casos, a biomassa pode não precisar ser desidratada, a extração ou o processo seguinte da biomassa pode ser realizada com a biomassa úmida, o que diminui o custo da etapa de secagem, que poderá ser até eliminada dependendo do grau de umidade aceitável na biomassa. PIZARRO *et al.* (2006) estimam a energia requerida no processo e o custo de secagem para uma biomassa com 1000 kg/ha contendo aproximadamente 20% de sólidos para alcançar 90% de sólidos com 220 kg de biomassa seca por hectare. Considerando que a remoção de 780 kg de água requer 932 $Mcal.ha^{-1}.d^{-1}$ (consumo de energia de 1,2 Mcal/kg), o custo estimado pelos autores é de 0,97 $/kg de biomassa.

2.6 EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS

A extração de lipídios para produção de biodiesel é realizada utilizando-se solventes como etanol e hexano (Figura 2.18), sendo metanol o mais utilizado na Europa (WILTSHIRE *et al.* 2000). Outros solventes como éter e diclorometano também podem ser utilizados para extração. FAJARDO *et al.* (2006) utilizaram lipases para extração de ácido eicosapentaenoico (22:5) como uma alternativa ao uso de solventes. Os solventes devem ser regenerados e recirculados para a etapa de extração, minimizando custos de reposição. A Tabela 2.11 apresenta a estrutura de custos da extração de óleo de microalga, associada à produção de 26,2 ton/ano de biomassa seca.

Tabela 2.11: Equipamentos Principais para Extração de Óleo Cru de Microalga

Equipamentos e Solventes	Custo ($)	Número de Unidades	Custo Total ($)	% em Relação ao Custo dos Principais Equipamentos
1.Tanque de etanol (1,5 m^3, aço carbono)	2404	1	2404	4,6
2. Tanque cloreto de acetila (1 m^3, aço carbono)	1881	1	1881	3,6
3. Reator (2 m^3, 66 psig, jaqueta)	5242	1	5242	10
4. Tanque de armazenamento de hexano (60 m^3)	11613	2	23226	44,3
5. Tanque de armazenamento (2,5 m^3, aço carbono)	3434	1	3434	6,5
6. evaporador (50 ft^2)	14622	1	14622	27,9
7. condensador (casco e tubo, 5 m^2)	1678	1	1678	3,2
TOTAL			52487	

Fonte:Molina Grima et al., 2003

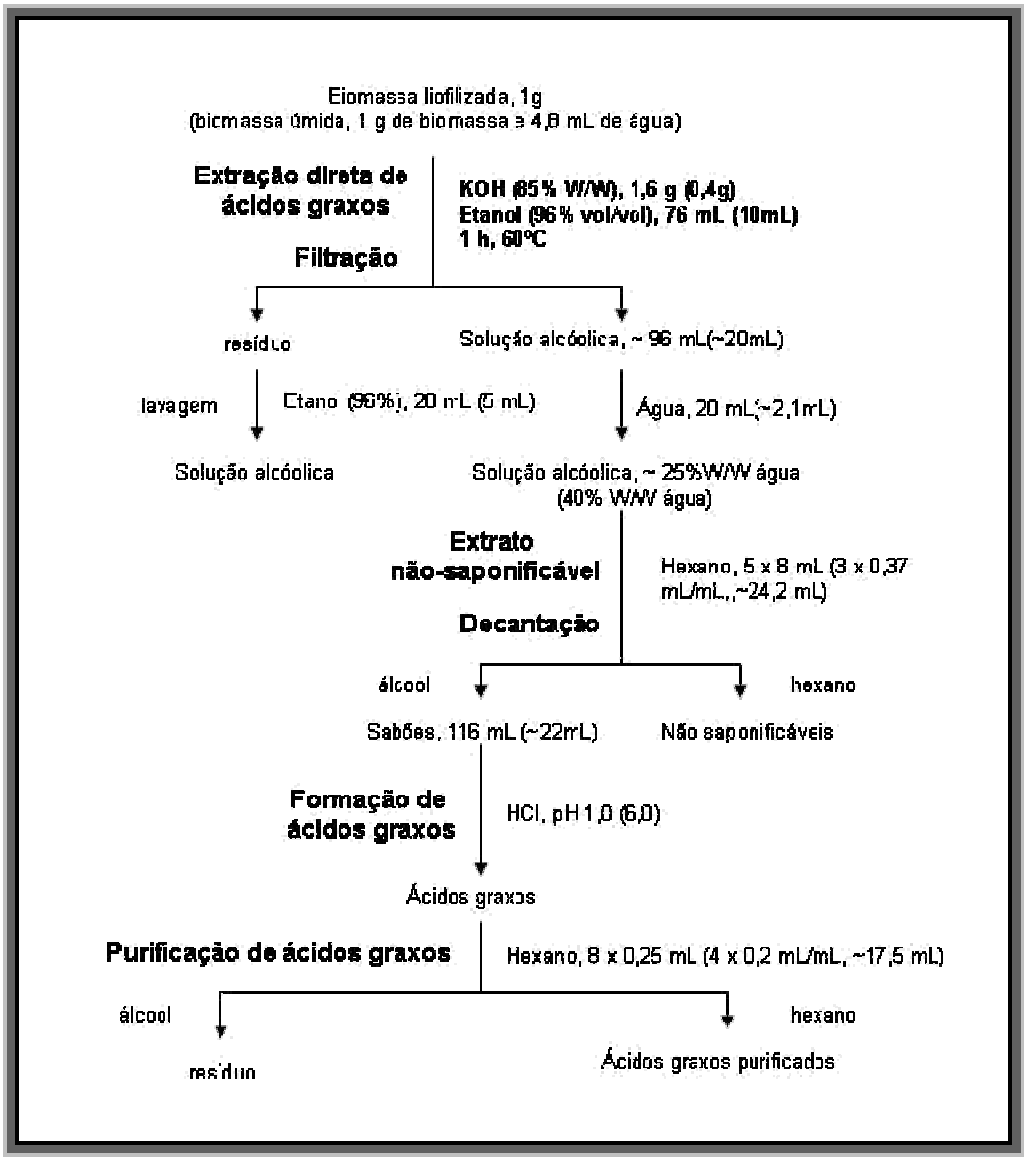


Figura 2.18: Extração de lipídios. Fonte: Adaptado de González *et al.* (1998)

Uma alternativa ao processo convencional acima mencionado, que tem o potencial para reduzir os custos de processamento da etapa final na produção de biodiesel, é a transesterificação *in situ*. Este processo facilita a conversão de ácidos graxos para alquil ésteres diretamente no interior da biomassa, eliminando a etapa de extração com solvente. A alcóolise do óleo diretamente na matriz da biomassa conduz a um rendimento em biodiesel maior do que a extração convencional e a geração de resíduos é reduzida (AMARO *et al.* 2011).

Uma técnica que demonstra potencial na extração de óleo e recuperação da biomassa ao mesmo tempo é a eletroporação. A técnica consiste na submissão da cultura a um campo magnético ou elétrico que leva a célula a abrir poros na parede celular e membrana, permitindo a saída do óleo para o meio externo, e a floculação da biomassa. A empresa *Originoil* patenteou processo no qual, após crescimento, a microalga é submetida a um campo magnético com baixa voltagem e injeção de CO_2 para diminuir o pH. A extração e separação ocorrem na célula, com a abertura de poros, liberando o óleo para o meio (Figura 2.19).

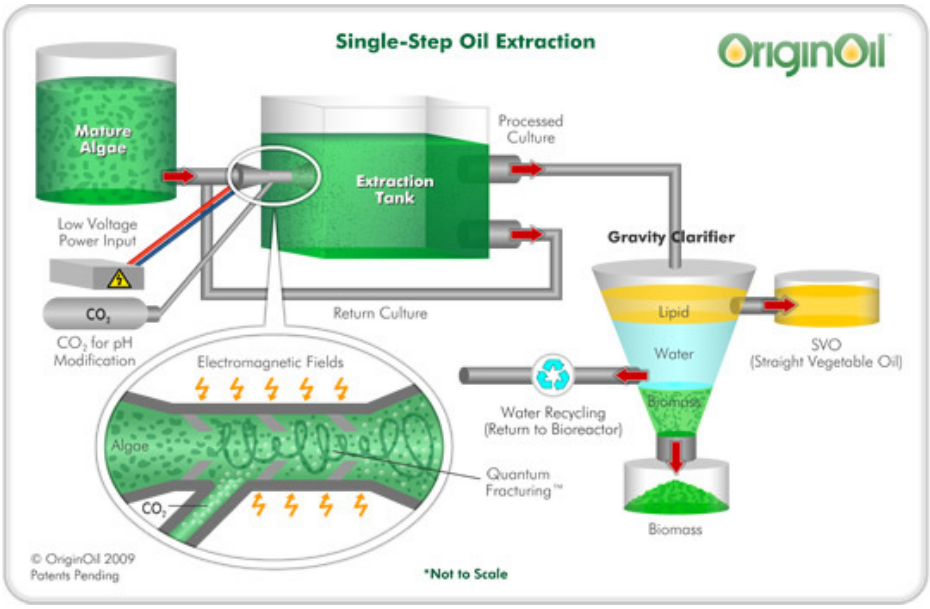


Figura 2.19: Extração de lipídios por eletroporação. Processo *Originoil*
Fonte: http://www.originoil.com/

2.7 BIODIESEL DE MICROALGAS

O Biodiesel é uma mistura de alquil ésteres de ácidos graxos, obtidos pela transesterificação de óleos ou gorduras. Quando de origem vegetal ou animal, são compostos por 90-98% de triglicerídeos e pequenas quantidades de mono e diglicerídeos e ácidos graxos livres, além de quantidades residuais de fosfolipídios, fosfatídeos, carotenos, tocoferóis, compostos de enxofre e água. A transesterificação é uma reação química em múltiplos passos - incluindo as etapas de hidrólise reversíveis em série, em que triglicéridos são convertidos para diglicéridos, em seguida, diglicéridos são convertidos para monoglicéridos e, finalmente, monoglicéridos são convertidos a ácidos graxos e glicerol (como subproduto); seguida por re-esterificação com um álcool de cadeia curta (ex: metanol), para garantir. Embora a razão molar estequiométrica para álcool: ácido graxo seja de 3:1, uma proporção molar de 6:1 é geralmente usada para deslocar o equilíbrio (AMARO *et al.* 2011).

As microalgas são um exemplo de recurso natural com potencial de produção de biocombustíveis como biodiesel (CHISTI, 2007), metano por digestão anaeróbia (SPOLAORE *et al.* 2006), biohidrogênio (GHIRARDI *et al.* 2000), gás de síntese (OLOFSSON *et al.* 2005) e bio-óleo (ZHANG *et al.* 2007). Apresentam como grande vantagem frente ao cultivo de plantas oleaginosas o reduzido *footprint* decorrente de taxa de crescimento superior (tempo de duplicação da ordem de 1 dia) e poderem ser cultivadas em reatores. Este aspecto de ecologia industrial é relevante no contexto de aumento populacional que requer expansão de áreas de cultivo para fins de alimentação humana, além da questão do desmatamento florestal associado. A Tabela 2.12 apresenta uma comparação entre possíveis fontes produtoras de óleo para biodiesel e a porcentagem da área de cultivo nos EUA para produção de biodiesel correspondente a 50% do diesel fóssil atualmente consumido nos EUA, evidenciando a vantagem das microalgas sobre as plantas oleaginosas quanto ao uso de terra.

Tabela 2.12: Culturas para produção de biodiesel e áreas requeridas para cultivo

Cultura	Rendimento em óleo (L/ha)	Área de cultivo requerida (M ha)	Percentagem da área dos EUA referente à área de cultivo requerida
Milho	172	1540	**846**
Soja	446	594	**326**
Canola	1190	223	**122**
Coco	2689	99	**54**
Palmito	5950	45	**24**
Microalga com 30% do peso seco em óleo	**58700**	**4,5**	**5,5**

Fonte: Chisti, 2007

O teor de lipídios por peso seco de biomassa e a composição química do óleo varia por espécie de microalga e também com as condições de cultivo como temperatura, concentração de CO_2 e O_2, pH, radiação solar e nutrientes. De acordo com YOO *et al* (2010), com enriquecimento de CO_2 (10%v/v) a produtividade em biomassa e a alocação do carbono biofixado, principalmente em ácido oleico de *Scenedesmus sp.,* foi maior que em *Botryococcus braunii,* tornando-a mais habilitada à produção de biodiesel. Os fatores luz solar e temperatura devem ter os seus ótimos ajustados à espécie de microalga cultivada. Quando há limitação nutricional (N e P), as células param de se multiplicar e permanecem acumulando reservas, o que leva ao aumento da quantidade de lipídios (SCHENK *et al.* 2008). O cultivo de *Isochrysis galbana* por SPECTOR *et al.* (2008), em condições de estresse de nitrogênio, aumentou o acúmulo de óleo em 40%. A substituição de nitrato por amônia também foi realizada pelos autores e observou-se uma antecipação da fase estacionária, o que indica um aumento na quantidade de lipídios.

Adicionalmente, a composição bioquímica da alga é intensamente afetada pelo estado nutricional da cultura: limitações nutricionais modificam a composição em ácidos graxos. De acordo com OTERO *et al*. (1997), sob condições limitantes de nitrogênio lipídios saturados e monoinsaturados são comumente estocados como reserva energética da célula. Quando há renovação do meio com a adição de nitrogênio, há um aumento da quantidade de lipídios insaturados, necessários ao crescimento celular. A Tabela 2.13 apresenta algumas espécies e seu respectivo teor em óleo.

Tabela 2.13: Teor de óleo para algumas espécies de microalgas

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

Fonte: Chisti, 2007

A composição do óleo afeta a qualidade do biodiesel. De acordo com a norma européia (EN 14214) o biodiesel não pode conter mais que 12% de éster metílico de ácido linoleico (18:3) na sua composição. A Tabela 2.14 apresenta a composição do óleo da microalga *Isochrysis galbana* antes e depois da transesterificação para obtenção de biodiesel.

Tabela 2.14: Composição do óleo e biodiesel derivado da microalga *I. galbana*

	Composição do óleo (%)	Composição do biodiesel (FAME) (%)
C14:0	25.0 ± 0.20	18.8 ± 0.16
C15:0	1.2 ± 0.07	<0.1
C16:0	22.0 ± 0.74	16.5 ± 1.45
C16:1	8.1 ± 0.07	4.2 ± 0.53
C18:0	2.7 ± 0.01	3.7 ± 0.24
C18:1	22.3 ± 1.75	18.5 ± 1.66
C18:2	3.8 ± 0.10	15.6 ± 1.13
C18:3	3.3 ± 0.16	<0.1
C20:3n6c	<0.1	6.7 ± 0.32
C20:4n-6c	8.7 ± 0.28	9.5 ± 0.40
C22:6n3c	2.9 ± 0.17	6.6 ± 1.72
Índice de iodo (g I_2/100 g amostra)	42.1	47.1

Fonte: Sánchez et al. 2012

O óleo de *I. galbana* é rico em ácidos graxos poliinsaturados. Este fato é comum em óleo de microalga, todavia ácidos graxos com quatro ou mais insaturações

apresentam problemas na estocagem devido à oxidação. A norma europeia para o biodiesel (EN 14214 e EN 14213) limita a quantidade de metil ésteres de ácidos graxos com quatro ou mais ligações duplas para no máximo 1% (SÁNCHEZ *et al.* 2012). Entretanto, os ácidos graxos poliinsaturados podem ser reduzidos com o emprego de tratamentos como a hidrogenação catalítica parcial do óleo (DIJKSTRA, 2006). Outra questão a ser considerada é a forma como os ácidos graxos poliinsaturados são medidos em combustíveis, isto é, o índice de iodo (determina o total de insaturações no óleo). De acordo com SANCHEZ *et al.* (2012), tem o valor de 47,1 g I_2/100g de amostra para o óleo de *I. galbana* , o que está distante do limite da norma europeia que é de 120 g I_2/100g de amostra. A Tabela 2.15 apresenta uma comparação entre o biodiesel de microalga, o diesel de origem fóssil e o padrão ASTM.

Tabela 2.15: Comparação entre o óleo de microalga (*Chlorella protothecoides*), o diesel comum e o padrão ASTM para biodiesel

Propriedades	Biodiesel de óleo de microalga	Diesel comum	Padrão ASTM biodiesel
Densidade (kg/L)	0,864	0,838	0,84-0,90
Viscosidade cinemática a 40ºC ($mm^2 .s^{-1}$)	5,2	1,9-4,1	3,5-5,0
Ponto de fulgor (ºC)	115	75	min 100
Ponto de congelamento (ºC)	-12	-50 a 10	
CFPP(ºC)	-11	-3 (max -6,7)	verão max 0, inverno max<-15
acidez (mg KOH/g)	0,374	max 0,5	max 0,5
poder calorífico (MJ/kg)	41	40-45	
razão H/C	1,81	1,81	

CFPP= ponto de entupimento de filtro a frio. Fonte:Huang et al., 2010

A Tabela 2.16 apresenta a composição total de ácidos graxos saturados, mono-insaturados e poli-insaturados para algumas espécies de microalgas e oleaginosas e demonstra que a composição varia com a espécie.

O biodiesel de algas tem várias vantagens sobre o diesel de petróleo, a saber: é derivado de biomassa e, portanto, é renovável, biodegradável, e quase neutro em carbono sob produção sustentável; é não tóxico e os gases oriundos de sua queima contém níveis reduzidos de partículas, monóxido de carbono, fuligem, hidrocarbonetos e SOx. Quando comparado com o biodiesel de primeira geração, o biodiesel de algas é mais adequado para uso na indústria de aviação, onde baixos pontos de congelamento e

altas densidades energéticas são critérios fundamentais (BRENNAN & OWENDE 2010).

As microalgas apresentam potencial na produção de biodiesel. Entretanto, de acordo com ACIÉN *et al.* (2012) a substituição do diesel fóssil por biodiesel de microalga na Europa requer uma área de 9,25 milhões de hectares (área próxima à extensão de Portugal), assumindo uma produtividade de 40.000L/ha.ano. Isto é, assim como o biodiesel oriundo de oleaginosas, o biodiesel de microalgas poderá ser potencialmente uma fração do combustível utilizado para transporte.

.

Tabela 2.16: Composição do Óleo de Microalgas X Óleo de Plantas Oleaginosas

	ÁCIDOS GRAXOS (% MÁSSICA)																									
MICROALGAS	**14:0**	**16:0**	**18:0**	**20:0**	**22:0**	**24:0**	**AGS**	**16:1n-7**	**18:1n-9**	**18:1n-7**	**20:1n-9**	**22:01**	**AGMI**	**16:2n-4**	**16:3n-4**	**18:2n-6**	**18:3n-3**	**18:4n-3**	**20:4n-6**	**20:4n-3**	**22:3**	**20:5n-3**	**22:5n-3**	**22:6n-3**	**AGPI**	**outros**
Nitzschia ovalis	2,67	13,25	0,45	-	-	-	16,37	17,12	0,59	0,33	-	-	18,04	2,45	7,2	0,43	0,37	-	4,4	-	-	26,67	0,28	4,2	46	19,59
Thalassiosira sp.	4,59	19,61	0,35	-	-	-	24,55	31,47	0,41	0,27	-	-	32,15	7,45	2,84	2	1,1	2,15	0,12	0,16	-	16,65	-	1,33	33,8	9,5
Tetraselmis sp.	1,31	15,33	0,43	-	-	-	17,07	3,23	12,25	2,26	1,12	-	18,86	4,51	0,35	9,66	16,17	1,8	0,99	0,16	-	4,7	-	-	38,38	25,69
Dictyosphaerium pulchellum	2,38	12,56	0,77	-	-	-	15,71	2,11	2,51	-	-	-	4,62	3,06	0,69	7,76	26,49	1,84	-	-	-	-	-	-	39,84	39,83
Stichococcus sp.	2,12	17,61	0,54	-	-	-	20,27	-	2,87	1,63	0,15	-	4,65	0,19	-	14,78	25,71	-	-	-	-	-	-	-	40,68	34,4
Chlorella sp.	1,58	13,08	1,23	-	-	-	15,89	-	6,68	1,21	0,12	-	8,01	-	9,56	17,54	20,02	-	-	-	-	-	-	-	47,12	28,98
Scenedesmus sp.	1,12	5,76	0,33	-	-	-	7,21	1,06	2,65	0,22	0,49	-	4,42	1,24	0,92	4,67	20,79	2,52	-	-	-	-	-	-	30,14	58,23
Anacystis sp.	3,66	27,6	1,4	-	-	-	32,66	9,28	4,83	4,04	-	-	18,15	-	0,35	1,6	23,18	-	-	-	-	-	-	-	25,13	24,06
Synechococcus sp.	25,96	13,94	0,58	-	-	-	40,48	34,91	1,7	-	-	-	36,61	-	0,15	1,46	-	-	-	-	-	-	-	-	1,61	21,3
Synechocystis sp.	13,34	5,89	1,17	-	-	-	20,4	16,72	1,22	-	-	-	17,94	1,96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,96	59,7
média							21,06						16,34												30,46	
desvio padrão							8,58						10,27												14,95	
OLEAGINOSAS	**14:0**	**16:0**	**18:0**	**20:0**	**22:0**	**24:0**	**AGS**	**16:1n-7**	**18:1n-9**	**18:1n-7**	**20:1n-9**	**22:01**	**AGMI**	**16:2n-4**	**16:3n-4**	**18:2n-6**	**18:3n-3**	**18:4n-3**	**20:4n-6**	**20:4n-3**	**22:3**	**20:5n-3**	**22:5n-3**	**22:6n-3**	**AGPI**	**outros**
Milho	-	11,67	1,85	0,24	0	0	13,76	-	25,16	-	-	0	25,16	-	-	60,6	-	-	-	-	0,48	-	-	-	61,08	-
Algodão	-	28,33	0,89	0	0	0	29,22	-	13,27	-	-	0	13,27	-	-	57,51	-	-	-	-	0	-	-	-	57,51	-
crambe	-	2,07	0,7	2,09	0,8	1,12	6,78	-	18,86	-	-	58,51	77,37	-	-	9	-	-	-	-	6,85	-	-	-	15,85	-
Amendoim	-	11,38	2,39	1,32	2,52	1,23	18,84	-	48,28	-	-	0	48,28	-	-	31,95	-	-	-	-	0,93	-	-	-	32,88	-
Canola	-	3,49	0,85	0	0	0	4,34	-	64,4	-	-	0	64,4	-	-	22,3	-	-	-	-	8,23	-	-	-	30,53	-
Soja	-	11,75	3,15	0	0	0	14,9	-	23,26	-	-	0	23,26	-	-	55,53	-	-	-	-	6,31	-	-	-	61,84	-
Girassol	-	6,08	3,26	0	0	0	9,34	-	16,93	-	-	0	16,93	-	-	73,73	-	-	-	-	0	-	-	-	73,73	-
média							13,88						38,38												47,63	
desvio padrão							7,77						23,27												19,57	

Fontes: Ma e Hann, 1999, Pratoomyot et al., 2005
AGS = ácido graxo saturado; AGMI = ácido graxo monoinsaturado; AGPI = ácido graxo poliinsaturado

2.8 ALTERNATIVAS DE PROCESSAMENTO DA BIOMASSA

A biomassa obtida na etapa de cultivo pode ser processada para a obtenção de energia ou produtos químicos. As várias opções tecnológicas existentes para esse processamento primário da biomassa classificam-se em bioquímicas ou termoquímicas. A conversão bioquímica, que emprega enzimas e micro-organismos, inclui a digestão anaeróbia e a fermentação para produção de metano e bioetanol. A conversão termoquímica engloba a gaseificação, a pirólise (lenta, rápida, *flash* e vácuo), o refino hidrotérmico (em água ou solvente) e a combustão (PITTMAN *et al*. 2011).

Como produtos resultantes do processamento primário, destacam-se aqui o biogás (metano), o gás de síntese (*Syngas*, oriundo da gaseificação) e o bio-óleo, matérias primas para a obtenção de olefinas leves, combustíveis líquidos e/ou geração de energia, através do processamento secundário. A Figura 2.20 apresenta as alternativas mais promissoras para a obtenção de cada um desses produtos.

Questões de segurança energética, aliadas ao problema ambiental representado pelo aquecimento global, apontam para um mercado de biocombustíveis crescente, o que influencia na escolha da rota de aproveitamento da biomassa. Atualmente, a energia combustível é um recurso vital, e assim se manterá no futuro. Combustíveis renováveis para transporte, neutros do ponto de vista de emissão de CO_2, são necessários para sustentabilidade econômica e ambiental. De acordo com BRENNAN & OWENDE (2010) as condições para um biocombustível ser técnica e economicamente viável são: deve ser competitivo ou custar menos do que combustíveis derivados do petróleo; deve exigir baixo ou nenhum uso de terra adicional; deve permitir a melhoria da qualidade do ar (sequestro de CO_2, por exemplo), e, deve exigir o mínimo uso da água. A exploração adequada de microalgas pode atender a essas condições e, portanto, fazer uma contribuição significativa para atender a demanda de energia primária, ao mesmo tempo em que proporciona benefícios ambientais.

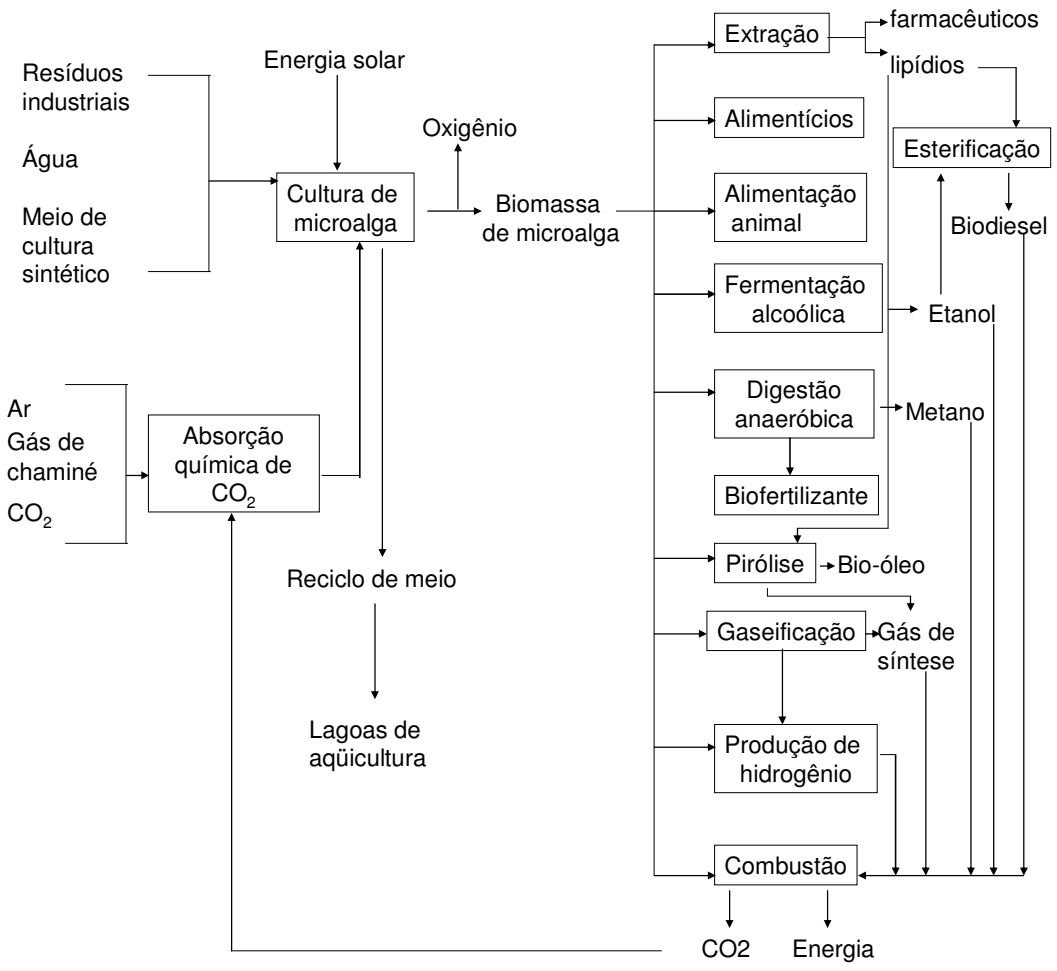


Figura 2.20: Processamento Primário da Biomassa: Alternativas em Destaque.
Fonte: Costa e Morais, 2011

O cultivo de microalgas apresenta-se ao mercado de energia como uma tecnologia que combina a necessidade de abatimento de CO_2 do setor elétrico com a necessidade de alternativas de combustíveis para o setor de transporte. Aliam-se a este cenário as possibilidades de cultivo de biomassa algal em áreas desérticas (que contam com alta irradiação solar, mas têm baixo valor econômico para outros cultivos), e de utilização do CO_2 emitido pela atividade industrial. Para maior rentabilidade do processo, a coprodução de bioprodutos de alto valor agregado junto à rota de processamento (termoquímico) da biomassa a *commodities*, foi sugerido por LI *et al.* (2008). A Tabela 2.17 traz informações acerca desses bioprodutos.

Tabela 2.17: Bioprodutos de Alto Valor Agregado

Produto	Microalga	Preço (USD)	Produtor
β-caroteno	*Dunaliella*	300-3.000/kg	AquaCarotene (EUA)
			Cognis Nutrition e Health (AUT)
			Nikken Sohonsha Corporation (JAP)
			Tianjin Lantai Biotechnology (CHI)
			Parry Pharmaceuticals (IND)
Astaxantina	*Haematococcus*	10.000/kg	AlgaTechnologies (ISR)
			Bioreal (EUA)
			Cyanotech (EUA)
			Mera Pharmaceuticals (EUA)
			Parry Pharmaceuticals (IND)
Suplementos alimentares	*Spirulina, Chlorella, Chlamydomonas*	50/kg	BlueBiotech International GmbH (ALE)
			Cyanotech (EUA)
			Earthrise Nutritionals (EUA)
			Psycotransgenics (EUA)
Ração para peixes	*Tetraselmis,*	70/L	Aquatic Eco-Systems (EUA)
	Nannochloropsis,		BlueBiotech International GmbH (ALE)
	Isocrysis,		Coastal BioMarine (EUA)
	Nitzschia		Reed Mariculture (EUA)
Ácidos graxos poliinsaturados	*Crypthecodinium, Schizochytrium*	60/g	BlueBiotech International GmbH (ALE)
			Spectra Stable Isotopes (EUA)
			Market Biosciences (EUA)
Metabólitos com isótopo pesado para marcação	ND	1.000-20.000/g	Spectra Stable Isotopes (EUA)
Ficoeritrina	rodofíceas,	15/mg	BlueBiotech International GmbH (ALE)
	ciano bactérias		Cyanotech (EUA)
Drogas anti-câncer	ND	ND	PharmaMar (ESP)
Proteínas farmacêuticas	*Chlamydomonas*	ND	Rincon Pharmaceuticals (EUA)
Biocombustíveis	*Botryococcus, Chlamydomonas, Chlorella, Dunaliella, Neochloris*	ND	Cellana (EUA)
			GreenFuel Technologies (EUA)
			LiveFuels, Inc. (EUA)
			PetroAlgae (EUA)
			Sapphire Energy (EUA)
			Solazyme, Inc. (EUA)
			Solix Biofuels (EUA)

ND – informação não disponível; Adaptado de Rosenberg et al. 2008

2.8.1 DIGESTÃO ANAEROBIA

A Digestão Anaeróbia (DA) é o processo pelo qual a biomassa é degradada anaerobiamente por bactérias. A suspensão de microalgas proveniente do fotobiorreator passa pela etapa de colheita, da qual se obtém uma suspensão concentrada com cerca de 10% de biomassa. Esta suspensão segue para o digestor anaeróbio, obtendo-se biogás –

constituído majoritariamente por metano (60%) e dióxido de carbono – e lodo (Figura 2.21) (NEENAM *et al.* 1986).

BUEKENS (2005) apresenta um balanço de massa de um processo de DA de rejeitos sólidos municipais: 1 kg de rejeitos dá origem a 0,16 kg de biogás e 0,67 kg de lodo. Este lodo deve ser tratado antes de descartado. O biogás segue para operação de tratamento (por exemplo, um módulo de membranas), onde o CO_2 é retirado e reciclado para o fotobiorreator. O metano é alimentado à unidade de processamento químico onde pode ser convertido a produtos químicos de interesse.

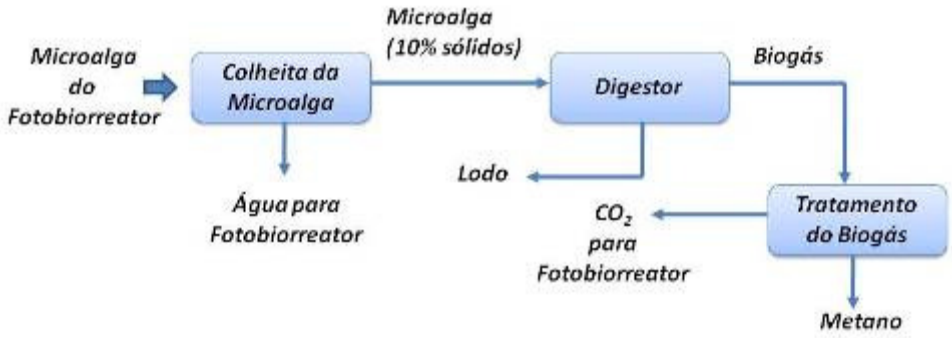


Figura 2.21: Digestão anaeróbia. Adaptado de Neenam et al. 1986

Como em vários processos bioquímicos, o sucesso da digestão depende de fatores como temperatura, umidade, teor de nutrientes e pH. A DA pode ocorrer nas faixas mesofílicas (30-40°C) e termofílicas (50-60°C). Apesar de o processo termofílico reduzir o tempo de reação, com consequente redução do volume do digestor, a DA mesofílica é mais comum. São recomendados teores de umidade na biomassa superiores a 85%. A digestão seca exige que a massa de sólidos secos seja superior a 15%. Caso contrário, tem-se a digestão úmida.

As microalgas tem elevado conteúdo proteico o que resulta em baixas razões C:N, e pode afetar a digestão anaeróbia. Outro fator associado a baixas razões C:N é a produção de amônia, que inibe micro-organismos anaeróbios. Para aumentar a produção de metano tem-se utilizado a co-digestão, onde produtos com alta razão C:N são adicionados à biomassa algal (BRENNAN & OWENDE, 2010).

Os tipos de digestores anaeróbios incluem: lagoas cobertas, digestores batelada, digestores *plug flow*, tanques CSTR, *Upflow Anaerobic Sludge Blankets* (UASB), e reatores batelada sequencial anaeróbios (RBSA), entre outros. Os digestores podem ser de único estágio ou de múltiplos estágios. Em digestores de estágio único, todas as bactérias encontram-se no mesmo vaso, e as condições operacionais não são necessariamente ótimas para uma bactéria específica, mas aceitáveis para todas. Em digestores de múltiplos estágios, o substrato passa progressivamente por vasos sequenciados. Quando dois tanques são utilizados, no primeiro ocorre a hidrólise, a acidogênese e a acetagênese, enquanto o segundo otimiza a formação de metano a partir dos voláteis (BUEKENS, 2005).

Os digestores de mistura completa são reservatórios verticais de concreto ou aço, que podem processar uma concentração sólida de 3% a 10%, e operam tanto nas faixas mesofílicas quanto termofílicas, com tempo de retenção hidráulica (TRH) de 10 a 20 dias. Os digestores *plug flow* são tubos, selados com uma tampa expansível, que operam normalmente com concentração de sólidos entre 11% e 13%, na faixa mesofílica, com tempo de residência hidráulico (TRH) de 20 a 30 dias. As lagoas, por sua vez, são cobertas com capas impermeáveis que coletam o biogás produzido, operando com sólidos na concentração de 0,5 a 3%, à temperatura ambiente. Apesar de oferecerem menor custo, a temperatura varia com a estação do ano, o que impacta no rendimento do processo.

A tecnologia de DA é uma tecnologia bem desenvolvida, estimando-se uma capacidade mundial instalada de 5400 a 6400 MW, com cerca de 95% desta capacidade localizada na Ásia. Os países europeus têm 307MW instalados destacando-se a Alemanha (150MW) (WEILAND, 2000). Dados da IEA (2005) mostram que, entre 1982 e 2002, foram implantadas na Europa, nos EUA e no Canadá, 133 plantas de DA de bioresíduos, com capacidade variando entre 3 e 300 mil t/ano, conforme a Figura 2.22, onde observa-se que a DA é empregada preferencialmente em escala de até 150 mil t/ano. Considerando-se que 15% dessa massa correspondem à biomassa (descontando a umidade), para o rendimento apontado por BUEKENS (2005), uma planta seria capaz de gerar 14,4 mil t/ano de CH_4, com a produção 100,5 mil t/ano de lodo. O sequestro de CO_2 seria de 34,4 mil t /ano.

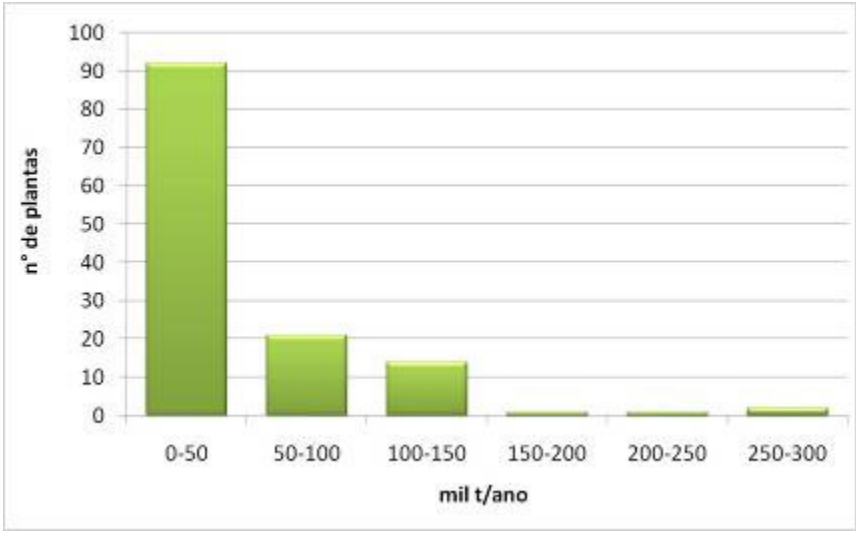


Figura 2.22: Plantas de DA Instaladas na Europa e na América do Norte entre 1982 e 2002. Elaborado a partir de EIA, 2005

Após remoção de condensado, CO_2 e H_2S, o biogás é comprimido, resfriado, desidratado e transportado por dutos até o destino para queima em caldeiras, ou pode ser usado localmente para geração de vapor. Alternativamente, pode ser empregado na geração de eletricidade (com turbinas a vapor, por exemplo).

A conversão de biogás em produtos químicos como metanol, amônia e ureia é possível, sendo metanol a opção de maior viabilidade econômica. Contudo, para que o biogás possa ser convertido a metanol de alta pureza, deve-se remover água e CO_2.

2.8.2 GASEIFICAÇÃO

A gaseificação consiste na combustão incompleta da biomassa, na presença de um oxidante (oxigênio puro ou diluído, e/ou vapor de água), levando majoritariamente a CO e H_2 (gás de síntese). Com o processamento secundário, o gás de síntese pode ser convertido a combustíveis líquidos – via síntese de Fischer-Tropsch, ou a olefinas – via síntese direta, ou a partir de intermediários como metanol e dimetil-éter.

Durante a gaseificação, ocorrem inúmeras reações, como as de pirólise, combustão, craqueamento térmico, oxidação parcial e as reações de gaseificação propriamente ditas. O processo se inicia com a pirólise da biomassa, à temperatura em

torno de 500°C. Da pirólise, resultam gases (H_2, CO, CO_2, CH_4), alcatrão (compostos aromáticos, alifáticos e polares) e carvão vegetal. Os produtos da pirólise são então oxidados (parcial ou completamente) pelo oxigênio, em reações altamente exotérmicas, causando, assim, o aumento da temperatura do meio para cerca de 1000°C. Em temperaturas elevadas, o alcatrão sofre craqueamento térmico e o carvão vegetal sofre combustão, ambos dando origem a gases. Os gases reagem ainda entre si e com o carbono (CENBIO, 2002). Dentre as reações, destacam-se:

a) exotérmicas:

combustão:	*voláteis e alcatrão* + $O_2 \rightarrow CO_2$
oxidação parcial:	*voláteis e alcatrão* + $O_2 \rightarrow CO$
metanação:	*voláteis e alcatrão* + $H_2 \rightarrow CH_4$
water-gas shift:	$CO + H_2O \rightarrow CO_2 + H_2$
metanação do CO:	$CO + 3H_2 \rightarrow CH_4 + H_2O$

b) endotérmicas:

reação vapor-carbono:	*voláteis e alcatrão* + $H_2O \rightarrow CO + H_2$
reação de Boudouard:	*voláteis e alcatrão* + $CO_2 \rightarrow 2CO$

A composição do gás de síntese e sua razão CO:H_2 dependem do projeto e das condições de operação do gaseificador, que definem o equilíbrio entre as várias reações que nele ocorrem. Na verdade, boa parte das tecnologias de gaseificação é desenvolvida com o objetivo de gerar energia. Nesses casos, a propriedade mais importante do gás de saída é seu poder calorífico. Por outro lado, a composição química do gás de síntese passa a ser um fator primordial no caso de tecnologias desenvolvidas para a obtenção de gases para sínteses químicas. CIFERNO & MARANO (2002) apontam que, neste segundo caso, faz-se importante operar acima dos 1200°C, temperatura a partir da qual todo o metano é convertido. Além disso, os autores sugerem que a operação a alta pressão (> 20 bar) é interessante, uma vez que os processos subsequentes de síntese se dão a pressões elevadas.

HIRANO *et al.* (1998) realizaram a oxidação parcial de *Spirulina* a uma temperatura variando de 850-1000ºC, e determinou a composição do gás necessária para gerar o rendimento teórico de metanol. Eles observaram que a gaseificação da biomassa de algas a 1000ºC produziu o maior rendimento teórico de 0,64 g de metanol a partir de 1 g de biomassa. Também estimaram um balanço de energia (razão de

metanol produzido para a energia total requerida) de 1,1, o que resulta em um balanço de energia positivo na gaseificação, entretanto o baixo valor foi atribuído ao alto requerimento de energia no processo de centrifugação durante a colheita da biomassa.

2.8.3 LIQUEFAÇÃO OU PIRÓLISE

Entende-se por pirólise a decomposição térmica da biomassa, na ausência de oxigênio, ou quando este gás está presente em quantidade bastante inferior àquela necessária para a combustão completa (MOHAN *et al.*, 2006). A pirólise de biomassa produz bio-óleo que pode ser hidrotratado (em processo dedicado ou em refinarias de petróleo com gasóleo de vácuo) ou transesterificado para obtenção de diesel verde ou biodiesel, respectivamente. Alternativamente, o bio-óleo pode ser gaseificado, produzindo gás de síntese (MA & HANN, 1999). Como subprodutos da pirólise, tem-se carvão e um gás composto majoritariamente por CO, H_2, CO_2, CH_4, C_2H_6, C_2H_4, C_3H_6, CH_3OH e C_2H_4O (SENSÖZ *et al.*, 2006). As temperaturas típicas de pirólise variam entre 400 e 700°C, enquanto a pressão é atmosférica.

A composição dos produtos da pirólise depende do tipo de biomassa e das condições operacionais utilizadas. Dessa forma, o gás de pirólise pode conter dezenas de componentes. Como resultado da pirólise de diferentes espécies de madeira, ZHANG *et al.* (2007) reportam um gás com 40 componentes. O bio-óleo obtido no mesmo experimento, por sua vez, é uma mistura de 109 componentes, dentre os quais cetonas, álcoois, cresóis, aromáticos e poliaromáticos.

Embora complexa, a pirólise é descrita de modo simplificado por MOHAN *et al.* (2006) nas seguintes etapas:

a) o processo se inicia com o aquecimento, através do uso de uma fonte externa de calor;
b) as reações primárias de pirólise têm início, com a liberação de voláteis e a formação de carvão;
c) os voláteis transferem calor à matéria ainda não pirolisada;
d) a condensação dos voláteis nas partículas mais frias de matéria, seguida de reações secundárias entre ambos, produz óleo;

e) as reações autocatalíticas secundárias prosseguem, competindo com as reações primárias (item b);
f) ocorrem as reações de decomposição térmica, reforma, *water-gas shift*, recombinação de radicais e desidratação, as quais são funções do tempo de residência, da temperatura e da pressão de operação do processo.

MIAO & WU (2004) utilizaram a pirólise rápida para melhorar o rendimento de bio-óleo a partir da biomassa de *Chlorella prothothecoides* crescida em cultivo heterotrófico. O rendimento em bio-óleo relatado pelos autores foi de 57,9% em peso seco (poder calorífico de 41 MJ/kg). Os resultados sugerem que a pirólise tem potencial na conversão de biomassa algal em combustível líquido. DEMIRBAS (2006) mostrou que a produção de bio-óleo a partir da microalga *Chlorella prothothecoides* aumentou linearmente com a temperatura até um ponto e depois diminuiu em temperaturas mais elevadas. Por exemplo, o rendimento aumentou de 5,7% para 55,3% com um aumento de 254-502ºC, e subsequentemente diminuiu para 51,8% a 602ºC. Ainda de acordo com DEMIRBAS (2006) os resultados indicam que os bio-óleos de microalgas são de uma qualidade mais elevada do que os óleos extraídos de materiais lignocelulósicos.

2.9 MOTIVAÇÃO DO TRABALHO

A literatura, em resumo, aponta o potencial de produção não só de biodiesel, mas de uma ampla gama de produtos tanto de energia quanto químicos e bioquímicos. Esses, normalmente, com altos valores agregados e baixa escala de produção, enquanto os primeiros requerem intensificação de processos e economia de escala. Adicionalmente, detêm-se do apresentado, que a etapa de reação (biofixação de CO_2) e a de separação (colheita da biomassa) são os gargalos da ampliação de escala de produção. O presente estudo enfrenta o primeiro gargalo, a saber, a biofixação de CO_2.

Para tal, entende-se que a grande variabilidade de composição bioquímica de microalgas encontradas na natureza demanda Metodologia de *Screening* que permita identificar espécies mais aptas a maximizar objetivos de produção, não apenas selecionadas com base em taxa de crescimento ou teor de lipídios como frequentemente

apresentado. Neste sentido, o presente trabalho propõe metodologia auxiliada por computador que visa discriminar espécies frente a métricas de produção.

Um segundo aspecto relevante na biofixação é maximizar produção com mínimo de *footprint*, reduzindo aspectos desfavoráveis como contaminação e ineficiência de agitação. Para tal, o trabalho apresenta as premissas de desenvolvimento, projeto e construção de fotobiorreator. Baseado em toda a pesquisa bibliográfica realizada, o fotobiorreator tubular foi escolhido por apresentar maior possibilidade de aumento de escala e a tecnologia *air-lift* é empregada na movimentação da cultura, pois o emprego de bomba aumenta os custos e causa estresse celular. A literatura também possibilitou o desenvolvimento de uma metodologia de *screening* que apontou as microalgas *I. galbana* e *B.braunii* para produção de Syngas e biohidrogênio. *I. galbana* foi então selecionada por apresentar outras características favoráveis como elevada taxa de crescimento e potencial na biofixação de CO_2. O cultivo *indoor* foi realizado com o objetivo de estudar *I. galbana* em termos de produtividade de biomassa e lipídios. Por último a produção *outdoor* na planta piloto foi realizada.

CAPÍTULO 3 – *SCREENING* DE MICROALGAS

Neste capítulo apresenta-se metodologia desenvolvida nesta Tese para *Screening* de espécies de microalgas cujos princípios e possíveis aplicações foram extensivamente discutidos em PICARDO *et al.* (2012). Devido à razoável estanqueidade do tópico no contexto deste trabalho, e também devido a ter sido o *Screening* um dos pilares desta Tese, a apresentação é feita em modo *auto-contido*, i.e. será composta como um item acabado com suas próprias *Descrição Metodológica, Seção de Aplicações* e *Seção de Conclusões*. Este proceder, embora não propriamente ortodoxo, não raro pode ser encontrado em Teses de Doutorado.

3.1 METODOLOGIA PARA *SCREENING*

Dada a complexidade dos padrões de alocação de carbono e a variabilidade entre as espécies de microalgas, a identificação do organismo ideal para cada aplicação específica não é uma tarefa simples. Neste contexto, este trabalho apresenta uma metodologia conceitual para triagem rápida (*Screening*) de microalgas (PICARDO *et al.* 2012). A Metodologia de *Screening* baseia-se em um banco de dados montado com informações da literatura para 45 espécies de microalgas, abrangendo taxas de crescimento e a composição da biomassa. O procedimento envolve informações quantitativas de processamento da biomassa, sendo, portanto orientada pelo processo utilizado, isto é, a abordagem demanda técnicas de síntese de processos e comparação de alternativas de processos químicos, recursos estes afins com Engenharia de Processos. As aplicações ilustrando a Metodologia no contexto de utilização de biomassa para produção de energia foram: (a) cálculo de poder calorífico de biomassa; (b) produção de gás de síntese; e (c) produção de Bio-H_2.

Conforme apontado em PICARDO *et al.* (2012), os dados de interesse são normalmente relatados na literatura em termos de:

(a) fração másssica de proteínas, lipídios, carboidratos e cinzas, denominada no presente trabalho como Composição Tipo I.

(b) fórmula empírica aparente, ou seja, a razão molar dos elementos presentes nas células (C, H, O, N, P e, mais raramente, Mg, Na, Ca, Fe e outros metais), denominada Composição Tipo II.

Como os dados da literatura sobre a composição bioquímica de microalgas se apresentam aleatoriamente distribuídos nestas duas formas, torna-se necessário um procedimento para a conversão da composição do Tipo I para Tipo II, e *vice-versa*, de modo a permitir a construção de um banco de dados com composições segundo um padrão uniforme. O procedimento de interconversão do Tipo I a Tipo II baseia-se na fórmula empírica aparente de biomoléculas típicas, tais como proteínas, lipídios, carboidratos, ácidos nucleicos e polifosfatos, de acordo com as fórmulas anteriormente definidas por NORLAND *et al.* (1995) e HO *et al.* (2003), apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Composição elementar das principais biomoléculas (% em peso, WI)

	C	**N**	**O**	**P**	**S**	**H** (*)	**K**	**Ca**	**Mg**	**Fe**
Proteína	0,52	0,16	0,22	0,00	0,01	0,09	-	-	-	-
Carboidrato	0,4	0,00	0,53	0,00	0,00	0,07	-	-	-	-
Lipídios	0,8	0,00	0,08	0,00	0,00	0,12	-	-	-	-
Outros (***)	0,38	0,17	0,31	0,10	0,00	0,04	-	-	-	-
Cinzas (**)	0,00	0,00	0,29	0,19	0,00	0,00	0,32	0,09	0,11	0,00

Fontes: Norland et al., (1995); Ho et al., (2003)
(*)Hidrogênio estimado para completar 100%.
(**)Composição normalizada.
(***) Composição calculada a partir dos valores para os ácidos nucleicos.

A composição de cinzas foi estimada a partir das contribuições inorgânicas da fórmula estendida de Redfield:

$$(C_{124}N_{16}P_{1}S_{1.3}K_{1.7}Mg_{0.56}Ca_{0.5})_{1000}Sr_{5.0}Fe_{7.5}Zn_{0.80}Cu_{0.38}Co_{0.19}Cd_{0.21}Mo_{0.03}$$

(HO *et al.* 2003)

Com a fórmula de Redfield a composição de cinzas foi obtida pela reunião de fosfatos metálicos e de óxidos metálicos que podem ser criados a partir dos elementos necessários (isto é, P, K, Mg, Ca e Fe), cujas frações são iguais ou superiores a 0,01%

em peso (HO *et al.* 2003). A composição em cinzas foi normalizada com base na concentração de fósforo na biomassa em questão.

O procedimento para a interconversão das composições de Tipo I e Tipo II é exemplificado (PICARDO *et al.* 2012) em termos de cinco principais átomos C, N, H, O, S, através da definição de vetores $\underline{M}$, $\underline{W}$ e matriz $\underline{\underline{X}}$ conforme:

- Frações mássicas dos principais elementos na biomassa (C, N, H, O e S);

$$\underline{M} = \begin{bmatrix} m_C \\ m_N \\ m_H \\ m_O \\ m_S \end{bmatrix}$$

- Frações mássicas dos principais *pools* celulares (Proteínas, Lipídios, Carboidratos), cinzas e outras macromoléculas;

$$\underline{W} = \begin{bmatrix} w_{PROT} \\ w_{LIP} \\ w_{CHO} \\ w_{CINZAS} \\ w_{OUTRAS} \end{bmatrix}$$

- Composição elementar das principais macromoléculas, onde $x_{i,j}$ representa a fração mássica do elemento *j* no *pool i* (e.g. $x_{PROT,C}$ é a fração mássica de carbono na molécula modelo de proteína como apresentado na Tabela 3.1).

$$\underline{\underline{X}} = \begin{bmatrix} x_{PROT,C} & x_{PROT,N} & x_{PROT,H} & x_{PROT,O} & x_{PROT,S} \\ x_{LIP,C} & x_{LIP,N} & x_{LIP,H} & x_{LIP,O} & x_{LIP,S} \\ x_{CHO,C} & x_{CHO,N} & x_{CHO,H} & x_{CHO,O} & x_{CHO,S} \\ x_{CINZAS,C} & x_{CINZAS,N} & x_{CINZAS,H} & x_{CINZAS,O} & x_{CINZAS,S} \\ x_{OUTRAS,C} & x_{OUTRAS,N} & x_{OUTRAS,H} & x_{OUTRAS,O} & x_{OUTRAS,S} \end{bmatrix}$$

A conversão do Tipo I para Tipo II (i.e. dado $\underline{W}$, calcular $\underline{M}$) é obtida via Eq. (3.1):

$$\underline{M} = \underline{\underline{X}}^T \underline{W} \tag{3.1}$$

Reciprocamente, a transformação do Tipo II em Tipo I (i.e. dado $\underline{M}$, calcular $\underline{W}$) é obtida com a Eq. (3.2):

$$\underline{W} = \left[\underline{\underline{X}}^T\right]^{-1} \underline{M} \tag{3.2}$$

A Figura 3.1 sumariza a Metodologia de *Screening* proposta.

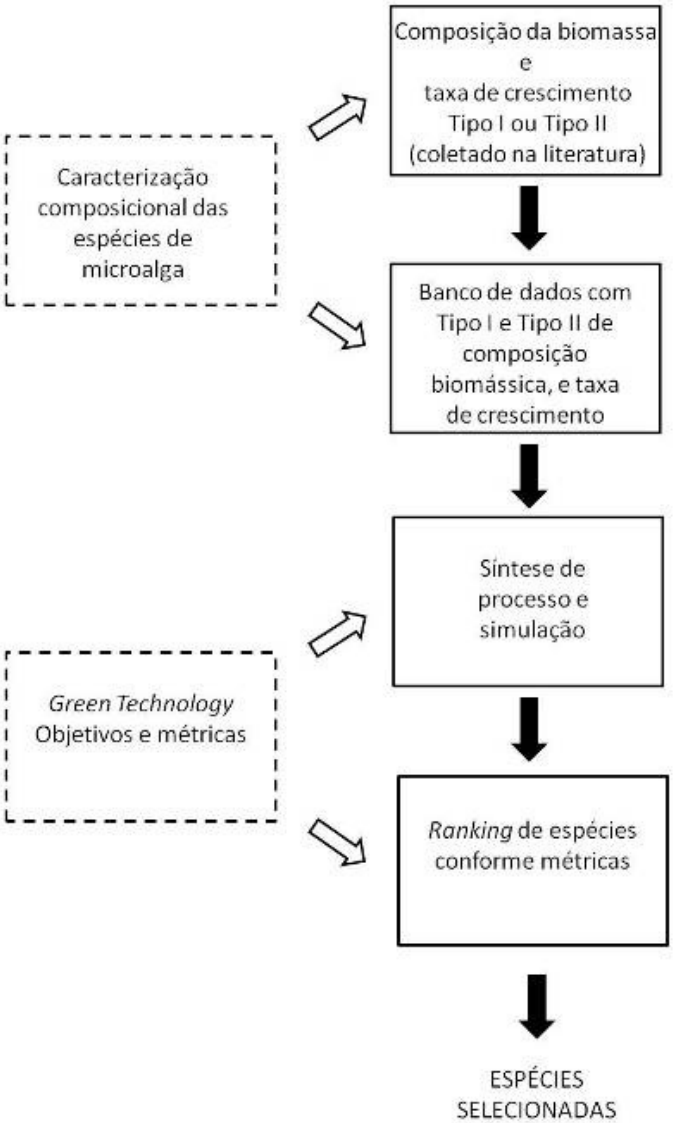


Figura 3.1: Principais Etapas da Metodologia para *Screening* de Espécies de Microalgas.

A Metodologia de *Screening* proposta abrange as seguintes etapas:

ETAPA 1: *Dados coletados da literatura do Tipo I e/ou Tipo II de composição da biomassa e taxa de crescimento.* A literatura é pesquisada para composição bioquímica de espécies de microalga, bem como, a taxa de crescimento específico, μ (d^{-1}), sob condições de crescimento desejadas, para as espécies do banco de dados;

ETAPA 2: *Banco de dados com composição Tipo I e Tipo II e taxa de crescimento.* Interconversão de dados do Tipo I e Tipo II é realizada e armazenada como:

$$C_a\, N_b\, O_c\, P_d\, S_e\, H_f\, K_g\, Ca_h\, Mg_i\, Fe_j\ (a = 1);$$

ETAPA 3: *Síntese de processo químico e simulação.* A aplicação de técnicas de engenharia de processos químicos permite orientar a seleção de métricas com o propósito de estabelecer um *ranking* de espécies com respeito à resposta do processo nestas métricas (por exemplo, econômica, energética, ambiental). Na etapa de síntese de processo o fluxograma de processo químico utilizado para cada espécie algal é simulado em software comercial de simulação de processos químicos para quantificar a resposta nas métricas em questão; e

ETAPA 4: *Ranking de espécies segundo a execução das métricas.* A simulação de processos químicos formulados provê dados quantitativos para dar suporte à execução das métricas.

O banco de dados de 45 espécies de microalgas montado para aplicação do procedimento é substanciado através das Tabelas 3.2 e 3.3. Taxas específicas de crescimento de cada espécie, juntamente com as composições bioquímicas (proteínas, carboidratos, lipídios e cinzas) são apresentados na Tabela 3.2. A Tabela 3.3 detalha fórmulas empíricas mínimas com base nas composições elementares para as principais moléculas (Tabela 3.1) após aplicação do procedimento de conversão de informação composicional descrito anteriormente.

Tabela 3.2: *Screening* de microalgas - Composição bioquímica e taxa de crescimento

Espécies	Composição bioquímica (w_i)					μ (d^{-1})	Referências	
	Prot	Lip.	CHO	cinzas	Outros		Taxa de crescimento (μ)	Composição
1. Aphanothece microscopica Nägeli	0,49	0,08	0,18	0,20	0,05	0,96	Jacob-Lopes et al. 2008	Zepka et al. 2008
2. Botryococcus braunii	0,21	0,54	0,14	0,00	0,11	0,14	Zhila et al. 2005	Feinberg 1984
3. Chaetoceros sp.	0,57	0,15	0,12	0,17	0,16	0,84	Renaud et al. 2002	Renaud et al. 2002
4. Chaetoceros calcitrans	0,33	0,10	0,17	0,29	0,11	0,69	Krichnavaruk et al. 2005	Brown et al. 1989
5. Chaetoceros calcitrans f. pumilus	0,25	0,20	0,20	0,00	0,35	1,50	Raghavan et al. 2008	Raghavan et al. 2008
6. Chaetoceros cf. wighamii	0,35	0,06	0,12	0,00	0,47	0,64	Eissler et al. 2009	Araujo et al. 2005
7. Chaetoceros gracilis	0,12	0,07	0,05	0,00	0,76	1,53	Sunlu et al. 2010	Brown 1991
8. Chaetoceros muelleri	0,34	0,11	0,16	0,00	0,39	1,97	Borges et al. 2007	Rivero-Rodrigues et al. 2007
9. Chlamydomonas reinhardtii	0,48	0,21	0,17	0,00	0,15	1,20	Chen & Johns 1996	Patni et al. 1977
10. Chlamydomonas sp.	0,17	0,23	0,59	0,00	0,01	1,20	Chen & Johns 1996	Feinberg 1984
11. Chlorela pyrenoidosa	0,57	0,02	0,20	0,00	0,21	1,97	Lee 2001	Yang et al. 2000
12. Chlorella sp.	0,47	0,21	0,10	0,00	0,23	0,43	Wang et. al. 2009	Feinberg 1984
13. Chlorella minutissima	0,24	0,31	0,42	0,00	0,03	0,43	Illman et al. 2000	Illman et al. 2000
14. Chlorella protothecoides	0,53	0,15	0,11	0,06	0,16	0,33	Illman et al. 2000	Miao et al. 2004
15. Chlorella sorokiniana	0,42	0,20	0,36	0,00	0,02	0,58	Illman et al. 2000	Illman et al. 2000
16. Chlorella vulgaris	0,29	0,18	0,51	0,00	0,02	0,99	Illman et al. 2000	Illman et al. 2000
17. Cryptomonas sp.	0,50	0,21	0,05	0,15	0,10	0,33	Renaud et al. 2002	Renaud et al. 2002
18. Cyclotella cryptica	0,26	0,17	0,36	0,25	0,00	0,91	Pahl et al. 2010	Pahl et al. 2010
19. Dunaliella salina	0,57	0,09	0,32	0,08	0,00	0,19	Araujo et al. 2009	Brown et al. 1989
20. Dunaliella tertiolecta	0,20	0,15	0,12	0,00	0,53	0,6	Andreasson & Wangberg 2007	Brown 1991
21. Haematococcus pluvialis	0,26	0,09	0,39	0,02	0,02	0,31	Kaewpintong et al. 2007	Boussiba & Vonshak 1991
22. Isochrysis sp.	0,51	0,22	0,14	0,22	0,00	1,60	Thomas et al. 1984	Renaud et al. 2002
23. Isochrysis galbana	0,28	0,39	0,12	0,16	0,05	1,62	Ohse et al. 2008	Fidalgo et al. 1998
24. Isochrysis aff. galbana	0,45	0,30	0,25	0,01	0,00	0,62	Valenzuela-Espinoza et al. 2002	Valenzuela-Espinoza et al. 2002
25. Microcystis aeruginosa	0,31	0,13	0,12	0,14	0,32	0,22	Dasi et al. 1998	Miao & Wu 2004
26. Micromonas pusilla	0,57	0,24	0,04	0,10	0,05	0,50	Martínez-Fernández et al. 2006	Martínez-Fernández et al. 2006

27. Nannochloropsis oculata	0,35	0,18	0,08	0,00	0,39	1,65	Sandnes et al. 2005	Brown 1991
28. Nannochloropsis salina	0,23	0,29	0,07	0,00	0,16	0,53	Hoffmann et al. 2010	Feinberg 1984
29. Navicula incerta	0,07	0,02	0,13	0,68	0,10	0,44	Liu et al. 2010	Affan et al. 2007
30. Nitzschia closterium	0,26	0,13	0,10	0,00	0,51	0,17	Wen & Chen 2000	Brown 1991
31. Nitzschia frustulum	0,23	0,14	0,04	0,34	0,26	0,54	Ryu & Rorrer 2010	Renaud et al. 1999
32. Nitzschia sp.	0,28	0,16	0,05	0,25	0,26	0,16	Wen & Chen 2000	Renaud et al. 1999
33. Pavlova lutheri	0,49	0,12	0,31	0,06	0,02	0,44	Marsot et al. 1995	Brown et al. 1989
34. Pavlova salina	0,26	0,12	0,07	0,00	0,55	0,44	Marsot et al. 1995	Brown 1991
35. Phaeodactylum tricornutum	0,56	0,20	0,11	0,12	0,01	1,44	Miron et al. 2003	Thomas et al. 1983
36. Porphyridium cruentum	0,32	0,06	0,34	0,12	0,16	0,26	Fuentes et al. 1999	Fuentes et al. 1999
37. Pyramimonas sp.	0,59	0,07	0,34	0,15	0,00	0,87	Tzovenis et al. 2009	Tzovenis et al. 2009
38. Rhodomonas sp.	0,58	0,13	0,07	0,21	0,23	0,30	Renaud et al. 2002	Renaud et al. 2002
39. Scenedesmus almeriensis	0,49	0,12	0,25	0,02	0,12	0,63	Sanchez et al. 2008	Scraggi et al. 2002
40. Skeletonema costatum	0,28	0,14	0,12	0,39	0,08	1,92	Borges et al. 2007	Renaud et al. 1999
41. Skeletonema sp.	0,28	0,13	0,04	0,33	0,22	0,84	Meinerz 2007	Renaud et al. 1999
42. Spirulina platensis	0,50	0,17	0,09	0,00	0,25	0,67	Lee 2001	Feinberg 1984
43. Tetraselmis chuii	0,31	0,17	0,12	0,00	0,40	1,13	Borges et al. 2007	Brown 1991
44. Tetraselmis suecica	0,39	0,07	0,08	0,23	0,23	1,54	Ohse et al. 2008	Brown et al. 1989
45. Thalassiosira pseudonana	0,29	0,10	0,17	0,38	0,06	1,72	Ohse et al. 2008	Brown et al. 1989

Tabela 3.3: Fórmula Empírica das Espécies de Microalgas após Tratamento de Informação Composicional Tipo 1 ou Tipo 2

Espécies de microalgas	$C_a N_b O_c P_d S_e H_f K_g Ca_h Mg_i Fe_j$									
	a	**b**	**c**	**d**	**e**	**f**	**g**	**h**	**i**	**j**
1. Aphanothece microscopica Nägeli	1,000	0,184	0,518	0,040	0,005	1,999	0,048	0,014	0,026	0,0000
2. Botryococcus braunii	1,000	0,069	0,233	0,007	0,001	1,838	0,000	0,000	0,000	0,0000
3. Chaetoceros sp.	1,000	0,193	0,431	0,035	0,004	1,923	0,032	0,009	0,017	0,0000
4. Chaetoceros calcitrans	1,000	0,170	0,602	0,070	0,003	1,926	0,079	0,023	0,042	0,0001
5. Chaetoceros calcitrans f. pumilus	1,000	0,170	0,426	0,027	0,002	1,777	0,000	0,000	0,000	0,0000
6. Chaetoceros cf. wighamii	1,000	0,255	0,478	0,040	0,003	1,732	0,000	0,000	0,000	0,0000
7. Chaetoceros gracilis	1,000	0,298	0,513	0,069	0,001	1,491	0,000	0,000	0,000	0,0000
8. Chaetoceros muelleri	1,000	0,217	0,452	0,032	0,003	1,777	0,000	0,000	0,000	0,0000
9. Chlamydomonas reinhardtii	1,000	0,162	0,360	0,011	0,003	1,909	0,000	0,000	0,000	0,0000
10. Chlamydomonas sp.	1,000	0,048	0,544	0,001	0,001	1,982	0,000	0,000	0,000	0,0000
11. Chlorela pyrenoidosa	1,000	0,230	0,473	0,017	0,005	1,934	0,000	0,000	0,000	0,0000
12. Chlorella sp.	1,000	0,182	0,339	0,016	0,003	1,861	0,000	0,000	0,000	0,0000
13. Chlorella minutissima	1,000	0,068	0,420	0,002	0,002	1,943	0,000	0,000	0,000	0,0000
14. Chlorella protothecoides	1,000	0,193	0,383	0,022	0,004	1,914	0,013	0,004	0,007	0,0000
15. Chlorella sorokiniana	1,000	0,115	0,431	0,002	0,003	1,987	0,000	0,000	0,000	0,0000
16. Chlorella vulgaris	1,000	0,084	0,525	0,002	0,002	1,995	0,000	0,000	0,000	0,0000
17. Cryptomonas sp.	1,000	0,173	0,349	0,030	0,004	1,917	0,029	0,008	0,016	0,0000
18. Cyclotella cryptica	1,000	0,087	0,608	0,043	0,002	1,996	0,058	0,017	0,031	0,0001
19. Dunaliella salina	1,000	0,157	0,492	0,012	0,004	2,043	0,016	0,005	0,008	0,0000
20. Dunaliella tertiolecta	1,000	0,220	0,450	0,043	0,002	1,664	0,000	0,000	0,000	0,0000
21. Haematococcus pluvialis	1,000	0,104	0,574	0,006	0,003	2,021	0,005	0,002	0,003	0,0000
22. Isochrysis sp.	1,000	0,141	0,408	0,032	0,004	1,982	0,044	0,013	0,023	0,0000
23. Isochrysis galbana	1,000	0,089	0,316	0,027	0,002	1,884	0,030	0,009	0,016	0,0000
24. Isochrysis aff. galbana	1,000	0,109	0,339	0,001	0,003	1,966	0,002	0,000	0,001	0,0000
25. Microcystis aeruginosa	1,000	0,207	0,487	0,052	0,003	1,785	0,031	0,009	0,017	0,0000
26. Micromonas pusilla	1,000	0,164	0,302	0,018	0,004	1,944	0,019	0,005	0,010	0,0000

27. Nannochloropsis oculata	1,000	0,208	0,377	0,030	0,003	1,760	0,000	0,000	0,000	0,0000
28. Nanochloropsis salina	1,000	0,125	0,275	0,014	0,002	1,820	0,000	0,000	0,000	0,0000
29. Navicula incerta	1,000	0,174	1,702	0,384	0,002	1,835	0,480	0,138	0,258	0,0005
30. Nitzschia closterium	1,000	0,233	0,441	0,042	0,002	1,683	0,000	0,000	0,000	0,0000
31. Nitzschia frustulum	1,000	0,200	0,572	0,100	0,002	1,756	0,096	0,028	0,051	0,0001
32. Nitzschia sp.	1,000	0,194	0,485	0,071	0,003	1,786	0,062	0,018	0,033	0,0001
33. Pavlova lutheri	1,000	0,145	0,475	0,011	0,004	2,015	0,012	0,004	0,007	0,0000
34. Pavlova salina	1,000	0,246	0,441	0,045	0,002	1,661	0,000	0,000	0,000	0,0000
35. Phaeodactylum tricornutum	1,000	0,157	0,354	0,018	0,004	1,984	0,024	0,007	0,013	0,0000
36. Porphyridium cruentum	1,000	0,165	0,619	0,037	0,003	1,931	0,029	0,008	0,016	0,0000
37. Pyramimonas sp.	1,000	0,163	0,545	0,022	0,004	2,054	0,029	0,008	0,016	0,0000
38. Rhodomonas sp.	1,000	0,218	0,444	0,047	0,004	1,887	0,040	0,011	0,021	0,0000
39. Scenedesmus almeriensis	1,000	0,172	0,440	0,012	0,004	1,953	0,004	0,001	0,002	0,0000
40. Skeletonema costatum	1,000	0,150	0,621	0,094	0,003	1,917	0,115	0,033	0,062	0,0001
41. Skeletonema sp.	1,000	0,199	0,551	0,092	0,003	1,804	0,093	0,027	0,050	0,0001
42. Spirulina platensis	1,000	0,200	0,354	0,018	0,004	1,862	0,000	0,000	0,000	0,0000
43. Tetraselmis chuii	1,000	0,202	0,407	0,031	0,002	1,755	0,000	0,000	0,000	0,0000
44. Tetraselmis suecica	1,000	0,230	0,541	0,068	0,004	1,850	0,060	0,017	0,032	0,0001
45. Thalassiosira pseudonana	1,000	0,151	0,681	0,093	0,003	1,955	0,116	0,033	0,062	0,0001

O objetivo do procedimento de *screening* pode ser modificado de acordo com as metas do processo (PICARDO *et al.* 2012). Por exemplo, o cálculo pode ser direcionado para identificar a melhor espécie produtora de algum *pool* celular ou os melhores fixadores de qualquer recurso entre as espécies no banco de dados. Uma vez selecionado um conjunto reduzido de espécies, fluxogramas de processo podem ser desenvolvidos e simulados para as estimativas preliminares de CAPEX (despesas de capital) e OPEX (despesas operacionais), como utilizado em MONTEIRO *et al.* (2009), apoiando estimativas adicionais de ROI (Retorno do Investimento) no caso de métricas econômicas.

Várias métricas são possíveis para a seleção de microalgas. As seguintes foram consideradas em PICARDO *et al.* (2012):

MÉTRICA 1: Concentração do *pool* de biomoléculas. Do banco de dados de espécies (Tabelas 3.2 e 3.3), é possível discriminar microalgas de acordo com *pools* bioquímicos: lipídios, proteínas e carboidratos.

MÉTRICA 2: Produtividade do *pool* de biomoléculas. Cálculo do crescimento das células como uma fração da concentração da biomassa inicial para um dia de produção (t =1d), ξ (g.L^{-1}.d^{-1}), utilizando equações (3.3) e (3.4):

$$dX(t)/dt = \mu X(t) \tag{3.3}$$

$$\xi = [X(t=1) - X(t=0)]/X(t=0) = (\exp(\mu) - 1) \tag{3.4}$$

onde *X(t=1)*é a concentração da biomassa (g.L^{-1} de biomassa seca) para um dia de crescimento e *X(t=0)* é a concentração inicial da biomassa. Para uma concentração inicial de 1 g.L^{-1}, a biofixação de carbono (*CB*, g.L^{-1}.d^{-1}) e a produtividade das principais biomoléculas - lipídios (*LP*, g.L^{-1}.d^{-1}), carboidratos (*CHO*, g.L^{-1}.d^{-1}) e proteínas (*PTN*, g.L^{-1}.d^{-1}) – são obtidos conforme abaixo:

$$CB = \xi \times MW_C / MW_{MA} \tag{3.5}$$

$$LP = \xi \times w_{i\,LIPIDS}\,; \quad CHO = \xi \times w_{i\,CHO}\,; \quad PTN = \xi \times w_{i\,PTN} \tag{3.6}$$

onde MW_C é a massa atômica do carbono, MW_{MA} é a massa molecular da espécie de microalga dada por sua fórmula mínima empírica, e $w_{iLIPIDS}$, w_{iCHO} e w_{iPTN} são as frações mássicas das biomoléculas na biomassa seca.

MÉTRICA 3: Aplicações de *Tecnologia Verde*. Os simuladores de processos químicos comerciais são ferramentas poderosas de engenharia com bibliotecas de espécies químicas, equipamentos e modelos termodinâmicos que podem executar cálculos de balanço de massa e energia associados às transformações físicas e químicas do processo. A análise do processo por simulação é frequentemente realizada por engenheiros químicos para avaliar o desempenho do fluxograma, a fim de melhorá-lo em termos de custo e/ou consumo de energia. Dado um fluxograma de processo baseado em microalgas, informações composicionais do Tipo I e Tipo II podem ser usadas como entradas para um simulador de processo, a fim de permitir a determinação de composições apropriadas, temperaturas, pressões e vazões para uma resposta ótima de ordem econômica e/ou energética. Portanto, o impacto da composição da biomassa no desempenho do processo pode ser calculado com base no balanço material e energético, baseado em cálculos termodinâmicos. Os simuladores de processos também possibilitam a análise de efeitos de potenciais modificações das condições operacionais e da inclusão de operações unitárias no processo de interesse. Na Metodologia proposta, tal capacidade é explorada para o cálculo de métricas de desempenho do processo, definidas de acordo com objetivos de produção, empregando-se UNISIM Design (Honeywell) como plataforma de simulação.

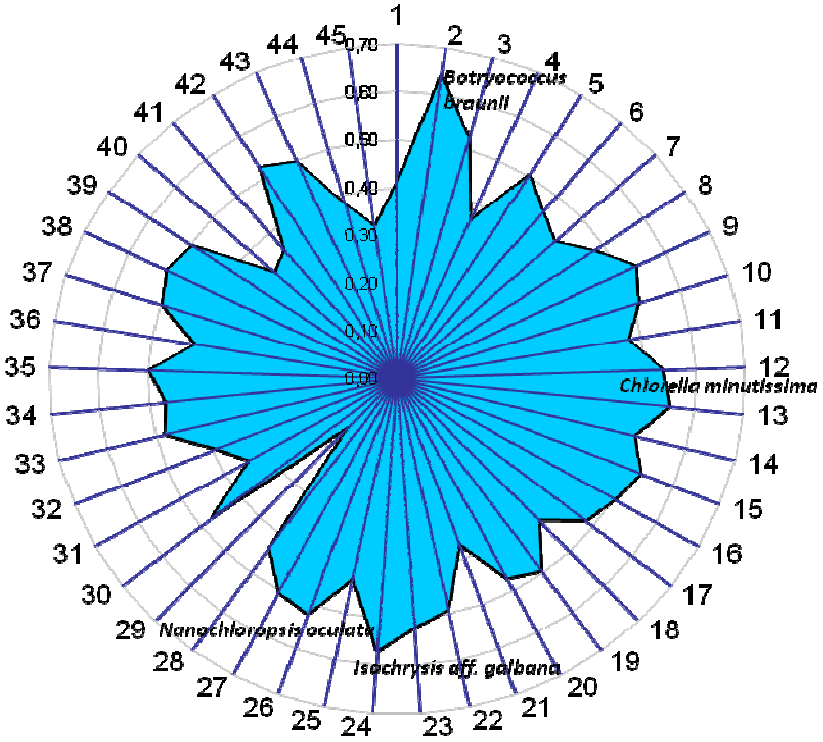
A maioria dos procedimentos de triagem relatados na literatura pesquisada aplicam a Métrica 1 (referências na Tabela 3.2). A Métrica 2 é menos frequente (HU *et al* 2008;. GRIFFITHS & HARRISON, 2009), ao passo que a Métrica 3 foi raramente (ou nunca foi) abordada anteriormente, constituindo-se em uma inovação da Metodologia de *Screening* aqui proposta (PICARDO *et al.* 2012).

3.2 RESULTADOS DA APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DE *SCREENING*

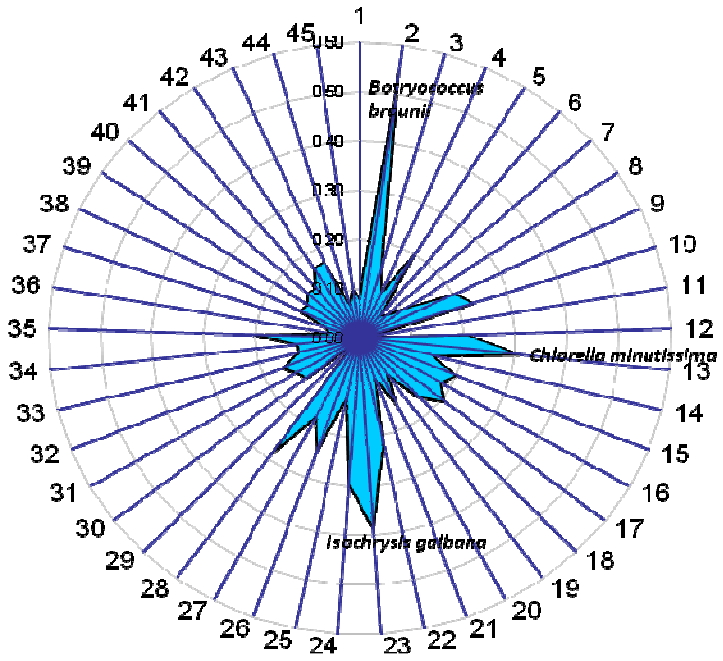
O resultado de *Screening* de microalgas via Métricas 1 e 2 é apresentado em gráficos radares de modo a demonstrar a Metodologia desenvolvida.

MÉTRICA 1

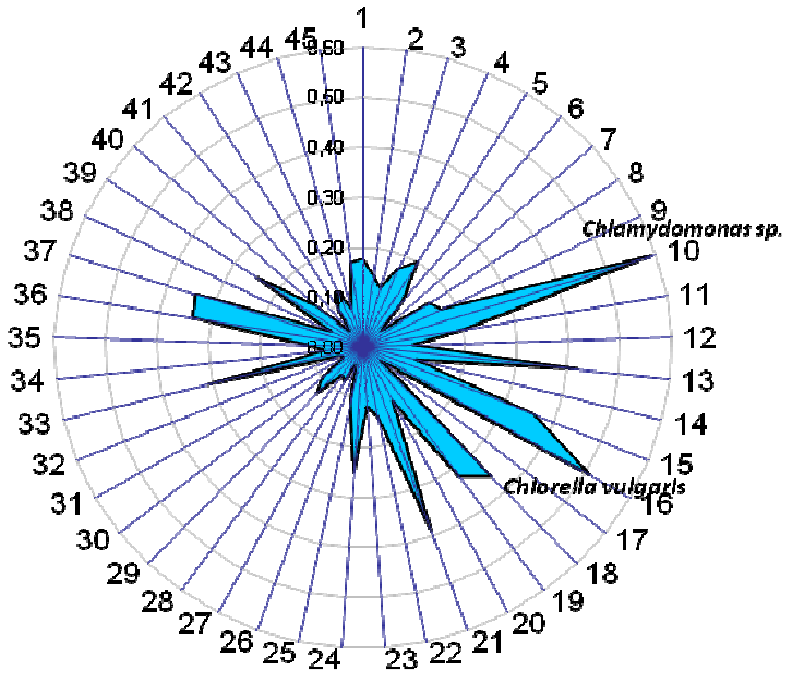
A Figura 3.2 expressa a distribuição por *pools* de biomoléculas.



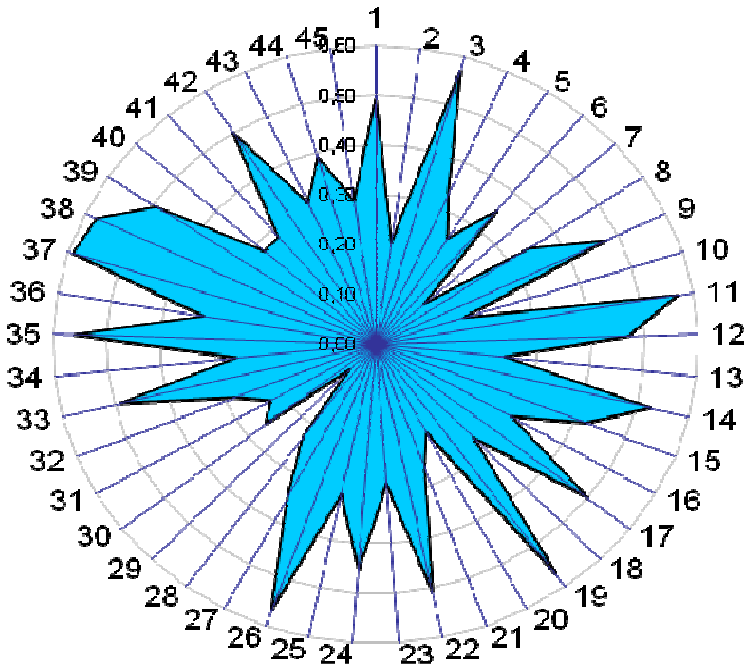
(a)


Botryococcus brownii
Chlorella minutissima
Isochrysis galbana

(b)


Chlamydomonas sp.
Chlorella vulgaris

(c)



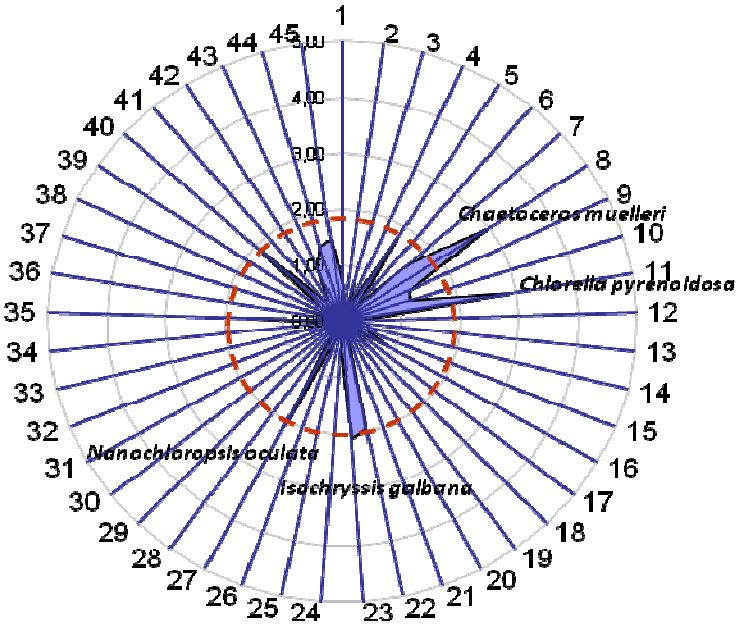
(d)

Figura 3.2: Distinção das 45 espécies de microalgas (Tabela 3.2) por *pools* de biomoléculas. (a) teor de carbono (wi_{CARBON}), (b) teor de lipídios (wi_{LIPIDS}), (c) teor de carboidratos (w_{iCHO}), (d) teor de proteínas (w_{iPTN}).

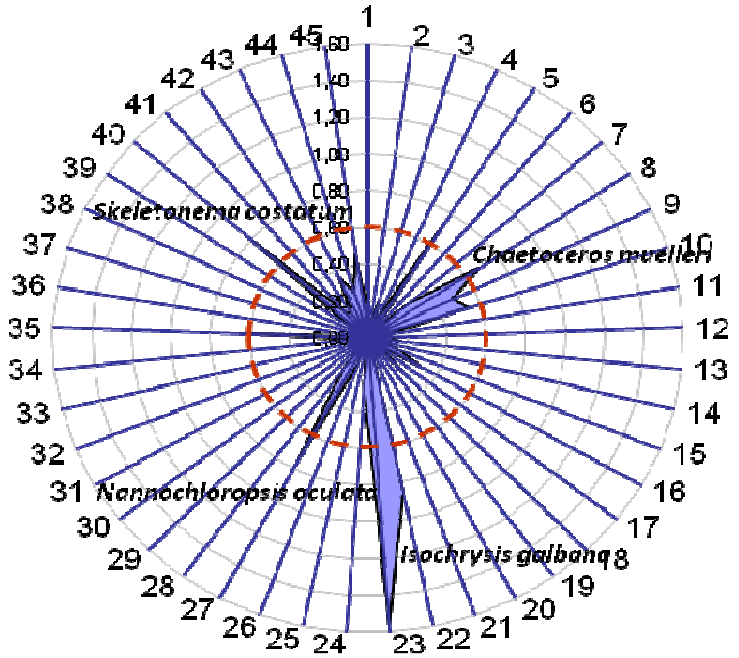
O teor de carbono (Figura 3.2a) não permite uma boa discriminação entre as espécies de microalgas do banco de dados, ou seja, todas as espécies apresentam valores semelhantes. Por outro lado, a distribuição do conteúdo lipídico (Figura 3.2b) revelou *I. galbana* e *B. braunii* com o mais alto desempenho. *Chlamydomonas sp.* e *Chlorella vulgares* se destacam no conteúdo de carboidratos.

MÉTRICA 2

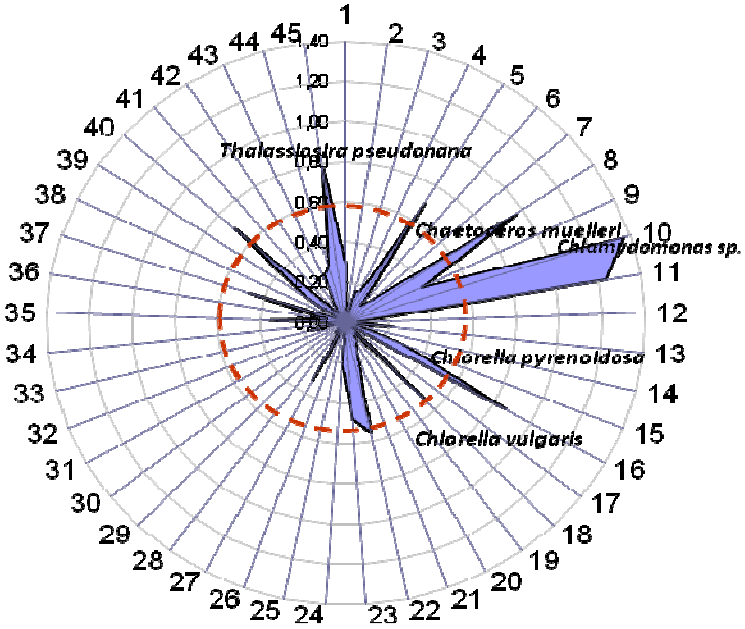
A Figura 3.3 apresenta a produtividade dos *pools* de biomoléculas.


Chaetoceros muelleri
Chlorella pyrenoidosa
Nannochloropsis oculata
Isochrysis galbana

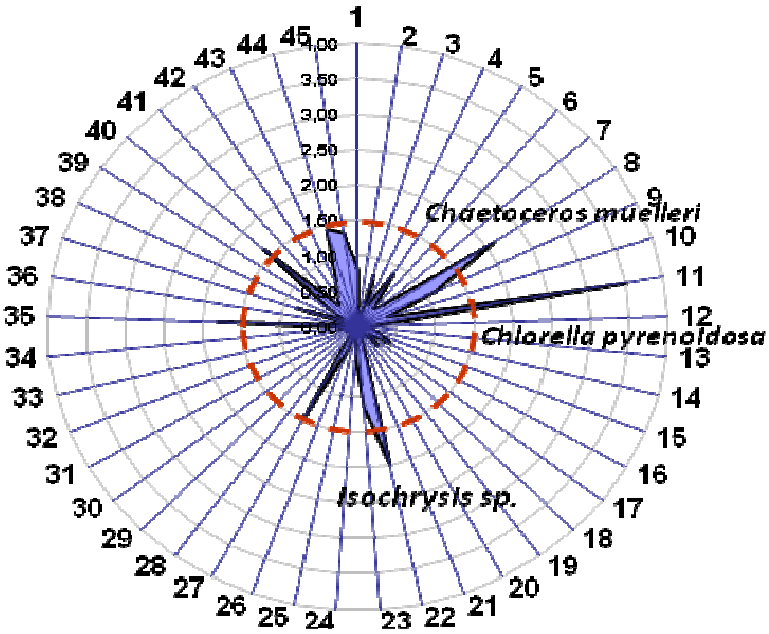
(a)


Skeletonema costatum
Chaetoceros muelleri
Nannochloropsis oculata
Isochrysis galbana

(b)



(c)



(d)

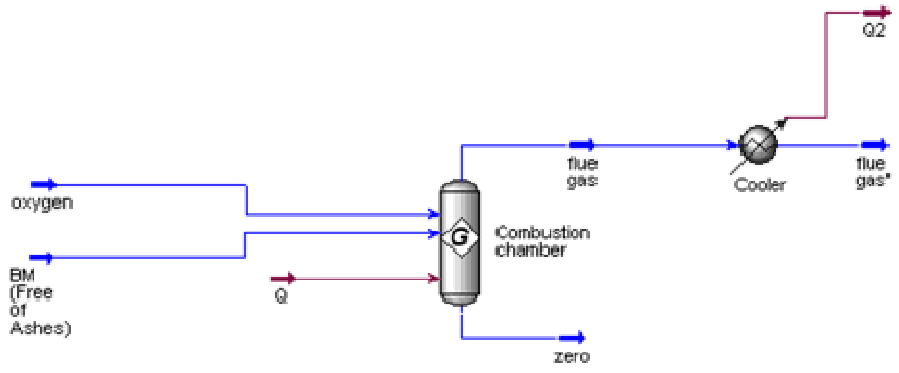
Figura 3.3: Distinção das 45 espécies de microalgas (Tabela 3.2) por (a) taxa de fixação de carbono (ξ x wi_{CARBON}), (b) produtividade em lipídios (ξ x wi_{LIPIDS}), (c) produtividade em carboidratos (ξ x wi_{CHO}), (d) produtividade de proteínas (ξ x wi_{PTN}).

Como mostrado na Figura 3.3, quando o *Screening* se baseia na taxa de fixação de carbono (Fig. 3.3a) - Equação (3.5) – as espécies *Chaetoceros muelleri*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Isochrysis galbana, Nannoclhoropsis oculata* e *Skeletonema costatum* emergem como as mais produtivas. O gráfico de produtividade lipídica (Figura 3.3b) mostra que os maiores valores ocorrem para *N. oculata* e *I. galbana*. Gráficos semelhantes foram construídos para microalgas em termos de produtividade de carboidratos e proteínas (Figura 3.3c e 3.3d). Em primeiro lugar, nenhuma distinção foi observada na distribuição do conteúdo de proteína, apesar da produtividade de proteína (MÉTRICA 1) ter sido maior para as espécies com maior taxa de crescimento. *Chlamydomonas sp.* e *Chlorella vulgaris* apresentaram teores de carboidratos especialmente altos e, juntamente com *C. pyrenoidosa*, mostraram maiores produtividades de carboidratos.

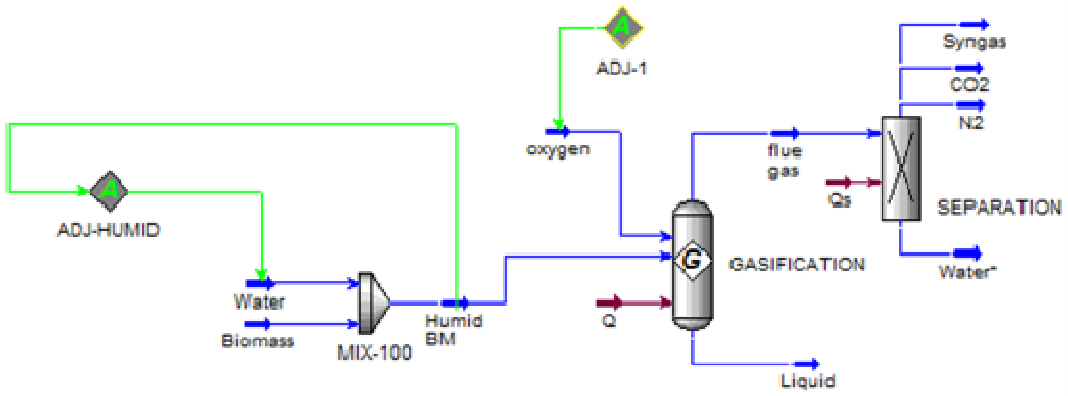
MÉTRICA 3

Os resultados proporcionados pela aplicação da Métrica 3, utilizando Tipo I e Tipo II de informação composicional, são ilustrados com os cálculos de Engenharia de Processos, tal como descrito em PICARDO *et al.* (2012). Biomoléculas modelo são adicionadas ao simulador como "componentes hipotéticos" (UniSim ® Design Simulação Guia de Referência Base, R380 Release, Honeywell, Março de 2008). O modelo termodinâmico UNIQUAC é usado para o cálculo das propriedades de mistura em fase líquida. A informação de composição das espécies selecionadas (Tabela 3.2) é em seguida alimentada no ambiente de simulação como correntes de processo, "lipídios", "proteínas" e "carboidratos" (cada um destes fluxos expressa uma corrente de componente puro com a biomolécula modelo correspondente). Os fluxos são alimentados a diferentes taxas a um "misturador" produzindo uma corrente de processo com a composição da biomassa desejada. Para ilustrar a flexibilidade da Métrica 3 com objetivos de produção diferentes, três subcasos de processamento são apresentados. Dependendo do caso particular, a corrente de biomassa proveniente do misturador é dirigida em primeiro lugar a uma câmara de combustão (Processo 1) ou a uma unidade de gaseificação (Processos 2 e 3). A Figura 3.4 apresenta fluxogramas de processo (simulado em UNISIM Design) para os três estudos de caso.

(a)



(b)



(c)

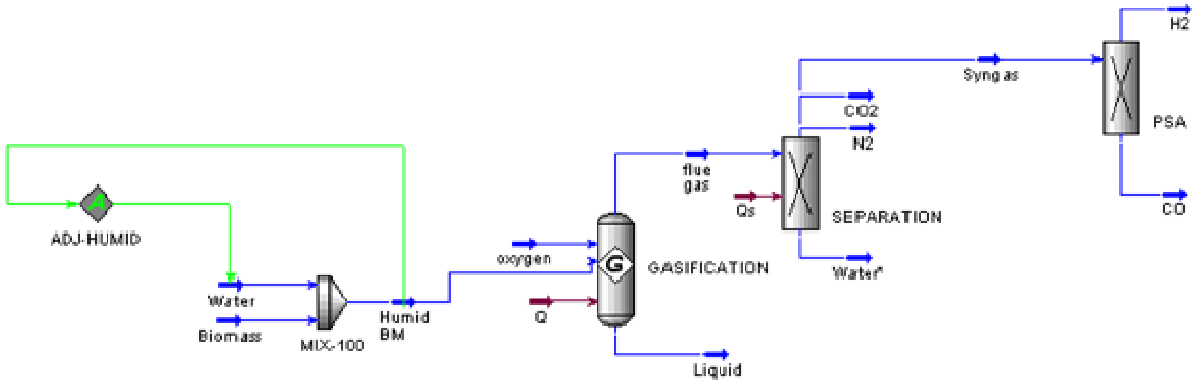


Figura 3.4: Simulação de Processos *Downstream* da Biomassa. (a) Poder Calorífico; (b) Produção de Syngas, (c) Produção de Bio-H_2.

Caso 1: Poder calorífico de biomassa de microalga

A informação composicional da biomassa reunida para montar o banco de dados de microalgas é utilizada para implementar o *Screening* em termos do poder calorífico superior da biomassa seca. Usando-se as fórmulas moleculares de compostos modelo selecionados (proteína, lipídio, carboidrato) e a composição bioquímica de microalgas (Tabelas 3.2 e 3.3), o poder calorífico superior (HHV) é calculado para todas as 45 espécies do banco de dados, o que fornece dados para possíveis aplicações em processos relacionados com produção de energia. A Figura 3.4a mostra o fluxograma do processo para simular a resposta da combustão da biomassa microalgal. Para validar este procedimento, o HHV também é estimado utilizando-se correlações adequadas da literatura (CHANNIWALA & PARIKH 2002) (Tabela 3.4), baseadas em composições elementares. A Tabela 3.5 consolida os valores de HHV calculados através do UNISIM Design e através das correlações, ambos são comparados com valores experimentais obtidos da literatura (FEINBERG, 1984; ILLMAN *et al.* 2000). A correlação que apresentou o menor desvio em relação aos valores experimentais (indicado pelo somatório do erro quadrático na Tabela 3.5, $\Sigma\ SE$) foi a Correlação de Tillman. Esta correlação foi então utilizada para estimar o HHV de todas as 45 espécies do banco de dados.

A distinção das 45 espécies de microalgas pode ser vista em termos de HHV no gráfico radar da Figura 3.5. O HHV obtido usando a Correlação de Tillman ficou na faixa de 12-26 MJ/kg, onde *B. braunii* e *I .aff galbana* apresentaram os maiores valores de poder calorífico superior, 26,29 e 23,36 MJ/kg, respectivamente. Portanto, para aplicações energéticas (por exemplo, biocombustíveis), a metodologia de *Screening* foi capaz de identificar duas espécies dentre as 45 do banco de dados como as microalgas mais promissoras.

Tabela 3.4: Correlações para estimar o HHV da biomassa de microalga (adaptado de CHANNIWALA & PARIKH, 2002)

Nº	Correlação	Pesquisador	Bases e suposições
1	$HHV^* = 0.3414C^* + 1.4445H^* - (N^* + O^* - 1)/8 + 0.093S^*$ MJ/kg	Dulong-Berthelot	Esta é uma versão modificada da correlação de Dulong $HHV^* = 0.3383C^* + 1.443(H^* - O^*/8) + 0.0942S^*$ MJ/kg, no qual o efeito do nitrogênio é introduzido na combustão. Esta correlação pretende ser superior à correlação de Dulong.
2	HHV = 0.4373C - 0.3059 MJ/kg (a) HHV = 0.4373C - 1.6701 MJ/kg (b)	Tillman (1978)	Tillman observou que o HHV de biomassas é função de seu teor de carbono e baseado nisto ele derivou as correlações (a) para madeira e cascas de madeira e mais tarde modificou-a para (b) englobar todo o espectro de biomassas. As suposições para esta correlação para biomassa estão dentro de um erro de 5%.
3	HHV = 0.4791C + 0.6676H + 0.0589O - 1.2077S - 8.42 MJ/kg (a) HHV = 0.301C + 0.525H + 0.064O - 0.763 MJ/kg (b)	Jenkins (1980), (1985)	Esta correlação é derivada com base em 19 pontos com dados de biomassa e utilizando a análise de regressão linear múltipla. As suposições da presente correlação encontram-se dentro de um erro de 7%. Mais tarde, o autor derivou uma correlação mais geral usando 57 pontos com dados de biomassa.
4	HHV = 0.328C + 1.4306H - 0.0237N + 0.0929S - (1-A/100)(40.11H/C) + 0.3466 MJ/kg (a)	Grabosky and Bain (1981)	Esta correlação é derivada para materiais de biomassa com base nas reações pertinentes de C, H, S e N em CO_2, H_2O, SO_2 e NO_2. As suposições desta correlação estão dentro do erro de 1,5%.
5	HHV = 0.352C + 0.944H + 0.105(S-O) MJ/kg	Beckman et al. (1990)	Esta correlação é derivada para os óleos de biomassa. As suposições desta correlação estão dentro do erro de 5%.

Notas: C, H, O, N, S e A representam respectivamente o teor de carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, enxofre e cinzas da biomassa, expresso em % em massa seca. HHV é expresso em MJ/kg de biomassa em base seca. * Indica composição em base livre de cinzas.

Tabela 3.5: Poder Calorífico Superior (HHV) para as espécies selecionadas

Espécies	HHV (MJ/kg)								
	Via Simulação (*)	Correlações da Tabela 3.5							HHV_{EXP} (**)
		1(*)	2a	2b	3a	3b	4	5	
Botryococcus braunii	23,37	33,00	27,65	26,29	29,67	24,89	29,75	29,69	27,60
Chlamydomonas sp.	16,24	24,84	22,09	20,73	23,75	21,47	22,64	22,13	22,24
Chlorella minutissima	17,87	27,50	23,84	22,48	25,54	22,53	24,87	24,65	21,00
Chlorella protothecoides	15,26	23,82	21,25	19,88	21,29	19,81	22,49	22,18	19,00
Chlorella sorokiniana	15,61	26,25	22,88	21,51	24,13	21,75	23,65	23,79	21,00
Chlorella sp.	16,80	25,96	23,07	21,71	23,58	21,23	24,66	24,16	20,08
Chlorella vulgaris	15,26	24,55	21,84	20,47	23,20	21,17	22,38	22,08	18,00
Cyclotella cryptica	15,86	19,38	17,68	16,31	17,50	17,34	18,27	17,46	20,70
Dunaliella salina	13,41	24,12	21,40	20,04	22,23	20,70	21,86	22,09	16,20
Isochrysis sp.	16,50	24,48	21,32	19,96	21,70	20,13	22,35	22,35	18,90
Spirulina platensis	15,91	25,06	22,50	21,13	22,81	20,76	24,06	23,46	19,80
Isochrysis galbana	21,17	26,37	22,51	21,14	23,00	20,65	24,10	23,81	—
Σ SE (***)	184,66	318,90	84,71	**50,62**	139,05	55,55	138,87	132,27	—

Notas:
Os números de 1 a 5 correspondem às correlações descritas na Tabela 3.5;
HHV_{EXP} = valores experimentais de poder calorífico superior;
(*) Composição em % em base seca livre de cinzas. Estimados por simulação com UNISIM DESIGN
(**) Feinberg (1984); Illman et al. (2000)
(***) $SE = (HHV_{EXP} - HHV_{CALC})^2$; *SE* (a soma do erro quadrático) não inclui a microalga *I. galbana*.

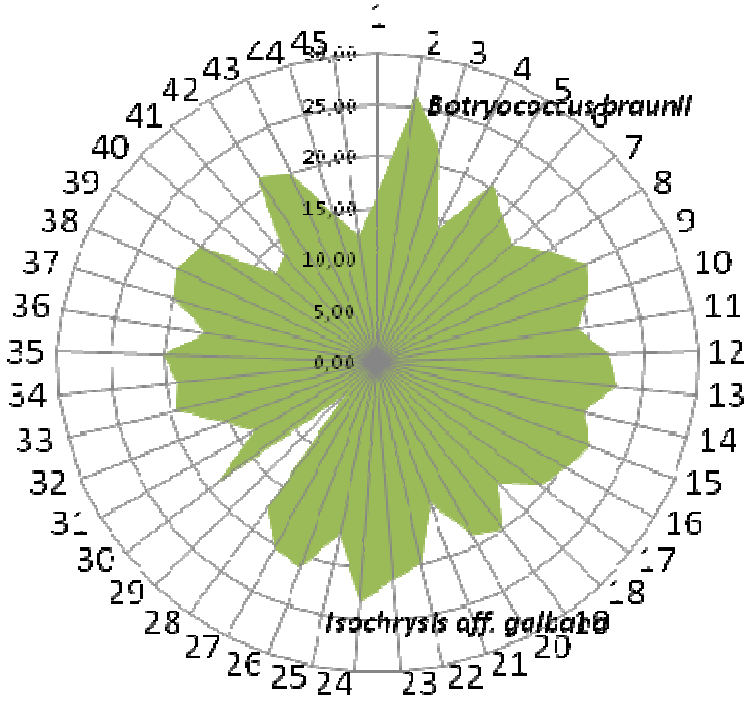


Figura 3.5: Distribuição do HHV (MJ/kg) para as 45 espécies de microalgas (Tabela 2), calculado via correlação (b) de Tillman (HHV = 0,4373C - 1,6701 MJ/kg).

Caso 2: Produção de Gás de Síntese (Syngas) Utilizando Biomassa de Microalgas

Para aplicações energéticas e produção de gás de síntese, o conteúdo lipídico desempenha um papel importante. Para comparação dentro de um grupo limitado de microalgas, a escolha de espécies é dirigida para aquelas que mostraram o maior teor de lipídios e produtividade lipídica na análise anterior (Figuras 3.2 e 3.3), enquanto outras foram incluídas devido ao seu conteúdo em carboidratos. *Dunaliella salina* foi incluída na análise para fins de comparação. O fluxograma do processo mostrado na Figura 3.4b é concebido para a conversão de biomassa de algas em gás de síntese, um gás contendo principalmente H_2 e CO. *Syngas* é uma *commodity* de grande relevância na produção de uma vasta gama de combustíveis ambientalmente limpos e produtos químicos (WENDER, 1996). A conversão de biomassa em *Syngas* é uma rota chave para o processamento de biomassa em bio-refinarias. No entanto, a aplicação de simulação de processos para todas as espécies em um banco de dados pode ser dispendiosa e complexa. Assim, a proposta de Metodologia para selecionar as espécies mais

promissoras nas Figuras 3.2 e 3.3 poderá reduzir significativamente o tempo necessário para o desenvolvimento de novas tecnologias em uma bio-refinaria.

Seguindo o mesmo procedimento empregado na distinção das microalgas por HHV, compostos modelo foram utilizados para possibilitar a entrada no fluxograma de processo da composição bioquímica de cada espécie. Cada corrente de biomassa foi alimentada ao simulador de processo para calcular o rendimento em *Syngas* em toneladas por tonelada de biomassa seca e o coeficiente análogo para CO_2 produzido na gaseificação. O valor de 1,5 foi fixado para a razão H_2:CO no *Syngas*. A temperatura de gaseificação foi definida como 1000ºC, enquanto a umidade da biomassa foi mantida em 0,35 (fração de massa).

I. galbana e *B. braunii* apresentaram os rendimentos mais elevados em *Syngas* simultaneamente com a menor produção de CO_2. *B. braunii* exibiu o mais elevado rendimento em *Syngas* de 1,31 tonelada por tonelada de biomassa seca. *Chlorella minutissima* e *Chlamydomonas sp.* apresentaram rendimentos elevados em *Syngas* mas também tiveram valores elevados de produção de CO_2 na gaseificação. A relação "CO_2 emitido/*Syngas* produzido" foi 0,0043 e 0,0004 para *I. galbana* e *B. braunii*, respectivamente, enquanto as mesmas razões para *C. minutissima* e *Chlamydomonas sp.* foram 0,0907 e 0,1500, respectivamente. A informação de composição obtida com o método apresentado aqui permitiu a seleção de microalgas com o desempenho mais promissor na produção de *Syngas*. É interessante notar que, embora não demonstrado aqui, a análise pode ser facilmente estendida para a totalidade do banco de dados de 45 espécies de microalgas. Os resultados estão representados na Figura 3.6.

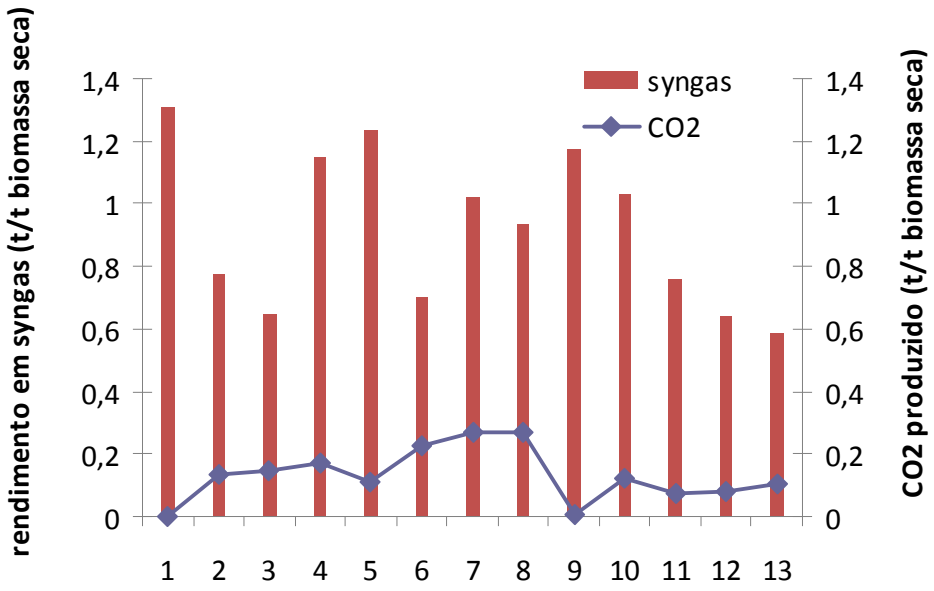


Figura 3.6: Rendimento de syngas e CO_2 produzido para as espécies mais promissoras no processo seletivo de acordo com o conteúdo e produtividade do *pool* de biomoléculas. ***(1) Botryococcus braunii, (2) Chaetocerus calcitrans f. Pumilus, (3) Chaetocerus muelleri, (4) Chlamydomonas sp., (5) Chlorella minutissima, (6) Chlorella pyrenoidosa, (7) Chlorella vulgaris, (8) Dunaliella salina, (9) Isochrysis galbana, (10)Isochrysis sp., (11) Nannochloropsis oculata, (12) Skeletonema costatum, (13) Thalassiosira pseudonana.***

Caso 3: Biomassa de Microalgas como Matéria-Prima para Produção de Bio-H_2

Gaseificação pode ser usada para produzir H_2 a partir da biomassa. Após a unidade de gaseificação para a produção de *Syngas*, uma alternativa simples consiste em conectar um separador do tipo PSA (*Pressure Swing Adsorption*) para separar H_2 do CO, como mostrado no fluxograma de processo na Figura 3.4c. O rendimento em Bio-H_2 em tonelada por tonelada de biomassa seca foi calculado para as mesmas espécies de microalgas selecionadas no Caso 2 (produção de *Syngas*). No Caso 3, a razão H_2:CO no *Syngas* foi mantida na faixa 1,4-1,5. Os resultados da simulação expressos em rendimento de H_2 e a produção de CO_2 na gaseificação são apresentados na Figura 3.7 para cada espécie de microalga selecionada. Como no caso da produção de *Syngas*, *I. galbana* e *B. braunii* provaram ser as melhores espécies para esta aplicação, uma vez que atingiram altos rendimentos de Bio-H_2 concomitantemente com baixas emissões de CO_2. O rendimento de Bio-H_2 foi de 0,122 e 0,118 tonelada por tonelada de biomassa seca para *B. braunii* e *I. galbana*, respectivamente.

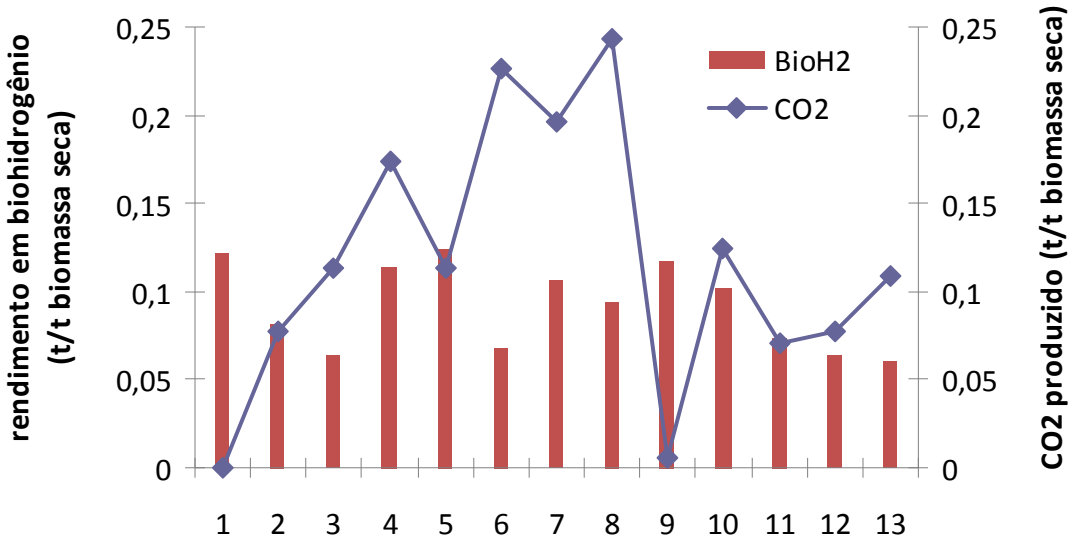
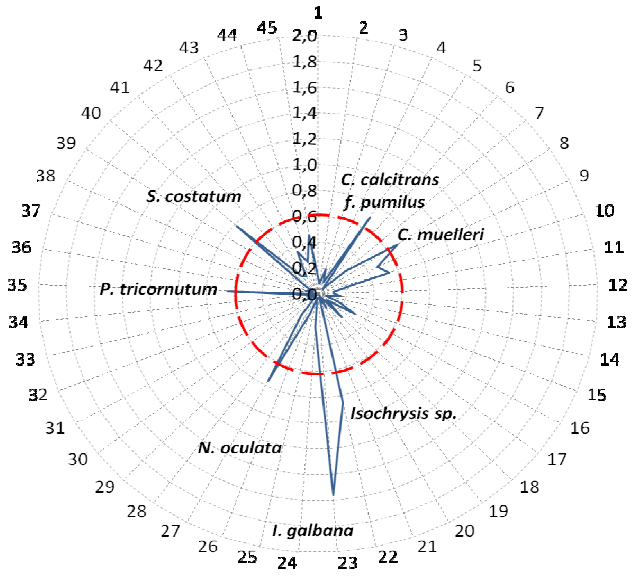
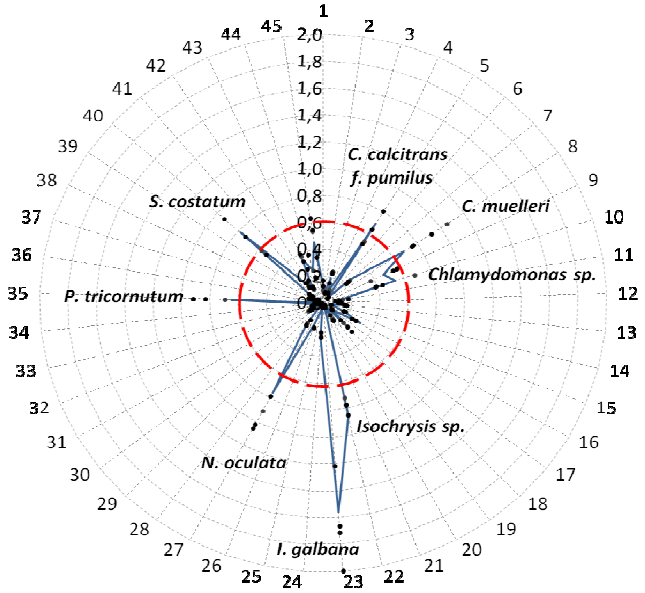


Figura 3.7: Rendimento de Bio-H_2 e CO_2 produzido para as espécies mais promissoras no processo seletivo de acordo com o conteúdo e produtividade do *pool* de biomoléculas. ***(1) Botryococcus braunii, (2) Chaetocerus calcitrans f. Pumilus, (3) Chaetocerus muelleri, (4) Chlamydomonas sp., (5) Chlorella minutissima, (6) Chlorella pyrenoidosa, (7) Chlorella vulgaris, (8) Dunaliella salina (9) Isochrysis galbana, (10) Isochrysis sp., (11) Nannochloropsis oculata, (12) Skeletonema costatum, (13) Thalassiosira pseudonana.***

A Metodologia de *Screening* apresenta como principal vantagem certa capacidade de discriminar entre as espécies reunidas em um banco de dados de acordo com metas específicas de produção. A principal desvantagem desta metodologia está, naturalmente, associada à sua dependência da qualidade dos dados experimentais utilizados para apoiar aumento de escala para grandes processos comerciais. Mas, mesmo assim, a metodologia se mostra resiliente, dependendo do grau de incerteza nos dados. Para demonstrar isto, uma análise de sensibilidade a incertezas experimentais é apresentada na Figura 3.8 através de dois gráficos radares de produtividade lipídica (g L^{-1} d^{-1}) para as 45 espécies de algas no banco de dados, calculadas a partir da taxa de crescimento (d^{-1}) de acordo com a Métrica 2. Na Figura 3.8b, valores experimentais da taxa de crescimento foram submetidos a incertezas aleatórias por adição de 4 resultados de ruído uniformemente e aleatoriamente distribuídos dentro de 10% e -10% dos valores na Tabela 3.2. Os valores corrompidos foram plotados na Figura 3.8b como pontos sobrepostos ao diagrama original para a produtividade lipídica ($gL^{-1}d^{-1}$), enquanto que o gráfico sem ruído é mostrado na Figura 3.8a, para comparação.



(a)



(b)

Figura 3.8: Sensibilidade do Procedimento de *Screening* a Incertezas nas taxas específicas de crescimento (d^{-1}): (a) Produtividade lipídica ($g\ L^{-1}\ d^{-1}$) **calculada a partir da Tabela 3.2; (b) produtividades lipídicas em quatro ruídos aleatórios e uniformemente distribuídos dentro de +10% e -10% dos valores experimentais das taxas de crescimento. Sobreposição dos pontos com o calculado pela Métrica 2.**

A Figura 3.8 demonstra que o procedimento é capaz de discriminar espécies potenciais para a produção de lipídios, mesmo na presença de significativos erros experimentais, porque a incidência artificial de ruído apenas afetou o *Screening* através

da inclusão de uma espécie nova (*Clamydomonas sp.*) no conjunto de candidatos para análise posterior.

3.3 DISCUSSÃO DE RESULTADOS E CONCLUSÕES SOBRE A METODOLOGIA DE *SCREENING*

A Metodologia de *Screening* apresentada neste trabalho, exclusivamente com base em dados publicados, permite a seleção de um subconjunto de espécies que cumpre determinado objetivo bioquímico (por exemplo, a produtividade de um dado metabólito secundário) ou propriedades físicas e químicas da biomassa final, visando o seu processamento a jusante (como a conversão termoquímica da biomassa em *Syngas*, hidrogênio e biocombustíveis de terceira geração).

O procedimento pode ser aplicado para identificar, dado um objetivo específico de produção, o melhor candidato entre as espécies em condições de crescimento semelhantes, bem como as melhores condições de crescimento para uma dada espécie. Uma aplicação do procedimento seria, por exemplo, inicialmente avaliar diferentes espécies em condições de crescimento semelhantes, seguido de investigação experimental das espécies que apresentaram desempenho superior no crescimento em várias condições de cultivo. Uma abordagem semelhante pode também ser aplicada para criar bancos de dados mistos.

Para provar o conceito, a Metodologia foi aplicada a um banco de dados compilados a partir de dados de microalgas da literatura. Esta base de dados foi composta de taxa de crescimento e dados de composição bioquímica para 45 espécies de microalgas cultivadas em condições de laboratório típicas.

De acordo com GRIFFITHS & HARRISON (2009), a taxa de crescimento apresenta um impacto maior do que a composição da biomassa tanto na produtividade lipídica como na biofixação de CO_2. Espécies com menor tempo de duplicação têm uma maior produtividade em biomassa, que, na maioria dos casos, aumenta a produtividade dos produtos metabólicos. Neste sentido, para permitir comparações de desempenho, o banco de dados foi construído com culturas desenvolvidas em meio completo. O impacto da composição do meio sobre a qualidade da biomassa é de importância

primordial, e é outra importante aplicação potencial da Metodologia descrita. Assim, embora *Botryococcus braunii* seja bem conhecido pela sua capacidade para acumular os lipídios totais na faixa de 26 a 86% do peso seco celular (DAYANANDA *et al.* 2007), a taxa específica de crescimento muito baixa encontrada para esta espécie, 0,12 d^{-1} (BANERJEE *et al.* 2002), resulta em uma baixa produtividade de lipídios. De fato, o procedimento de *Screening* apresentado mostrou que o teor de lipídios desempenha um papel secundário, em comparação com a taxa de crescimento, na produtividade de lipídios totais (dado pelo produto entre teor de lipídios e produtividade em biomassa). Por exemplo, *N. oculata*, que apresenta apenas 18% de gordura, mostrou superior produtividade em lipídio comparativamente a *B. braunii*, apesar do teor de lipídios desta espécie representar 54,2% da massa seca celular. Esse fato foi corroborado por GRIFFITHS & HARRISON (2009), que realizaram *Screening* de espécies para produção de biodiesel com base na produtividade em lipídios. Neste estudo, todas as espécies com produtividade de biomassa elevada (acima de 0,4 $g.L^{-1}.d^{-1}$) mostraram maior produtividade lipídica (maior do que 0,060 $g.L^{-1}.d^{-1}$). Os autores observaram que tanto a produtividade de biomassa quanto o teor de lipídios influenciaram a produtividade de lipídios, mas a taxa de crescimento teve maior relevância.

O presente trabalho também mostrou que a Metodologia de *Screening* proposta deve operar associada à Métricas de desempenho da microalga. As Métricas 1 e 2, abrangem concentrações das biomoléculas e produtividade (ou *pool* molecular como lipídios), enquanto a Métrica 3 foi orientada para atender critérios de Engenharia do Processo a jusante, sendo avaliada através da utilização de simuladores de processos químicos comerciais. A Métrica 3 analisa o grau de cumprimento de metas de desempenho industrial para a seleção de espécies de microalgas apropriadas. Por exemplo, a biofixação de CO_2 visando a mitigação de emissões. A Métrica 3 foi explorada em diferentes cenários: (i) Poder Calorífico Superior para uso direto da biomassa como fonte de energia (por exemplo, biocombustíveis, co-geração de eletricidade - ver Caso 1); (ii) Produção de *Syngas* com baixas emissões de CO_2 (ver Caso 2); e (iii) Produção de Bio-H_2 com baixas emissões de CO_2 (ver Caso 3).

A Metodologia proposta leva às seguintes conclusões:

- As Métricas 1 e 2 apontaram que *I. galbana* superou *Botryococcus braunii*, conhecida por seu conteúdo lipídico elevado. Além disso, a caracterização da composição da microalga e a produtividade de biomassa provaram ser características essenciais na decisão.
- A Métrica 3, Caso 1, indicou *B. braunii* e *I. galbana* como as espécies com os maiores HHV e possivelmente recomendáveis para aplicações de produção de energia.
- A Métrica 3, Caso 2, apontou novamente *I. galbana* e *B.braunii*, que apresentaram os maiores rendimentos de *Syngas* simultaneamente com a menor produção de CO_2.
- A Métrica 3, Caso 3, mostrou *I. galbana* e *B. braunii* com os maiores rendimentos de Bio-H_2, concomitantemente com menores emissões de CO_2.

Obviamente, a investigação definitiva da adequação de *I. galbana* e *B. braunii* aos diferentes objetivos de produção exige dados adicionais como informações complementares sobre desempenho das espécies e adaptabilidade a diferentes condições de cultivo.

A Metodologia de *Screening* também mostrou a sua utilidade como um recurso para:

(i) Definir as Métricas quantitativas para comparação e distinção de espécies de microalgas vistas como matérias-primas para novas tecnologias de química verde;

(ii) Extrair informação quantitativa de processo industrial a partir de dados laboratoriais expressos em termos de composição da biomassa e desempenho de crescimento;

(iii) Estimar o Poder Calorífico (HHV) da biomassa de algas como combustível.

Foram encontrados HHV na faixa de 18-21 MJ/kg e a abundância relativa das biomoléculas afetou diretamente o desempenho calorífico da biomassa, especialmente o conteúdo de lipídios (células com alto teor de lipídios apresentam valores mais elevados de taxas de geração de calor quando queimadas). Valores calculados por simulação foram comparados com os valores calculados pelas Correlações de HHV e com os dados experimentais descritos na literatura, confirmando a precisão do método.

Os casos relatados (Métrica 3) empregaram dados de composição dos Tipos I e II. O cálculo do HHV empregou ambos os tipos. O Tipo I foi utilizado na simulação do processo (UNISIM Design), enquanto que o Tipo II foi empregue nas Correlações oriundas da literatura. Na Correlação de Tillman (CHANNIWALA & PARIKH, 2002), o HHV de biomassa é uma forte função de seu teor de carbono. Esta correlação, quando combinada com o procedimento proposto neste trabalho, revelou *Botryococcus braunii* e *I. aff galbana* como as espécies com os valores mais elevados de HHV. Simulação com dados de composição Tipo I (composição bioquímica) indicou *B. braunii* e *I. galbana* como as espécies mais promissoras em termos de HHV.

Embora o Caso 3 seja muito semelhante ao Caso 2, difere deste apenas por incluir operação unitária para separação do H_2, em que demonstra a relevância do teor de hidrogênio produzido a partir da biomassa. Reconhece-se (AASBERG-PETERSEN *et al.* 2001), que não só a razão H_2/CO deve satisfazer um limite especificado (por exemplo, 2), mas também a razão *M*, definida como $\frac{H_2 - CO_2}{CO + CO_2}$, deve ser próxima ao mesmo valor (2), portanto, restringindo a produção de CO_2 na gaseificação e/ou a sua saída pós-processo a jusante. Como o *pool* lipídico é o mais rico em ligações C-H por kg, e são estas ligações que mais contribuem para gerar *Syngas*, microalgas com alto teor lipídico superarão as demais espécies em rendimento de *Syngas* por kg de biomassa seca.

Por fim, a composição química da biomassa demonstrou um forte efeito sobre o rendimento de biocombustíveis sintéticos (*Syngas* e Bio-H_2). A distribuição dos produtos da gaseificação da biomassa depende da umidade e poder calorífico da biomassa, além de temperatura, pressão, tempo de residência e razão oxigênio/carga. Quando o objetivo da produção é direcionar o *Syngas* (H_2 + CO) a GTL (*gas to liquid*) via reações químicas Fischer Tropsch, a razão H2:CO deve ser inferior a 2,0 (WENDER 1996). Fixando-se H_2:CO em 1,5, microalgas apresentam, em geral, bons rendimentos em *Syngas* e baixa emissão de CO_2. *I. galbana* e *B. braunii*, com os maiores HHV, também lideraram em rendimento de *Syngas* e menor produção de CO_2. Como já citado, o acúmulo de lipídios na microalga favorece a gaseificação e, portanto, a produção de *Syngas* com reduzida produção de CO_2. Finalmente, a produção de Bio-H_2 - um biocombustível de terceira geração derivado de *Syngas* - mostrou-se viável apenas para

espécies com alto teor de lipídios. *I. galbana* e *B. braunii* tiveram as melhores razões kg de CO_2 emitido por kg de biomassa seca.

Dentre as microalgas que se destacaram no *screening* está *Isochrysis galbana*, selecionada no presente trabalho, para ser cultivada em escala piloto. Na escolha da *I. galbana*, as características mais relevantes foram: o potencial de produção de biomassa (altas taxas específicas de crescimento), ser uma espécie marinha e apresentar teor de lipídios mediano comparativamente a outras espécies de microalgas. *Botryococcus braunii* apresenta alto teor de carbono e elevadas concentrações de lipídios, porém é uma espécie com baixa taxa de crescimento.

Isochrysis galbana é uma alga marrom-dourada da classe das *Prymnesiophyceae,* possui dois flagelos de igual tamanho (aproximadamente 7µm), sua forma é elíptica com 5-6 µm de comprimento (largura de 2-4µm e 2,5-3µm de espessura) e tem sido cultivada *indoor e outdoor* (ZHU *et al.* 1997; BOUGARAN *et al.* 2003; BOUGARAN *et al.* 2010). Rica em ácidos graxos poliinsaturados como EPA (ácido eicosapentaenóico) e DHA (ácido docosa-hexaenóico), é altamente utilizada na maricultura na alimentação de moluscos (KAPLAN *et al.* 1986). As condições ótimas do cultivo de *Isochrysis galbana* foram estudadas por KAPLAN *et al.* (1986) e estão listadas na Tabela 3.6. Os autores também verificaram que o aumento da luminosidade foi positivo para o crescimento da microalga, chegando a dobrar a massa celular; a aeração com ar enriquecido com CO_2 também aumentou a concentração de células, desde que Fe^{+3} estivesse disponível no meio.

Tabela 3.6: Condições ótimas para o cultivo de *Isochrysis galbana*

Temperatura	27ºC	19<T<32º C – Faixa onde foi observado crescimento
pH	5,0-9,0	>9,0 – foi observado crescimento apenas com adição de Fe^{+3} ao meio
Salinidade	30-60 (g/L de NaCl)	Nesta faixa não houve mudança significativa no crescimento

Fonte: Kaplan et al. (1986)

Estas condições de temperatura, salinidade e pH, aliadas a altas taxas de crescimento, tornam a *I. galbana* potencialmente adequada para cultivos *outdoor*.

CAPÍTULO 4 - METODOLOGIA DAS ANÁLISES QUÍMICAS E BIOQUÍMICAS

Neste Capítulo, são apresentadas as análises químicas e bioquímicas empregadas para caracterização da biomassa, tanto para experimentos *indoor* quanto para experimentos *outdoor*.

4.1 OBTENÇÃO DE BIOMASSA LIOFILIZADA

A biomassa para análise composicional foi coletada por centrifugação em centrífuga refrigerada (CIENTEC, modelo CT6000R), a 3500 rpm e a ± 20°C durante 10 minutos. Este procedimento foi repetido uma vez empregando água deionizada para a retirada do sal e resíduo do meio de cultura (ZHU & LEE, 1997). A biomassa úmida foi congelada em coletores universais de plástico num freezer a temperatura negativa, e a seguir transferida para um liofilizador (TERRONI, Enterprise). Após o processo de liofilização da biomassa os coletores foram mantidos em dessecador a vácuo até as análises.

4.2 DETERMINAÇÃO DO PESO SECO

O peso seco das células foi determinado segundo ZHU & LEE (1997). Neste método, uma amostra de 50 mL da suspensão celular é centrifugada a 5000 rpm, ± 20 °C durante 10 minutos. O concentrado de células é ressuspenso em 2 mL de sobrenadante e filtrado em filtro de fibra de vidro com porosidade 0,45 µm (SARTORIUS). Os filtros utilizados são previamente tratados em forno mufla (QUIMIS) a 400 °C por 4h. Antes da filtração, os filtros são secos em estufa a 100°C por 2 horas, resfriados em dessecador e pesados (P1). Os filtros com biomassa são colocados na estufa e mantidos a 80°C até peso constante (P2), com o objetivo de determinar o peso seco da biomassa. Os ensaios são realizados em triplicata e o peso seco foi calculado como a diferença P2-P1.

4.3 MEDIDAS DE DENSIDADE CELULAR

O número de células do cultivo foi monitorada por microscopia óptica (BIOVAL, L1000). Para tal alíquotas de 3 ml eram coletadas e a elas eram adicionados

25 µL de lugol acético. A contagem celular foi realizada em câmara Fuchs- Rosenthal. A taxa de crescimento (µ) foi calculada de acordo com a equação (4.1).

$$\frac{dX}{dt} = \mu[X] \qquad (4.1)$$

Foi estabelecida uma relação entre o número de células obtida por contagem ao microscópio e a densidade ótica da suspensão celular. Medidas de absorvância da suspensão de células a 750 nm foram realizadas em espectrofotômetro (BIOESPECTRO, modelo SP-220) e uma relação linear foi obtida com R^2=0,97. Na equação (4.2), a concentração de células, X, é dada em g/L:

$$X = \frac{(OD_{750} - 0{,}0163)}{2{,}5204} \qquad (4.2)$$

4.4 ANÁLISE DE NITRATO RESIDUAL

O nitrato residual do meio foi monitorado por método espectrofotométrico de acordo com COLLOS *et al.* (1999). Amostras da cultura são coletadas e filtradas a vácuo em membrana de celulose 0,45 µm de porosidade. O filtrado é recolhido e HCl 1M é adicionado (1%v/v). A leitura de densidade ótica é realizada a 220 nm (nitrato, ABS_{220}) e 275 nm (nitrogênio orgânico, ABS_{275}). A absorvância final é dada pela equação (4.3):

$$ABS_{final} = ABS_{220} - 2\ ABS_{275} \qquad (4.3)$$

Uma curva padrão foi construída com concentrações de 0 a 0,16 mM de nitrato de potássio.

4.5 ANÁLISE DE FOSFATO RESIDUAL

A análise do fosfato em solução é realizada por método espectrofotométrico de acordo com *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (1960). As seguintes soluções são usadas para análise de fosfato:

Solução de Ácido Forte – Adiciona-se 150 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) em 300 mL de água destilada. Após resfriamento, adiciona-se 2,0 mL de HNO_3 concentrado e afere-se em balão volumétrico de 500 mL.

Solução de ácido forte e molibdato de amônia – Preparada com o seguinte procedimento:

a) dissolve-se 15,7 g de $(NH_4)_6Mo_6O_{24}.4H_2O$ em 100 mL de água destilada;

b) adiciona-se 126 mL H_2SO_4 conc. em 200 mL de água destilada. Após resfriar, adiciona-se 1,7 mL de HNO_3 concentrado;

c) mistura-se as soluções (a) e (b) e aferi-se em balão de 500 mL.

Solução de amino - naftol ácido sulfônico – Preparada com o seguinte procedimento:

- Pesa-se 0,375g de 1 amino-2-naftol-4-ácido sulfônico;
- Pesa-se 21 g de sulfito de sódio anidro (Na_2SO_3);
- Pesa-se 35 g de metabissulfito de sódio anidro ($Na_2S_2O_5$);
- Mistura-se ácido sulfônico com uma pequena porção de $Na_2S_2O_5$, em um recipiente limpo e seco;
- Dissolve-se o restante dos sais em 400 mL de água destilada;
- Adiciona-se os sólidos anteriormente misturados e aferi-se em balão volumétrico a 500 mL.

Amostras da cultura são coletadas e filtradas à vácuo em membrana de celulose 0,45 μm de porosidade. Em tubo de ensaio, adiciona-se 10 mL de amostra, 0,5 mL de ácido molibdato e agita-se vigorosamente. Adiciona-se 0,5 mL de ácido sulfônico e agita-se. Aguarda-se 5 min para completa reação. Lê-se absorvância das amostras em espectrofotômetro (BIOESPECTRO, modelo SP-220) a 690 nm. O branco é água destilada com o mesmo tratamento da amostra, entretanto o ácido molibdato é substituído pela solução de ácido forte. Uma curva padrão foi construída com NaH_2PO_4 em concentrações na faixa de 1 a 15 $mg.L^{-1}$.

4.6 ANÁLISE DE CARBOIDRATOS TOTAIS

A análise de carboidratos totais empregada foi o método fenol-sulfúrico, de acordo com DUBOIS *et al.* (1956). A biomassa liofilizada foi pesada (10-30 mg) em frascos tipo "vial" e colocadas em banho de gelo onde 2 mL de H_2SO_4 concentrado foi adicionado aos frascos. As amostras foram mantidas em banho de gelo, sob refrigeração, por 20 h. Após este período, o extrato foi diluído com 6 ml de água deionizada e filtrado em filtro de fibra de vidro previamente tratado em mufla a 400ºC por 4h. Deste filtrado, foi coletado 50 µL e transferido para tubos compridos de boca larga onde foi adicionado 950 µL de água totalizando um volume final no tubo de 1 ml de amostra. Com auxílio de *dispensers,* foi adicionado 0,5 ml de fenol 3% e 2,5 ml de H_2SO_4 concentrado à amostra. Agitou-se bem e aguardou-se o tempo de reação de 30 min para proceder-se à leitura de densidade ótica. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 485 nm. Uma curva padrão foi construída a partir de uma solução padrão de D-glicose, soluções de 0 a 50 $\mu g.mL^{-1}$ foram preparadas para obtenção da curva.

4.7 ANÁLISE DE LIPÍDIOS TOTAIS

A análise de lipídios foi conduzida de acordo com FOLCH *et al.* (1957). A biomassa seca foi pesada (80-100 mg) em tubos de vidro onde adicionou-se pérolas de vidro (aproximadamente 30 pérolas) e 4 ml de água deionizada. Um vortex (SIEGER, AV) foi empregado para a ruptura da célula e homogeneização com os solventes. A mistura biomassa mais água foi agitada em vortex por 10 min. Adicionou-se, então, 5 ml de metanol, agitando-se por 2 min. A seguir, 10mL de clorofórmio foi acrescentado à mistura seguindo-se de agitação por 5 min. A amostra com os solventes foi filtrada em papel de filtro e o filtrado recolhido em proveta com tampa. O resíduo foi lavado com 5 mL de metanol e 10 mL de clorofórmio. O volume da proveta foi medido e ¼ deste volume de KCl 0,88% foi adicionado. Após a separação das fases, a fase superior foi descartada por aspiração. Ao volume restante, foi adicionado ¼ do volume da mistura metanol/água (2:1), novamente a fase superior foi descartada. A fase clorofórmio foi filtrada em papel de filtro contendo sulfato de sódio anidro; o filtrado foi recolhido em frasco de vidro e evaporado em estufa a 40ºC. Após a evaporação do solvente, os lipídios extraídos foram ressuspensos em 5 mL de clorofórmio e a massa de lipídios foi determinada por gravimetria.

4.8 ANÁLISE ELEMENTAR

Amostras liofilizadas contendo 1,1 a 1,7 mg de biomassa foram submetidas a combustão a 1075°C em analisador elementar (TRUSPECmicro, LECO) para obtenção da composição elementar em CHN (%). Hélio foi utilizado como gás de arraste. Carbono, hidrogênio e nitrogênio presentes na amostra foram convertidos a CO_2, H_2O e N_2, e quantificados em células de infravermelho (CO_2 e H_2O) e célula de condutividade térmica (N_2). Acetanilida (C=71,09%; N=10,36%; H=6,71%) foi utilizada como padrão para curva de calibração.

4.9 ANÁLISE DE PROTEÍNAS TOTAIS

O conteúdo protéico da biomassa foi determinado utilizando-se um fator de conversão de acordo com LOURENÇO *et al.* (1998). O nitrogênio total na biomassa foi determinado por análise elementar (PERKIN ELMER) e as proteínas totais foram determinadas pela equação (4.4):

$$\text{Proteínas (\%)} = 3{,}99*N \qquad (4.4)$$

onde N (%) é o nitrogênio total da biomassa em base seca

4.10 CITOMETRIA DE FLUXO

As células cultivadas no fotobiorreator foram analisadas quanto ao conteúdo lipídico em citometria de fluxo, de acordo com DE LA JARA *et al.* (2003). As células foram coradas com *Nile Red* (9-dietilamino-5H-benzo[alfa]fenoxazina-5-ona). A suspensão celular foi diluída (fator de diluição = 5), e 50 µL de uma solução de *Nile Red* em acetona (0,2 $mg.mL^{-1}$) foram adicionados a 2 mL da suspensão celular contendo, aproximadamente, 10^6 $cel.mL^{-1}$. O ensaio em branco correspondente a cada amostra era constituído pela suspensão celular contendo 50 µL de acetona. Após adição do corante ou da acetona (branco), as amostras foram agitadas em Vortex e mantidas no escuro por 15 min, sendo as leituras realizadas em citômetro de fluxo (modelo Cyflow Space - PARTEC) com a seguinte configuração: excitação em 488 e 638 nm e detecção de fluorescência frontal (FSC, *Forward Scatter*) e lateral (SSC, *Side Scatter*) por meio dos detectores FL1 (*green fluorescence;* 527/30 nm), FL2 (*orange fluorescence*;

590/50nm), FL3 (*red fluorescence;* 682nm) e FL4 (*far-red fluorescence;* 675nm) . A suspensão celular sem adição de corante ou reagente também foi lida no citometro para identificação da população de *I. galbana* na amostra através das medidas de tamanho (*Forward Scatter*) e densidade (*Side Scatter*) das partículas.

Na excitação do laser azul (488nm) o Nile Red exibe fluorescência laranja quando ligado a lipídios neutros e fluorescência vermelha quando ligado a lipídios polares. Sendo assim o sinal é coletado nos detectores FL2 (lipídios neutros) e FL3 (lipídios polares). O software WINMDI 2.9 foi utilizado no tratamento dos dados.

4.11 ANÁLISE DE CARBONO INORGÂNICO EM SOLUÇÃO NO FOTOBIORREATOR

A alcalinidade total (CO_3^{-2} e HCO_3^-) no fotobiorreator foi determinada por titulação de acordo com *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (1960) e a concentração de CO_2 foi calculada a partir das equações de equilíbrio considerando pH, temperatura e salinidade no sistema.

As amostras foram coletadas na entrada e/ou saída do fotobiorreator e centrifugadas a 3500 rpm por 10 min. Um volume de 10 mL do sobrenadante foi titulado com HCl 0,02 N, fenolftaleína e alaranjado de metila como indicadores, e a biomassa foi separada para análise elementar. Foram adicionadas 2 gotas de fenolftaleína a 10 mL da amostra em frasco erlenmeyer. Titulou-se com o HCl 0,02 N até o ponto de equivalência (pH=8,3), isto é, até o desaparecimento da cor rósea. Adicionou-se duas gotas de alaranjado de metila e titulou-se com o HCl 0,02 N até o ponto de equivalência (pH=4,3), isto é, até o aparecimento da cor laranja. Os cálculos das alcalinidades e concentrações de carbonato e bicarbonato são descritos a seguir:

Alcalinidade fenolftaleína (Na_2CO_3**, mg/L)**

$$P = (V_{HCl} \times N \times 53000)/V_{amostra} \qquad (4.5)$$

Alcalinidade total (mg Na_2CO_3/L)

$$T = (\text{total } V_{HCl} \times N \times 53000)/V_{amostra} \qquad (4.6)$$

Nas equações (4.5) e (4.6), N é a normalidade do ácido clorídrico. V_{HCl} e $V_{amostra}$ são, respectivamente, o volume de ácido e de amostra (em mL). 53000 é um fator de conversão para que o resultado seja expresso em mg/L e não em Eq/L. Este valor corresponde ao equivalente grama do Na_2CO_3 multiplicado por 1000 para compatibilizar as unidades. Note-se que, no cálculo da alcalinidade total, deve-se utilizar o volume total de HCl gasto. Para alcalinidade fenolftaleína, apenas o volume lido antes da titulação com o alaranjado de metila deve ser considerado. As relações das alcalinidades são dadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Relações obtidas com as Alcalinidades

RESULTADOS	ALCALINIDADES		
	OH-	CO_3^{-2}	HCO_3-
P=0	Zero	Zero	T
P<T/2	Zero	2P	T - 2P
P=T/2	Zero	2P	Zero
P>T/2	2P – T	2(T - P)	Zero
P=T	T	Zero	Zero

Fonte: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1960)

Para calcular as concentrações dos íons CO_3^{-2} e HCO_3^-, foram utilizadas as equações (4.7) e (4.8):

$$[CO_3^{-2}] \text{ (mg/L)} = 2P - 2[OH^-] \qquad (4.7)$$

$$[HCO_3^-] \text{ (mg/L)} = T - 2P + [OH^-] \qquad (4.8)$$

A concentração de CO_2 foi calculada de acordo com LEWIS & WALLACE (1998), que desenvolveram um programa (CO2SYS) para calcular as concentrações de carbonato, bicarbonato e dióxido de carbono, além de outros parâmetros como fugacidade e pressão parcial de CO_2 no sistema aquático em equilíbrio. O programa utiliza dois parâmetros dos quatro parâmetros mensuráveis no sistema com CO_2 (alcalinidade total (TA), concentração de CO_2 total (TCO_2), pH e pressão parcial ou fugacidade de CO_2) para calcular os dois parâmetros restantes.

As condições no laboratório no momento da análise (definidas no *software* como *inputs*) e as condições *in situ* (no reator) de pressão e temperatura (referidas no software como *output*) devem ser fornecidos ao programa. O CO2SYS permite a seleção de diferentes formulações para as constantes de dissociação do ácido carbônico na água do mar (K_1 e K_2) e demais constantes como K_B (ácido bórico) e K_F (fluoreto), duas formulações para a constante K_{SO4} e quatro diferentes escalas para o pH. As fontes para as diferentes formulações utilizadas pelos autores do programa CO2SYS são listadas na Tabela do ANEXO.

Neste trabalho, os parâmetros fornecidos ao programa foram a alcalinidade total, obtida por titulação, e o pH, além da temperatura no fotobiorreator como condição *output*, salinidade de 30 %, temperatura *input* de 25°C, pressão 10 dbar (1 atm) e concentração de fósforo no meio. O conjunto de parâmetros, a constante K_{SO4} e a escala de pH selecionadas para o cálculo foram Mehrbach et al. (1973) modificado por Dickson and Millero (1987), Dickson (1990) e *Seawater scale*, respectivamente. Todas as referências estão em LEWIS & WALLACE (1998).

As planilhas do programa CO2SYS seguem no Anexo 1 deste trabalho.

4.12 MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA DA Clorofila-a

Parâmetros de fluorescência da clorofila foram medidos usando um fluorímetro subaquático (*diving-PAM Sistem;* Walz, Effeltrich, Alemanha), equipado com um diodo emissor de luz (LED) azul (470 nm). Uma sonda de luz modulada foi utilizada para verificar o nível mínimo de fluorescência na amostra com 20 min de adaptação ao escuro (Fo), enquanto que o nível máximo de fluorescência (Fm) foi detectado após um pulso de saturação de luz actínia (5000 µmol fótons. m^{-2}. s^{-1}), que é suficiente para fechar todos os centros de reação e levar o *quenching* fotoquímico para zero. A variabilidade da fluorescência das amostras adaptadas ao escuro (Fv) e a eficiência quântica máxima do sistema fotoquímico PS-II ($\Phi_{PS\text{-}II}$) foram obtidas com as equações (4.9) e (4.10), respectivamente.

$$Fv = Fm - Fo \qquad (4.9)$$

$$\Phi_{PS\text{-}II} = Fv/Fm \qquad (4.10)$$

No cultivo *indoor* foram realizadas medidas da eficiência quântica efetiva, a qual é avaliada na ausência de adaptação ao escuro, por meio de medições de fluorescência de clorofila *in situ* realizadas no centro (5 µmol fótons. m^{-2}. s^{-1}), bem como na superfície interior (40 µmol fótons. m^{-2}. s^{-1}) do reator *indoor*. O estado estacionário de emissão de fluorescência (Fs) foi obtido nestas células adaptadas à luz, e o sinal de fluorescência máxima (Fm') foi determinado após um pulso de saturação de luz actínia. Em seguida, a eficiência quântica real do PS-II foi obtida pela equação (4.11). Este parâmetro pode ser utilizado para medir a taxa de transporte de elétrons (ETR) entre PSII e PSI, o que dá uma indicação da fotossíntese global.

$$\Phi_{PS\text{-}II} = Fm'\text{-}Fs / Fm' \quad (4.11)$$

O Valor da ETR (µmol elétrons. m^{-2}. s^{-1}) foi calculado usando a equação (4.12) (GENTY *et al*. 1989), onde $\Phi_{PS\text{-}II}$ é o rendimento quântico efetivo do sistema PS-II, 0,5 é um fator que considera que metade da energia de excitação é utilizada pelo fotossistema II, PAR é a radiação fotossinteticamente ativa (µmol fótons. m^{-2}. s^{-1}) e 0,84 é o coeficiente de absorção assumido.

$$ETR = \Phi_{PS\text{-}II}\ 0{,}5\ PAR\ 0{,}84 \quad (4.12)$$

Atividade fotossintética foi avaliada através de curva de luz rápida (RLC), onde as amostras foram expostas a oito passos incrementais de irradiância de 0 a 1100 µmol fótons m^{-2} s^{-1}, por 10 s em cada valor de irradiância para determinar a fluorescência estacionária (Fs) e, subsequentemente, a um pulso saturante de luz actínia (5000 µmol fótons. m^{-2}. s^{-1}) para a determinação de Fm'. A eficiência quântica máxima e a RLC foram determinadas para ambos os cultivos, indoor e outdoor (FBR).

CAPÍTULO 5 - CULTIVO *INDOOR* DE *I. galbana*

No Capítulo 5 são apresentadas as condições de cultivo *indoor* em escala de bancada de *Isochrysis galbana* conforme implementado nesta pesquisa. Especificamente estudou-se os impactos sobre a produtividade de biomassa e produtividade de lipídios a partir de aeração enriquecida com CO_2 sob três distintos regimes: (i) Batelada; (ii) Batelada Alimentada; e (iii) Semicontínuo.

5.1 METODOLOGIA DO CULTIVO INDOOR

5.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Os resultados da Metodologia de *Screening* indicaram a microalga marinha *Isochrysis galbana* como potencial espécie para aplicações de energia e em biocombustíveis. Nesta etapa do trabalho, a biofixação de CO_2 pela espécie foi avaliada, utilizando-*se I. galbana* da Coleção de Microalgas Elizabeth Aidar, Laboratório de Fisiologia e Cultivo de Algas, cedida pelo professor Sergio de Oliveira Lourenço do Departamento de Biologia Marinha da Universidade Federal Fluminense (UFF).

A classificação taxonômica desta microalga é dada por FALKOWSKI & RAVEN (2007): Domínio: Eukarya, Império: *Eukaryota,* Reino: *Chromista,* Subreino: *Euchromista,* Divisão: *Haptophyta, C*lasse: *Prymnesiophyceae,* Ordem: *Isochrysidales,* Gênero: *Isochrysis,* Espécie: *Isochrysis galbana.*

5.1.2 MEIO DE CULTURA

As culturas foram desenvolvidas em meio F/2 de Guillard sem silicato (GUILLARD, 1975) (Tabela 5.1). O meio F/2 foi utilizado neste trabalho por ser amplamente empregado no cultivo de microalgas marinhas. A solução salina de água do mar sintética (Ocean Fish, PRODAC) foi preparada com concentração de 33g/L. Tanto a água do mar sintética quanto as soluções estoque de meio foram previamente filtradas em membrana de celulose porosidade 0,22µm (exceto a solução de metais) e esterilizadas em autoclave a 121º C e 1 atm por 30 min (exceto a solução de vitaminas).

Tabela 5.1: Concentrações finais dos constituintes do meio de cultura (meio f/2, sem silicato) (foram desprezadas as concentrações dos nutrientes presentes na água do mar)

Macronutrientes	**µM**
$NaNO_3$	880,0
$NaH_2PO_4.2H_2O$	36,2
Quelantes	**µM**
Ácido cítrico	21,40
Citrato férrico	13,45
Metais traço	**nM**
$CoCl_2.6H_2O$	47
$CuSO_4.5H_2O$	40
$MnCl_2.4H_2O$	910
NaMoO4.H2O	26
$ZnSO_4.7H_2O$	75
Vitaminas	**nM**
Biotina	2
Cianocobalamina (B_{12})	0,4
Tiamina HCl	300

5.1.3 ACLIMATAÇÃO PRÉVIA

Inicialmente, as células foram cultivadas em batelada em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL de meio, e transferidos para frascos Erlenmeyer de 3,0 L contendo 1,75 L de meio. As culturas foram mantidas a 25ºC, e expostas a uma intensidade luminosa de 70 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1} provida por lâmpadas fluorescentes, com fotoperíodo de 12:12 h. As culturas foram aeradas com ar filtrado proveniente de compressores de aquário com 800 cm^3.min^{-1} de vazão. Esta cultura foi utilizada na fase de crescimento exponencial tardia como cultura iniciadora para o cultivo em um reator.

5.1.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os cultivos foram realizados em reator (tipo fermentador, Figura 5.1) constituído por uma cuba de vidro com 2L de capacidade, com aeração e temperatura controladas. A taxa de ar comprimido foi estimada por intermédio de um rotâmetro de gás (MORIYA, 0-15 $L.min^{-1}$) A vazão de CO_2 foi controlada por um sistema automatizado, com sinal 4-20mA, utilizando-se um controlador CD600 (SMAR) e um controlador de vazão mássica (*mass flow controller*, AALBORG, 0-200 $mL.min^{-1}$). A temperatura foi mantida entre 25-26°C com um banho termostático com circulador e controle automatizado de temperatura (QUIMIS,Q214M2). A água de resfriamento circulou através de mangueiras de látex e um tubo em aço, na forma de U, imerso na cultura. Um difusor de vidro com 4 saídas permitiu a aeração da cultura com ar difuso na forma de pequenas bolhas. Um eletrodo de oxigênio imerso foi usado para monitoramento constante da temperatura e da concentração de O_2 na cultura. Um sensor de concentração de CO_2 no ar (ENMET, 0-5% de CO_2 em ar) foi utilizado periodicamente para verificar a concentração do CO_2 na entrada e na saída de ar do reator. Lâmpadas fluorescentes foram empregadas para iluminação do reator e um temporizador analógico utilizado para fixar o fotoperíodo em 12:12 h; a densidade do fluxo de fótons da radiação fotossinteticamente ativa foi estimada com um sensor quântico (LI-COR, LI 190, USA) acoplado a um integrador radiométrico (LI-COR, LI 250A, USA).

5.1.4.1 Cultivo batelada

Os cultivos em batelada foram realizados num período de 13 dias. O inóculo foi de 0,002 $g.L^{-1}$ (6.10^4 $cel.mL^{-1}$) e a irradiância na superfície externa foi de 70 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ com fotoperíodo 12:12h. Uma bomba de aquário (800 $cm^3.min^{-1}$) foi utilizada para aerar a cultura durante os primeiros 3 dias. Após este período de adaptação, a cultura foi aerada com ar comprimido na vazão de 2 $L.min^{-1}$ enriquecido ou não com CO_2 em 5% (v/v). A temperatura foi mantida entre 25º-26º C e o volume da cultura foi de 2 L. Uma reposição de nitrato foi realizada no oitavo dia do cultivo enriquecido com CO_2. Ao final dos cultivos a biomassa foi separada por centrifugação e liofilizada para as análises de composição bioquímica.

Figura 5.1: Reator (cultivo *indoor*)

5.1.4.2 Cultivo em Batelada Alimentada

Com o objetivo de concentrar-se a cultura para aumentar a produção de biomassa, uma batelada alimentada foi conduzida ao longo de 21 dias. A vazão de aeração foi mantida em 2 $L.min^{-1}$, entretanto, a aeração empregou ar enriquecido com CO_2 em 5% (v/v) desde o primeiro dia do cultivo. O inóculo foi de 0,004 $g.L^{-1}$ ($1,3.10^5$ $cel.mL^{-1}$) e a intensidade luminosa na superfície foi de 70 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, com fotoperíodo 12:12 h. A temperatura foi controlada e mantida entre 25º-26º C e o volume inicial da cultura foi de 2 L. O nitrato foi monitorado; quando sua concentração era menor que 65µM, a concentração de todos os nutrientes (meio F/2) era reajustada. A adição de todos os nutrientes tornou-se necessária para que o crescimento não fosse limitado pela falta de algum outro nutriente, apesar de só o nitrato estar sendo monitorado. A primeira reposição de nutrientes ocorreu no décimo dia de cultivo e as demais nos dias 14, 16 e 18. No 21º dia, a cultura foi diluída para dar início à batelada em corte.

5.1.4.3 Cultivo semicontínuo

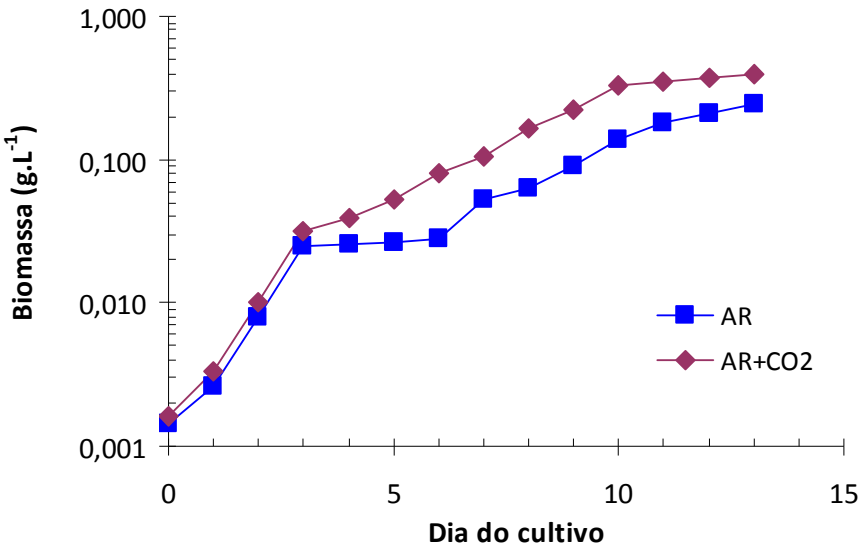
A partir do 21º dia de batelada alimentada, foi iniciada uma batelada em cortes. O volume da cultura era de 925 mL e, inicialmente, este foi diluído para reproduzir o volume inicial (2L). As condições de irradiância (70 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1}, com fotoperíodo 12:12h), temperatura (25º-26ºC) e aeração (2 L.min^{-1}, CO_2 em 5%) foram idênticas às da batelada alimentada. A concentração de nitrato no meio de cultivo também foi monitorada. As diluições do meio foram realizadas em intervalos de 2 e 3 dias, quando retirava-se cerca de 50% do volume da cultura e era feita a reposição com meio de cultura fresco (água do mar + nutrientes). Com intervalo de 3 dias, a concentração dos nutrientes era dobrada para acompanhar o aumento populacional. Em todos os cortes, o volume inicial da batelada subsequente sempre foi de 2 L.

5.2 RESULTADOS PARA OS CULTIVOS *INDOOR* DE *I. galbana*

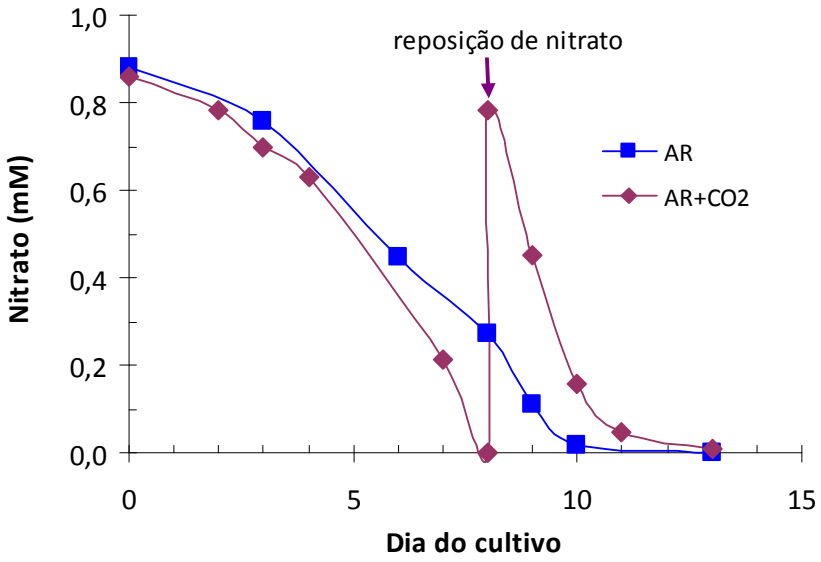
5.2.1 CULTIVO BATELADA

Os perfis de crescimento e consumo de nitrato dos cultivos em batelada aerados com a mistura atmosférica e com ar enriquecido com CO_2 (5%, v/v) são apresentados na Figura 5.2.

A densidade celular alcançou 0,29 g.L^{-1} com uma aeração de 2 L.min^{-1} da mistura atmosférica, enquanto para a mesma vazão de aeração com ar enriquecido com CO_2 em 5%, a densidade celular foi de 0,42 g.L^{-1}. A taxa específica de crescimento variou de 1,01 d^{-1} a 0,96 d^{-1} nos primeiros dias de crescimento (fase exponencial), quando ambos os cultivos foram aerados somente com a mistura atmosférica. O aumento na densidade celular se deve, não só ao enriquecimento com CO_2, mas também à reposição de nitrato ao meio realizada no oitavo dia de cultivo (Figura 5.2b) ajustando-se a concentração em aproximadamente 0,85 mM. Entretanto, a reposição de nitrato ao meio não acarretou em uma taxa de crescimento como na fase exponencial, limitando-se ao valor de 0,34 d^{-1}. O enriquecimento do meio com CO_2 e nitrato resultou em uma densidade celular maior, mas a reposição de nitrato ao meio não levou à duplicação celular em um dia de cultivo.



(a)



(b)

Figura 5.2: (a) crescimento de *I. galbana* em batelada *indoor* (b) consumo de nitrato - (■) ar Q = 2L.min^{-1} (♦) ar +CO_2 Q = 2L.min^{-1}, CO_2 5% (v/v).

A taxa de consumo de nitrato foi de 31 fmol NO_3. cel^{-1} .d^{-1} em ambos os cultivos, todavia após a reposição de nitrato a taxa de consumo foi de 36 fmol NO_3. cel^{-1} .d^{-1}. O aumento na taxa de consumo foi provavelmente devido à maior densidade celular presente no cultivo.

Muitos fatores afetam a taxa de crescimento celular, tais como disponibilidade de nutrientes, luminosidade e pH. Além do nitrato, outros nutrientes como o fosfato e o ferro são necessários para manter a duplicação celular. A adição de ferro (Fe^{+3}) prolongou a fase exponencial de crescimento e aumentou a densidade celular final de cultivos de *Chlorella vulgaris*, o que não ocorreu quando apenas nitrato foi reposto ao meio (LIU *et al.* 2008). A falta de metais, como molibdênio, cobalto e manganês também provoca a diminuição na taxa de crescimento (CHEN *et al.* 2011). Já o fósforo é essencial para os organismos, pois está envolvido nos processos de armazenamento/liberação de energia (ATP/ADP), das ligações estruturais do DNA e RNA e compõe a membrana plasmática (fosfolipídios). A razão N:P no meio F/2 é 15, mas uma menor concentração de fosfato no meio leva a uma menor densidade celular, como observado por YINGYING & CHANGAI (2009), que empregaram diferentes concentrações de fosfato (5-1000 $\mu mol.L^{-1}$) no cultivo de *I. galbana* e obtiveram maior densidade celular quando 500 $\mu mol.L^{-1}$ de fosfato foi empregado. Entretanto, a reposição de fosfato parece não alterar significativamente o crescimento, de acordo com CHEN *et al.* (2011). O acúmulo de polifosfatos intracelulares, mecanismo conhecido como *luxury uptake*, faz com que a célula possa manter-se em ausência de fosfato, pois neste caso anteriormente o meio era completo, possibilitando o acúmulo (POWELL *et al.* 2008).

O pH do meio de cultivo sem enriquecimento com CO_2 esteve na faixa de 8,5 a 9,0. Durante o cultivo em batelada, com aeração somente com a mistura atmosférica, o pH não apresentou uma variação significativa na fase exponencial do crescimento, mas apresentou uma leve mudança ao final do cultivo, alcançando o valor de 9,3. Por outro lado, ocorreu uma acidificação do meio de cultivo quando foi iniciada a aeração com mistura enriquecida com CO_2, e o pH caiu rapidamente para 6,6, subindo para 6,8 no dia seguinte e depois mantendo-se entre 7,0-7,5. Com o começo da alimentação de CO_2 ao cultivo observou-se não só a queda do pH, como também o aumento da concentração de CO_2 monitorado no ar de saída do reator (4,8% v/v em ar). Ao longo dos dias de cultivo observou-se que o CO_2 na saída foi declinando e o pH mantendo-se na faixa da neutralidade.

Quando o pH está entre 6,0 e 9,0 o bicarbonato (HCO_3^-) é a espécie predominante no meio, a anidrase carbônica (AC) externa é ativada e o bicarbonato é

utilizado como fonte de carbono inorgânico (CI) para a fotossíntese (CAMIRO VARGAS *et al.* 2005). As espécies que possuem AC externa, como a *Isochrysis galbana*, têm a vantagem da aquisição de CI em ambas as formas (CO_2 e HCO_3^-). O enriquecimento com CO_2 aumentou a densidade celular do cultivo de *Isochrysis galbana*, mas a atividade da AC externa diminuiu com o aumento da concentração de CO_2 no meio (YINGYING & CHANGAI, 2009). De acordo com BHATTI *et al.* (2002), a diferença entre o pH intracelular e o do ambiente marinho dificulta a aquisição de CO_2 por simples difusão porque o pH do mar encontra-se em torno de 8,2 e o citosólico em torno de 7,0-7,2. O mecanismo de concentração de carbono inorgânico (CCM) nas espécies marinhas mantém a concentração de CI intracelular na faixa observada no mar. Entretanto, se o pH é baixo (5,0-7,0) a aquisição de CO_2 se dá por difusão e o mecanismo de captação ativa de CO_2 é suprimido. Observou-se no presente trabalho que o enriquecimento da mistura atmosférica com CO_2 resultou em um pH do meio de cultivo na faixa 7,0-7,6. Como a expressão da anidrase carbônica externa é reprimida em *Isochrysis galbana* por altas concentrações de CO_2, mas, nestas condições, o transporte ativo de HCO_3^- não é, esta microalga é capaz de transportar ambas as formas de CI na presença de altas concentrações de CO_2 (BHATTI *et al.* 2002; MOAZAMI-GOUDARZI & COLMAN, 2012). Esta é uma vantagem de algumas espécies como a *I. galbana,* que as torna capazes de crescer em uma faixa maior de pH.

A composição da biomassa no final dos cultivos, apresentada na Figura 5.3, mostra que o teor de carboidratos na biomassa foi de 29,76% no cultivo sem enriquecimento com CO_2, enquanto os lipídios apresentaram um pequeno aumento, cerca de 18,0 %, na biomassa cultivada com CO_2. A concentração de proteínas totais foi maior no cultivo enriquecido com CO_2, cerca de 23,46 % em massa seca. ARAÚJO *et al.* (2005) cultivando *Chaetoceros cf. wighamii* observaram que com adição de CO_2 o teor de proteínas na biomassa aumentou enquanto o de carboidratos diminuiu quando comparado a um cultivo aerado somente com ar. Também observaram que o teor de lipídios não foi significativamente afetado pela adição de CO_2.

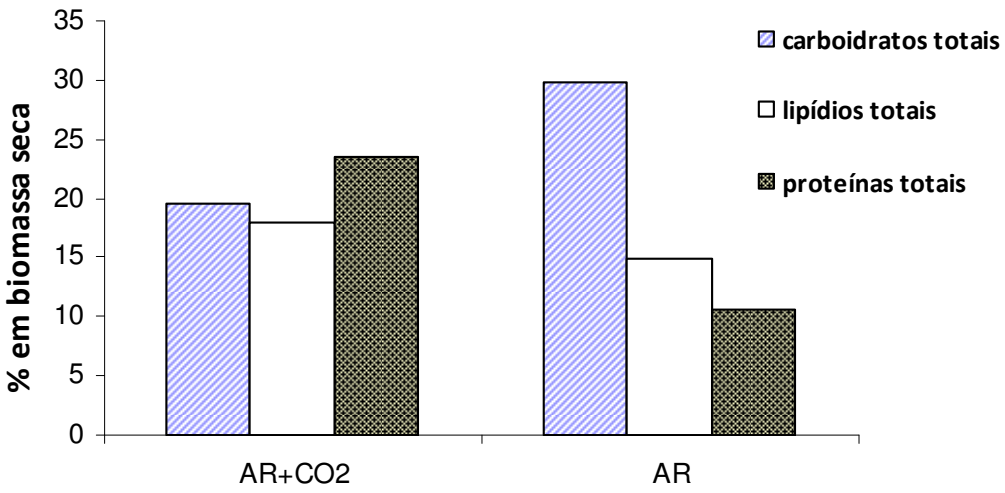


Figura 5.3: Composição bioquímica da biomassa cultivada em batelada *indoor*, aeração com mistura atmosférica (AR) e enriquecida com CO_2 5% (AR+CO_2).

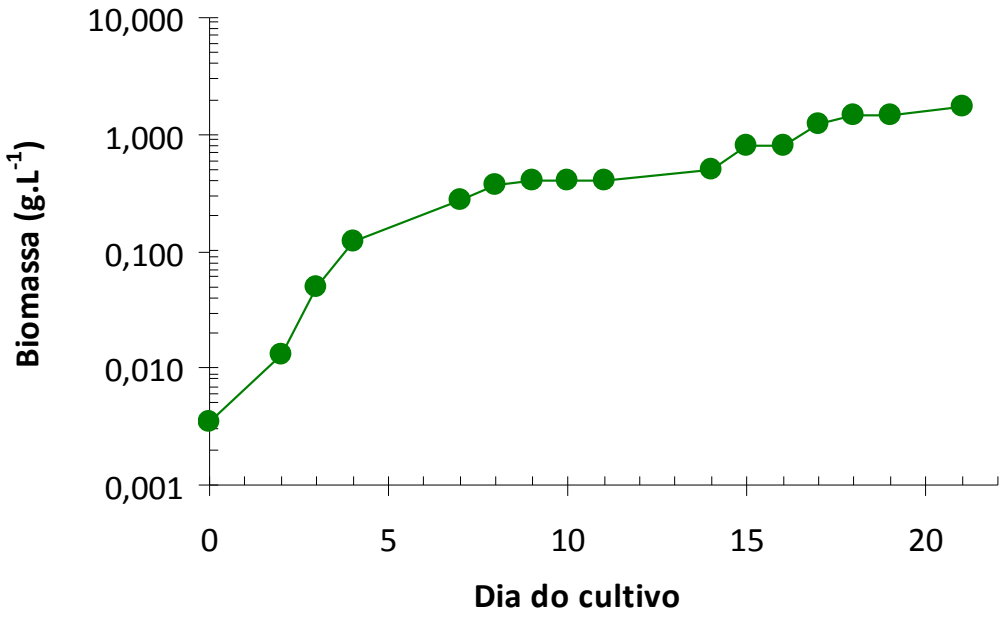
No presente trabalho a reposição de nitrato ao cultivo com ar enriquecido resultou em um teor de proteínas maior que o de carboidratos e lipídios, mas, quando comparado ao cultivo não enriquecido, o acúmulo de lipídios foi ligeiramente maior, o que indica uma estimulação à produção de lipídios pela maior disponibilidade de carbono inorgânico na cultura (Figura 5.3). O acúmulo de biomoléculas com função de reserva energética para a célula, como carboidratos e triglicerídeos, ocorre na fase estacionária do crescimento. Com a célula se dividindo, todo o aparato metabólico está voltado à produção de proteínas e utilização de energia na formação de novas células. A utilização de diferentes fontes de nitrogênio (NO_3^-, NO_2^-, uréia) no cultivo de *I. galbana* mostrou que além da composição bioquímica da célula variar mais com a fase do crescimento do que com a fonte de nitrogênio, o tipo de lipídio variou com a idade da cultura, ou seja, os fosfolipídios (lipídios polares) eram produzidos durante a fase exponencial, enquanto os triglicerídeos eram acumulados na fase estacionária do crescimento (FIDALGO *et al.* 1998). RAGHAVAN *et al.* (2008), estudando a variação da composição bioquímica da microalga *Chaetoceros calcitrans* com o enriquecimento de CO_2, apontam para a possibilidade de a célula investir o excesso de carbono inorgânico na síntese de proteínas e no crescimento mais do que na reserva de lipídios e carboidratos. CHU *et al.* (1996), no cultivo autotrófico e heterotrófico de *Nitzschia inconspicua*, obtiveram um aumento na concentração de lipídios com enriquecimento de 5% de CO_2 comparativamente aos cultivos heterotróficos com glicose e acetato.

A alocação do carbono no *pool* orgânico da microalga depende da razão C:N no meio de cultivo e de características fisiológicas e genéticas da célula como a capacidade de estocar nitrogênio, o uso eficiente do nitrogênio, e requerimentos respiratórios. (PALMUCCI *et al.* 2011). No cultivo enriquecido com CO_2 o excesso de carbono foi levemente direcionado ao acúmulo de lipídios, mas como no meio ainda havia nitrato (devido à reposição do oitavo dia) as principais macromoléculas apresentaram um equilíbrio em suas quantidades. Quanto ao cultivo aerado somente com a mistura atmosférica, o nitrato do meio foi extinto e o carbono inorgânico proveniente do ar foi direcionado ao acúmulo na forma de carboidratos. PALMUCCI *et al.* (2011) observaram que para células pequenas há uma tendência ao acúmulo na forma de lipídios em meios limitados em nitrogênio. Apesar da *I. galbana* ser uma célula pequena (5-7 µm) o excesso de carbono inorgânico foi investido em polissacarídeos.

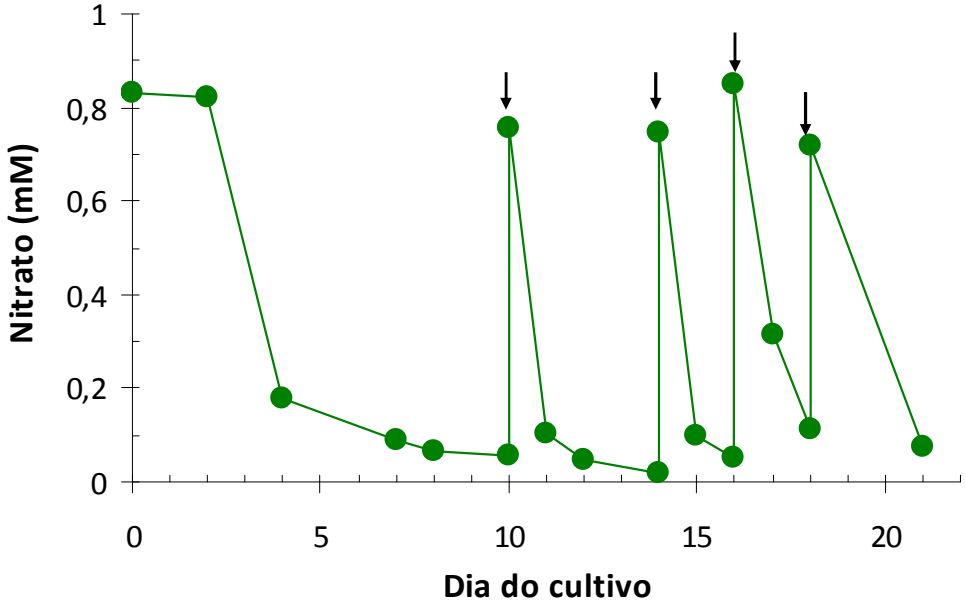
5.2.2 CULTIVO EM BATELADA ALIMENTADA

A Figura 5.4 mostra a curva de crescimento da biomassa em regime de batelada alimentada e a concentração de nitrato ao longo do cultivo.

A cultura em regime de batelada alimentada alcançou uma concentração de 1,73 $g.L^{-1}$. A taxa específica de crescimento da fase exponencial foi de 1,12 d^{-1}, após o começo da reposição de nutrientes a taxa específica máxima de crescimento foi de 0,28 d^{-1}. A adição de nutrientes, ao longo do cultivo, impediu que as células cessassem o crescimento, aumentando a produção de biomassa.



(a)



(b)

Figura 5.4: (a) Crescimento de *I. galbana* em batelada alimentada *indoor*, ar enriquecido com CO_2 (5% v/v) (b) Concentração de nitrato no meio de cultura na batelada alimentada. As setas indicam a reposição de nutrientes no meio.

Logo após a reposição dos nutrientes as células rapidamente captavam o nitrato do meio, mas não se verificou um crescimento exponencial da cultura. Após a primeira adição de nutrientes no dia 10 a densidade celular cresceu apenas 0,13 $g.L^{-1}$ em 4 dias.

Na segunda adição de nutrientes, no dia 14, a densidade celular cresceu 0,38 $g.L^{-1}$ em 2 dias. Na terceira adição de nutrientes, no dia 16, a densidade alcançou 0,78 $g.L^{-1}$ também em 2 dias de cultivo. O comportamento das células demonstra uma adaptação no metabolismo celular a uma condição de disponibilidade de nutrientes no meio. O começo da adição de nutrientes ocorreu no dia 10 onde a cultura encontrava-se em fase estacionária. Na primeira adição de nutrientes as células direcionaram o metabolismo à manutenção celular, nas seguintes reposições de nutrientes as células apresentaram uma tendência a reestabelecer o crescimento aumentando o número de células.

O pH do meio de cultura tem uma queda de 8,5 para 6,7 com o começo da aeração enriquecida com CO_2, e permanece neste valor nos dois primeiros dias de cultivo estabilizando-se em torno de 7,3-7,6. A composição bioquímica celular de lipídios e carboidratos foi de 37,5% e 27% (em biomassa seca), respectivamente, com uma produtividade em lipídios de 0,0468 $g.L^{-1}.d^{-1}$ ao final do cultivo. A quantidade de lipídios na célula foi 19,5% maior na batelada alimentada.

De acordo com HSIEH & WU (2009), a regulação da taxa de alimentação de nutrientes para aumentar a produtividade pode ser realizada por cultivo em batelada alimentada. O cultivo em batelada alimentada pode ser utilizado como estratégia para o acúmulo de lipídios mantendo-se uma taxa de alimentação de nitrogênio. TAKAGI *et al.* (2000) verificaram que o conteúdo de lipídios intracelulares nas células colhidas no final do cultivo com alimentação intermitente de nitrato durante as fases exponencial e estacionária (50,9 e 51,5 % de lipídios em peso seco) foi surpreendentemente maior do que aquele (31,0 % de lipídios em peso seco) correspondente à cultura com uma concentração inicial de nitrato de 9,9 mM sem posterior alimentação de nitrato.

5.2.3 CULTIVO SEMICONTÍNUO

A Figura 5.5 mostra o perfil de crescimento e o consumo de nitrato da batelada em corte.

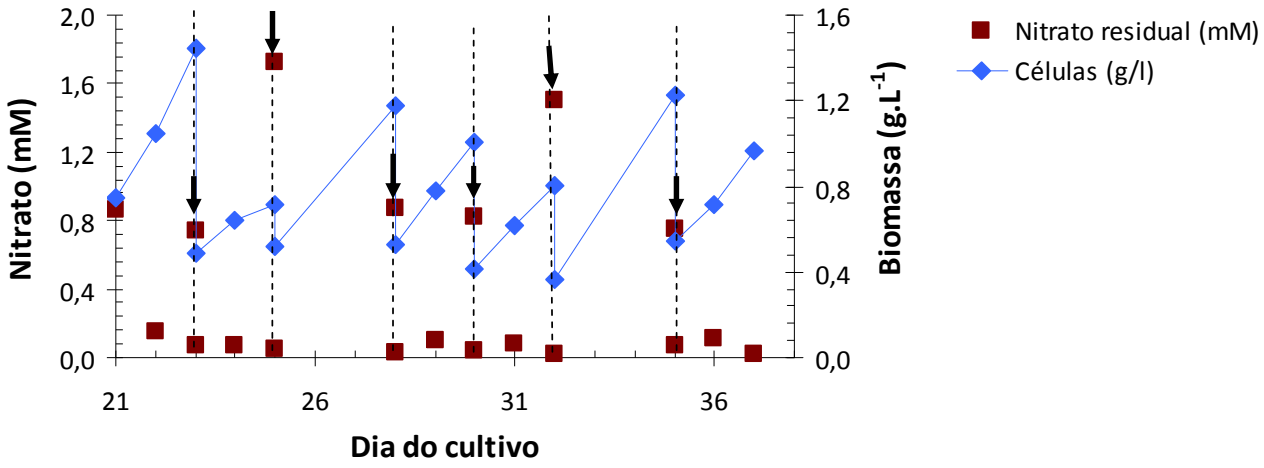


Figura 5.5: Perfil de crescimento de *I. galbana* e consumo de nitrato em cultivo semicontínuo *indoor*. As setas indicam a reposição de nutrientes.

A concentração máxima de biomassa foi de 1,4 $g.L^{-1}$ e a taxa específica média de crescimento foi de 0,30 d^{-1}. A absorção do nitrato pelas células ocorreu rapidamente: em 24 h, aproximadamente 80% do nitrato adicionado havia sido assimilado pelas células. Entretanto, não se observou um aumento exponencial na produção de biomassa no mesmo intervalo de tempo. Este fenômeno parece estar relacionado a um mecanismo de adaptação da célula à escassez de nitrogênio através de um acúmulo de N intracelular (*inorganic pools*). Em caso de escassez de nitrogênio no meio, a célula utiliza o *inorganic pool* de N e assim que o nitrogênio é reposto ao meio rapidamente o processo assimilatório ocorre, e os *inorganic pools* de nitrogênio são reconstruídos (LAVÍN & LOURENÇO, 2005). A faixa de variação do pH foi muito estreita, mantendo-se entre 7,3-7,6.

O sistema de cultivo em cortes apresentou bom desempenho, alcançando uma produtividade máxima de 0,5 $g.L^{-1}.d^{-1}$ de biomassa e 0,078 $g.L^{-1}.d^{-1}$ de lipídios (Tabela 5.2). CHIU *et al.*(2009), cultivando *Nannochloropsis oculata* em regime semicontínuo, com aeração enriquecida em 5% de CO_2, obteve uma produtividade de 0,44 $g.L^{-1}.d^{-1}$ em biomassa e 0,113 $g.L^{-1}.d^{-1}$ de lipídios. O teor de lipídios na biomassa seca variou entre 6,5 e 16,5% e o de carboidratos foi de 20-26%. FIDALGO *et al.* (1998) obtiveram um teor de lipídios na fase exponencial de 21,87% e de carboidratos de 7,65%, enquanto ZHU *et al.* (1997) obtiveram 25 % para lipídios e carboidratos. A baixa concentração de lipídios na biomassa pode estar ligada à constante renovação do meio, o que mantém as

células metabolicamente ativas no sentido de formação de biomassa e não de acúmulo de lipídios.

Tabela 5.2: Produtividade na batelada em corte

	Produtividade		
Dia do corte	Biomassa (g/Ld)	Lipídio (g/Ld)	Carboidrato (g/Ld)
4	0,36	0,054	0,093
7	0,39	0,026	0,102
9	0,50	0,078	0,100
11	0,40	0,040	0,105
14	0,41	0,068	0,057

Outro fator que tem grande influência na produtividade de cultivos semicontínuos é o *replacement time* (tempo de reposição). CHIU *et al.* (2009) realizaram dois cultivos semicontínuos com intervalo de um dia e três dias na reposição, sendo obtida maior produtividade com intervalo de um dia. Todavia, a quantidade de lipídio foi 10% maior com três dias de intervalo. Este fator é diretamente influenciado pela fase do crescimento em que se encontra a cultura. Quando a reposição é feita todos os dias, há um aumento no número de células, o que eleva a produtividade de biomassa e consequentemente a de lipídios. Quando a reposição ocorre a cada 2 ou 3 dias, onde o meio encontra-se deficiente em nutrientes, as células conduzem o metabolismo ao acúmulo de compostos orgânicos de reserva como os lipídios. Toda esta mudança no metabolismo celular ocorre em decorrência da disponibilidade ou não de nutrientes no meio. Assim a razão C:N no meio de cultura deve ser ajustada para um valor ótimo em produtividade, considerando-se que a deficiência de N causa acúmulo de lipídios, ao mesmo tempo em que reduz o rendimento em biomassa. Por outro lado, uma grande disponibilidade de N no meio levará a um aumento no número de células com diminuição considerável do acúmulo de lipídios (HSIEH & WU, 2009).

A intensidade de luz também afeta diretamente a captação de nitrato e o crescimento celular. A diminuição do rendimento em biomassa e da captação de nitrato no dia seguinte à reposição pode estar relacionada à baixa luminosidade que ocorre com o aumento da densidade da cultura. A eficiência fotossintética é altamente afetada por

uma baixa irradiância. Medidas de atividade fotossintética foram realizadas para identificar esta limitação e são apresentadas a seguir.

Fluorescência

Um Fluorímetro de Pulso e Amplitude Modulada (PAM) foi utilizado para medir rendimento fotoquímico efetivo, taxa de transporte de elétrons e rendimento fotoquímico máximo no terceiro dia da batelada em corte. A concentração celular era então de 0,642 $g.L^{-1}$. A curva de luz rápida (RLC) foi realizada com amostra do reator nesta concentração e a mesma amostra diluída à metade. Outra amostra foi adaptada ao escuro por 20 min para medida do potencial fotoquímico máximo. Foram realizadas medidas de rendimento fotoquímico *in situ* ($\Phi_{PS\text{-}II}$) no reator, no centro e próximo à superfície interna, com o objetivo de calcular-se a taxa de transporte de elétrons (ETR) no sistema fotossintético PSII das células. A Tabela 5.3 apresenta as medidas de fluorescência e a ETR para dois pontos do reator (centro e superfície). As curvas RLC podem ser visualizadas na Figura 5.6.

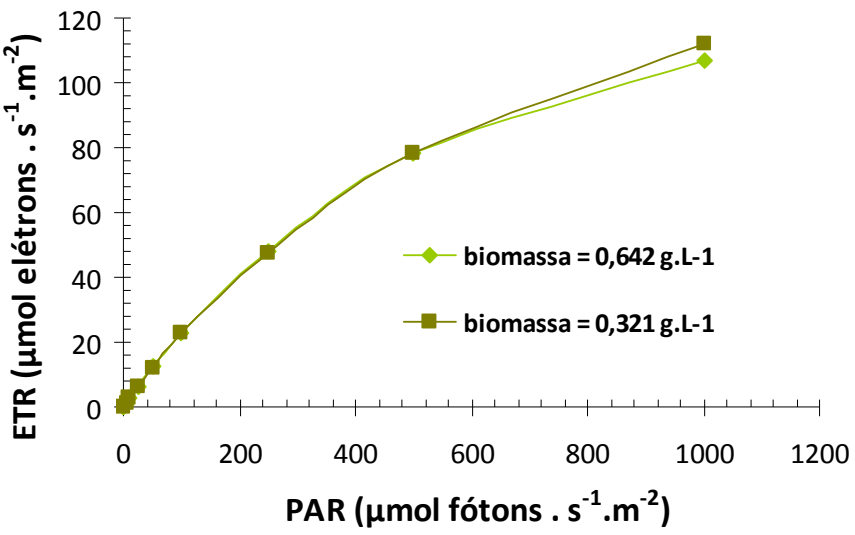


Figura 5.6: Curva de Luz Rápida – cultivo semicontínuo, concentração celular (♦) 0,642 $g.L^{-1}$ (■) 0,321 $g.L^{-1}$.

Tabela 5.3: Parâmetros fisiológicos da *I. galbana* em cultivo semicontínuo (conc. celular = 0,642 g.L^{-1})

Parâmetro	PAR µmol fótons . m^{-2}.s^{-1}	Rendimento Fotoquímico (Φ_{PS-II})	ETR µmol elétrons . m^{-2}.s^{-1}
Adaptada ao escuro (Fv/Fm)	0	0,717 ± 0.004	-
Adaptada à luz (centro do reator)	5	0,706 ± 0.023	1,482 ±0.048
Adaptada à luz (parede interna do reator)	40	0,732 ± 0.023	12,292 ± 0.385

O potencial fotoquímico máximo é uma característica de cada espécie de microalga. *Isochrysis galbana* apresentou um potencial máximo de 0,717, isto é, 72% da luz que é fornecida à célula é utilizada na fotossíntese. Por outro lado, quanto maior a irradiância, maior o transporte de elétrons, o que acarreta em aumento na produção de biomassa. A irradiância no centro do reator foi medida em 5 µmol.s^{-1}. m^{-2} ao passo que atinge 40 µmol.s^{-1}. m^{-2} na parede do reator, resultando em taxas de transporte de elétrons respectivamente de 1,48 e 12,29. As ETR estavam em níveis muito baixos indicando a necessidade do aumento da luminosidade para aumentar a eficiência fotossintética e, portanto, a produtividade em biomassa. Entretanto, o rendimento fotoquímico apresentou valores sempre próximos ao máximo, variando de 0,676 a 0,788, indicando que as células não apresentavam limitação nutricional (KROMKAMP & PEENE, 1999). As curvas RLC para as diferentes concentrações de células foram iguais, isto porque a ETR é uma característica da espécie de microalga aliada à variação da luminosidade e não depende da concentração celular. COSGROVE (2007) obteve para *I. galbana* valores de rendimento fotoquímico máximo do PSII (Fv/Fm) entre 0,738-0,748 variando o tempo de adaptação ao escuro, e verificou que, para células cultivadas com baixa luminosidade (≈ 54 µmol .s^{-1}. m^{-2}), o valor máximo de Fv/Fm é obtido com apenas 30s de adaptação ao escuro, e que maiores tempos de adaptação ao escuro apresentavam uma tendência a queda no valor de Fv/Fm. Após as medidas de fluorescência terem sido realizadas, a irradiância externa inicialmente em 70 µmol fótons .s^{-1}. m^{-2} foi elevada para 180 µmol fótons.s^{-1}.m^{-2} e o crescimento celular atingiu 4,75 g.L^{-1}, agregando-se nutrientes ao cultivo a cada dois dias.

CAPÍTULO 6 - PLANTA PILOTO – SISTEMA DE FOTOBIORREAÇÃO

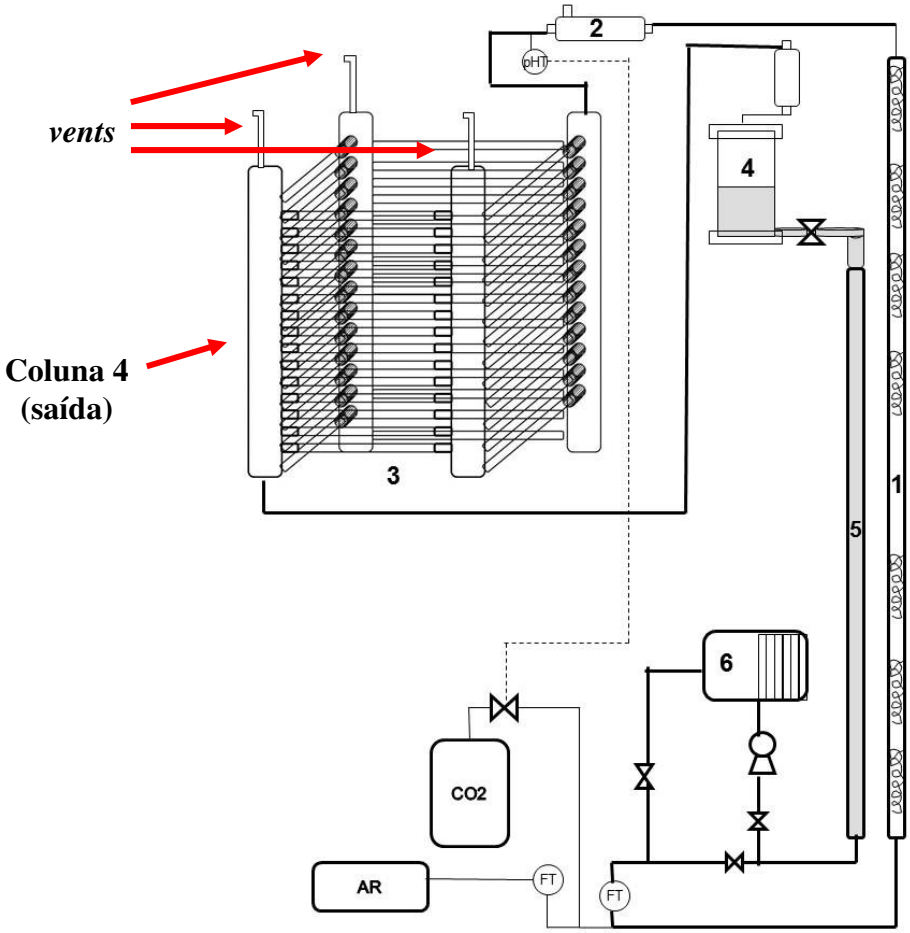
O principal objetivo deste capítulo consistiu no projeto, construção e operação de um Sistema de Fotobiorreação no Lab. H2CIN situado no Bloco K, CT, UFRJ. O Sistema de Fotobiorreação opera em escala piloto com volume interno total próximo de 670L, visando à produção de biomassa em cultivo *outdoor* de *Isochrysis galbana*.

6.1 DESCRIÇÃO DO SISTEMA DE FOTOBIORREAÇÃO DO LAB. H2CIN

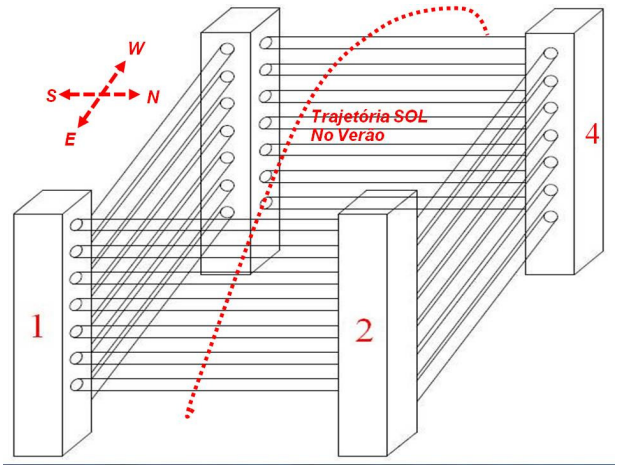
O Sistema de Fotobiorreação estende-se verticalmente por aproximadamente 12m ao longo do espaço interno do Lab. H2CIN, ocupando área *versus* altura aproximadas de $12m^2$ X 3.3m no terraço do laboratório e área *versus* altura aproximada de $3m^2$ X 2m no subsolo do mesmo. O Sistema é totalmente acionado por ar comprimido duplamente filtrado suprido por um compressor elétrico convencional de 02 cilindros (SCHULZ*)* com reservatório de 200L de capacidade e pressão de 150psi. O ar comprimido é usado para elevação da suspensão celular via tecnologia *air-lift*. Toda a energia requerida para movimentação do fluido é proveniente da injeção do ar comprimido, isto é, o sistema não utiliza bombas ou máquinas de escoamento para movimentar a cultura. No Sistema de Fotobiorreação, o meio de cultura algal mantém-se em permanente movimento, sendo toda a energia motriz do processo garantida pela tecnologia *air-lift* na fase ascensional do meio de cultura. A gravidade mantém o movimento do fluido no interior da seção solar do sistema e no retorno de líquido ao subsolo. Este mecanismo de movimento material é similar ao utilizado em "montanhas russas": Fornece-se energia mecânica apenas para elevar o material ao ponto mais alto do sistema e, daí em diante, a recirculação é garantida pela gravidade.

A Figura 6.1a apresenta o esquema da seção solar do protótipo do Fotobiorreator – patente nº PCT/BR2011/000355 (em depósito). A versão implementada deste esquema utiliza as quatro colunas mostradas como cilindros (e não como paralelepípedos como na Figura 6.1b) de acrílico de 10mm de espessura de parede com 3m de altura e 200mm de diâmetro externo. As quatro colunas são interligadas por quatro painéis de tubos de vidro boro-silicato, cada um deles definindo um feixe de tubos de vidro horizontais (*fence*) de 3m de comprimento por 2" de diâmetro cada. Os

painéis de tubos de vidro são alinhados com os eixos cardeais como mostrado na Figura 6.1b.



(a)



(b)

Figura 6.1: Esquema do Protótipo do Fotobiorreator.**(a)** 1-*Riser* de carbonatação e transporte (RCT), 2- Separador Gás-Líquido (SGL), 3- Fotobiorreator (FBR), 4- Tanque de Retorno de Líquido (TRL), 5- Coluna de Retorno de Líquido (CRL), 6- Separação de Biomassa – filtro prensa (SBM). **(b)** Seção solar (FBR)

O acrílico utilizado nas colunas do fotobiorreator é resistente à radiação solar, o que possibilitou o seu uso sem comprometimento da transparência. O formato cilíndrico e a forma de colagem também foram realizados de forma a suportar a pressão da água. O sistema é ainda pouco automatizado, contando apenas com a injeção automática de CO_2 através de válvula ON/OFF com controle por pH conforme descrito a seguir. A partida de operação e demais controles são executados em modo manual, com instrumentação mecânica (rotâmetros, gasômetros e manômetros), válvulas manuais de esfera (inox) 1/2" nas linhas de ar comprimido e válvulas manuais plásticas de PVC 50mm nas linhas de líquido. A parte hidráulica do sistema opera de forma perfeitamente estável e monótona sem maiores necessidades de controle e automação. Automação existe apenas para garantir injeção automática de CO_2 de modo a prover pH dentro de faixa estreita (7,3-8,6) na entrada da seção solar do fotobiorreator (Figura 6.1).

O Sistema de Fotobiorreação compõe-se das seguintes seções:

- *Riser* de Carbonatação e Transporte (**RCT**);
- Separador Gás-Líquido (**SGL**);
- Fotobiorreator (**FBR**);
- Tanque de Retorno de Líquido (**TRL**);
- Coluna de Retorno de Líquido (**CRL**);
- Separação de Biomassa (**SBM**).

A alimentação de CO_2 sob pressão é utilizada juntamente com ar comprimido para a propulsão *air-lift*. O processo depende criticamente da carbonatação do meio de cultura na fase de ascensão *air-lift* no *Riser* RCT, porque após a ascensão as fases gás e líquido são separadas no SGL, sendo a seção solar do sistema (FBR) alimentada apenas com a suspensão celular carbonatada. Para que a carbonatação ocorra a contento, o meio de cultura deve chegar no ponto de injeção de gás de propulsão na base do RCT como uma solução rica em íons carbonato ($CO_3^{=}$) que são transformados em íons bicarbonato (HCO_3^{-}) durante a absorção de CO_2 pela conhecida reação química de carbonatação $CO_3^{=} + H_2O + CO_2 = 2HCO_3^{-}$. A carbonatação do meio ocorre naturalmente com o crescimento das microalgas. Em termos de pH, o meio chegaria ao ponto de injeção de gás com pH 9,5-10. Neste ponto, ar comprimido é misturado ao CO_2 na proporção adequada, havendo em seguida a injeção deste gás na base do *Riser* RCT através de um

injetor dotado de válvula unidirecional. A taxa de injeção de CO_2 é definida pelo sistema automático citado anteriormente. Este sistema opera com injeção intermitente de CO_2, sendo constituído de uma válvula solenoide ON/OFF (TERMOVAL, 2 vias, NF) situada na linha de CO_2, um controlador lógico programável (CLP - GE-FANUC 90-30), um sensor de pH (eletrodo) e um transmissor de sinal (PH-2000, ACTRON). O sensor e transmissor de pH estão posicionados na entrada do fotobiorreator FBR isto é, ao final do *Riser* RCT logo após o separador SGL no topo da Coluna 1 (Figura 6.1). O acionamento da válvula (válvula aberta) ocorre de acordo com a programação realizada no CLP em linguagem LADDER, desenvolvida no software Profyci Machine Edition. O transmissor de pH envia o sinal medido de pH para o CLP, o qual converte o sinal analógico em digital. De acordo com o valor de pH a válvula é aberta ou não. A abertura da válvula ocorre quando $pH \geq 8,5$, fechando-se quando $pH < 8,5$. O pH é então reduzido ao valor típico da hidrólise de íons bicarbonato, ou seja, em um patamar entre 7,8 e 8,5. A elevação natural do pH de volta à faixa 9,5-10 ocorreria na biofixação por fotossíntese à medida que se reverte a reação anterior através do metabolismo algáceo: $2HCO_3^- = CO_3^= + H_2O + CO_2$ (biofix). Entretanto, o sistema automatizado de injeção de CO_2 foi capaz de manter o pH na faixa 7,3-8,6 de forma praticamente contínua.

Pode-se entender o *Riser* de Carbonatação e Transporte (RCT) como o ponto inicial do movimento de meio de cultura no Sistema de Fotobiorreação. O RCT é um dispositivo vertical cilíndrico transparente – mostrado em parte na Fig.6.7 – consistindo de tubo de vidro boro-silicato com 44,6 mm de diâmetro interno por 12m de comprimento, estendendo-se desde o subsolo até 3,3 m acima do terraço do laboratório. O RCT dispõe em sua base de injetor valvulado de gás (Ar Comprimido + CO_2) que pode ser operado em diversas vazões de Ar e CO_2 definidas por um quadro de válvulas, reguladores de pressão e rotâmetros ligados à rede de ar comprimido do laboratório e a um cilindro de CO_2 liquefeito. A versão atual do sistema de injeção de CO_2 é automatizada com controle de pH, como descrito anteriormente.

O papel do RCT é gerar movimento ascensional do meio de cultura por tecnologia *air-lift*. Esta movimentação faz com que todo o Sistema de Fotobiorreação opere em fluxo estável sem necessidade de qualquer outra fonte de energia mecânica. Ao longo da ascensão a dispersão das fases e o tempo de residência no RCT promovem Carbonatação do meio de cultura através da conversão química: $CO_2(g) + CO_3^= + H_2O$

= $2HCO_3^-$. O meio carbonatado é separado do gás no Separador SGL acessando o Fotobiorreator (FBR) em velocidade laminar e alto tempo de residência durante o qual a população algal converte meio carbonatado em O_2 + biofixação via fotossíntese.

O Separador Gás-Líquido SGL (Fig. 6.3) é um cilindro horizontal de vidro boro-silicato com 100 mm de diâmetro e 750 mm de comprimento dotado de uma saída inferior de 50 mm de diâmetro para líquido e de duas saídas superiores de 50 mm de diâmetro para gás. Sua função é oferecer um ambiente transparente com velocidade reduzida para que ocorra a separação natural de fases gás e líquida ao final do RCT. A transparência do SGL permite que ele também seja reativo, ajudando a aumentar a produtividade do sistema. O SGL é o ponto de maior cota vertical do Sistema de Fotobiorreação, de modo que, a partir do SGL, o líquido alimenta, por gravidade, a Coluna 1 do Fotobiorreator (FBR). O gás descartado do SGL acessa um medidor mecânico de volume de gás (Gasômetro de Medição LAO modelo G4, Fig. 6.9) capaz de registrar com incerteza máxima de 1% o volume de gás liberado na atmosfera ao longo do tempo. A tubulação de gás liberado pelo SGL também é dotada de um analisador em linha para registrar o teor de CO_2 do gás exausto. O retorno de líquido do SGL para a Coluna 1 de FBR ocorre através de um sifão em U com 120 cm de comprimento vertical que funciona como selo líquido para impedir a entrada de gás no FBR e obrigar todo o gás no SGL a seguir para o Gasômetro de Medição.

O Fotobiorreator (FBR) – Figuras 6.2, 6.3, 6.4, 6.5 e 6.6 – é um sistema semifechado, sob pressão atmosférica, situado no terraço do Lab. H2CIN, dotado de tubos cilíndricos horizontais de vidro boro-silicato de 3 m de comprimento e 44,6 mm de diâmetro dispostos paralelamente em Feixes Planares Verticais (*fences*). São 04 Feixes, cada um com 10 tubos horizontais equi-espaçados, unidos a 04 Colunas (numeradas 1, 2, 3 e 4) de acrílico com 3 m de altura e seções cilíndricas com 18 cm de diâmetro interno. A Coluna 1 é a porta de entrada de meio de cultura no sistema, sendo as Colunas 2 e 3 intermediárias e a Coluna 4 a correspondente de saída. Desta forma, tem-se um módulo de fotobiorreação correspondendo a uma estrutura quadrada com 3,5 m de lado por 3 m de altura (Figura 6.1). A conectividade dos Feixes de tubos de vidro com as Colunas é a seguinte:

- **Feixe 12** : Conecta a Coluna 1 à Coluna 2 com orientação Sul-Norte;

- **Feixe 13** : Conecta a Coluna 1 à Coluna 3 com orientação Leste-Oeste;
- **Feixe 24** : Conecta a Coluna 2 à Coluna 4 com orientação Leste-Oeste;
- **Feixe 34** : Conecta a Coluna 3 à Coluna 4 com orientação Sul-Norte.

Como pode ser visto pela distribuição de feixes de tubos de reação, a disposição do quadrado do FBR (Figura. 6.1) é tal que suas arestas são paralelas às arestas do prédio do Lab. H2CIN que são, por sua vez, paralelas aos Eixos Cardeais Norte-Sul e Leste-Oeste. Assim, o trajeto solar no Verão percorre o quadrado do FBR ao longo do Eixo Leste-Oeste diretamente acima de sua linha central, portanto com mínimo sombreamento nos feixes de tubos de reação (Figura 6.1). No Inverno, o trajeto solar mantém-se Leste-Oeste, porém tombado para Norte acarretando um leve sombreamento do Feixe 24 sobre o Feixe 13.

O FBR é o principal componente reativo sendo chamado de Coletor Solar, pois é praticamente 100% transparente e está exposto ao sol. O FBR é refrigerado, em ocasiões de alta incidência solar, por um sistema automático de aspersão de névoa de água, a qual é capaz de absorver calor dos tubos e colunas por evaporação. O sistema de refrigeração é constituído de 16 bicos, uma bomba d'água, um sensor de temperatura e um controlador de umidade e temperatura. O sensor de temperatura é localizado externamente próximo à Coluna 2 medindo a temperatura no ambiente próximo a 2 m de altura do piso. Este sensor aciona o sistema de resfriamento quando a temperatura está acima de 27°C (*setpoint*). Dois termômetros digitais (Incoterm) foram posicionados no líquido das Colunas 3 e 4, de modo que as temperaturas máxima e mínima são monitoradas e diariamente registradas, bem como a temperatura no instante das medições. Da Coluna 1 o meio de cultura escoa laminarmente pelos tubos horizontais dos Feixes 12 e 13 em direção às Colunas 2 e 3 que são iso-piezométricas. Das Colunas 2 e 3 o líquido segue pelos Feixes 34 e 24 em direção à Coluna 4 que apresenta o menor nível piezométrico do FBR. A hierarquia de níveis piezométricos é tal que Coluna 1 > Coluna 2 = Coluna 3 > Coluna 4. Os topos das colunas são mantidos em pressão atmosférica por *vents* apropriados. O FBR tem um volume útil interno próximo de 470 L. Da Coluna 4 o meio retorna por diferença de *head* piezométrico ao Tanque de Retorno de Líquido (TRL) onde aguarda o transporte de volta à base do RCT e ao SBM. O TRL contém em média 30L de líquido o que resulta em um tempo de residência algal de 3 a 8 min. As Figuras 6.2, 6.3, 6.4, 6.5 e 6.6 trazem fotos do Fotobiorreator (FBR).

Algumas destas fotos retratam o FBR na sua versão original com colunas de seção quadrada (paralelepípedos).

Figura 6.2: Coluna 1 do Fotobiorreator (FBR) e sua Interligação à Coluna 3.

Figura 6.3: Separador Gás-Líquido (SGL) e o Topo da Coluna 1 do FBR.

Figura 6.4: Tubos de Vidro Boro-Silicato (FBR) e Aspersor de Névoa de Resfriamento

Figura 6.5: Aspersor de Névoa de Resfriamento em Operação

Figura 6.6: Vista de Oeste para Leste do FBR

O Tanque de Retorno de Líquido (TRL) consiste de um cilindro flangeado em acrílico com 84,9L de volume dispondo de 5 conexões 1,5” no topo e uma conexão 1,5” de fundo conectada à Coluna de Retorno de Líquido (CRL) conforme mostrado na Fig. 6.7. O TRL opera sob pressão atmosférica constante, via *vent* em uma das conexões superiores, e com aproximadamente 30L de líquido, oferecendo um tempo de residência algal de 3 min, suficientes para permitir, dependendo da intensidade luminosa no local, alguma conversão adicional de HCO_3^- em biomassa e $CO_3^=$. Ou seja, o TRL é também um ambiente reativo além de ter outros papéis importantes. O TRL está situado no mesmo patamar do FBR e está hidraulicamente conectado à CRL, a qual leva o líquido de volta ao SBM e ao ponto de injeção de gás na base do RCT. O TRL tem três ou quatro funções importantes no processo:

- Sua transparência, volume e instalação no *solarium* do Lab. H2CIN, permitem que funcione como um pequeno fotobiorreator de mistura, sob baixas intensidades luminosas e de fluxo térmico solar, servindo, portanto, de aclimatador algal e de auxiliar de bio-conversão;

- Em segundo lugar, o TRL é um recurso conveniente para medições e amostragens diversas de variáveis recém-saída do FBR (como pH, temperatura, concentração algal, concentrações O_2, HCO_3^- , $CO_3^=$ e nutrientes), bem como para recompor o quadro de ingredientes diversos (*make-up*) do sistema, tais como nutrientes, sais e inóculo. As diversas conexões de 1,5" no topo do TRL e tem sido utilizadas para introdução de nutrientes, água de reposição, sal sintético e inóculo quando necessário. O inóculo inicial é alimentado no TRL, sendo originário dos *carboys* com biomassa pré-condicionada. Para isto o TRL dispõe de entrada de ar comprimido para prover agitação e aeração quando da adição de misturas líquidas ao sistema;
- Em terceiro lugar, o TRL tem um papel hidráulico importante na operação *air-lift* ao fornecer uma fonte de *head* estável à base do RCT, pois está hidraulicamente conectado à coluna CRL, mantendo-a constantemente inundada, a qual, por sua vez, conecta-se ao ponto de injeção de gás na base do RCT;
- Por fim, o TRL opera com no mínimo 50% de espaço livre permitindo o *derrame em cascata* de meio algal vindo do FBR. Como dispõe de *vent* superior aberto, tal cascata ajuda a desaerar o meio, permitindo a expulsão de O_2 da fotossíntese.

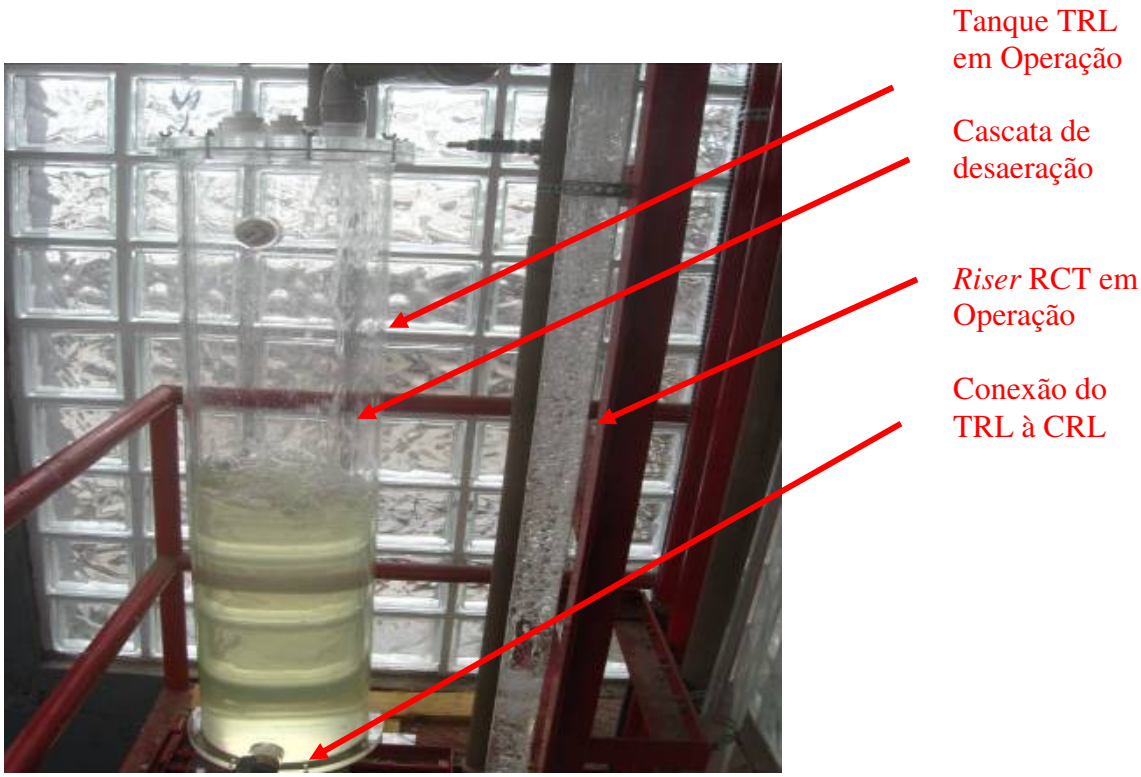


Figura 6.7: Tanque de Retorno de Líquido (TRL) no *solarium* do Lab. H2CIN.

A Coluna de Retorno de Líquido (CRL) tem a mesma configuração e bitola do RCT sendo também de vidro boro-silicato transparente. A CRL dispõe de *vent* atmosférico em seu topo, permitindo o retorno de líquido do TRL, por gravidade, sem gás algum, de volta à base do RCT e ao sistema de Separação de Biomassa (SBM) situado no subsolo do laboratório. A transparência da CRL agrega algum potencial reativo ao processo (pois o ambiente interno do Lab. H2CIN tem certo nível de luminosidade natural devido a suas paredes e teto solares) e também permite inspecionar-se o regime de escoamento de modo a certificar-se que não há gás (bolhas) acompanhando o líquido. O papel hidráulico da CRL é transmitir *head* estável gerado pelo TRL à base do RCT, permitindo que o RCT opere estável com baixo consumo de ar comprimido. O *head* do TRL (quase 1 bar manométrico) mantém os dutos pressurizados no subsolo do laboratório facilitando a admissão de meio algal na planta de Separação de Biomassa (SBM).

As dimensões da planta piloto encontram-se nas Tabelas 6.1 e 6.2.

Tabela 6.1: Volumes da Planta Piloto de Biorreação

Volume da planta (L)	
Colunas de acrílico	**305,20**
Tubos de vidro	**187,38**
Total do "ring"	**492,58**
Tubos de descida e subida	**31,23**
Tanque de retorno de líquido (TRL)	**84,93**
Tubos de PVC e conexões	**62,46**
Total da planta	**671,20**

Tabela 6.2: Dimensões do Fotobiorreator (FBR)

Dimensões	
Comprimento do tubo (m)	**3,2**
***Footprint* (m^2)**	**16**
Número total de tubos	**40**
Diâmetro do tubo (cm)	**4,46**
Comprimento de cada coluna (m)	**3**
Diâmetro interno da coluna (cm)	**18**

Por fim, a planta de Separação de Biomassa (SBM) é responsável pela separação física da biomassa algal de uma fração da corrente de líquido proveniente da CRL. Em outras palavras, apenas uma certa fração do meio algal circulante da CRL deve ser encaminhado a área de separação de biomassa. Desta forma mantém-se o processo auto-sustentável igualando-se a taxa de separação de biomassa com a taxa de produção total do sistema. Na SBM, há rotâmetros de líquido e válvulas adequadas para operar-se corretamente o desvio de líquido circulante que não deverá ingressar na separação.

Na realidade, a separação de biomassa envolve pelo menos duas operações em sequência, a saber: (i) Floculação de Biomassa; (ii) Filtração de Flocos de Biomassa. O Sistema de Fotobiorreação aqui apresentado propõe separação baseada na utilização de um filtro-prensa industrial. Todavia a alternativa de floculação ainda está sendo estudada. Um trabalho de mestrado está sendo realizado testando diferentes agentes físicos e químicos de floculação, tais como temperatura, pH e irradiância direcionada. Em essência, estamos procurando uma alternativa aos métodos mais simples (porém dispendiosos, invasivos e geradores de resíduos) associados à Floculação por Agente Químico (i.e. adição de bases, ácidos e íons metálicos).

O cálculo da fração de meio algal que deve ser enviado à separação por passe, pode ser exemplificado admitindo-se os seguintes plausíveis dados de operação em *steady state* do Sistema de Fotobiorreação:

- Volume reativo total (FBR+TRL+CRL+SGL+RCT) da ordem de 600L;
- Dia solar de 12 h;
- Tempo de residência de líquido no FBR de 1 h, o que corresponde a uma taxa de circulação de líquido de 600/1 = 600 L/h;
- Concentração algal de 1 g/L;

A partir disto, admitindo-se uma concentração de 1g/L, calculam-se:

- A Produção Horária de Biomassa = 600L x 1.0/12 = 50 g/h;
- A Taxa de Líquido a Filtrar = (50g/h) / (1g/L) = 50 L/h;
- Por fim a Fração de Filtração de Líquido por Passe = 50/600 = 8,3%

O filtro-prensa da SBM (Figura 6.8) foi conectado ao processo de modo a permitir que todo o filtrado desprovido de algas (porém de alto valor, posto que rico em nutrientes e sais) resultante da fração de líquido circulante sob filtração, não seja perdido e possa ser adicionado ao líquido circulante não filtrado. Esta mistura acontece próximo ao ponto de injeção de gás no RCT. O líquido filtrado e sem algas da SBM é direcionado à base do RCT via bomba acionada por ar comprimido existente no mesmo filtro-prensa.

Neste sentido, as saídas de líquido dos quadros, onde se encontra o elemento filtrante, estão diretamente ligadas à corrente de líquido circulante não filtrada. Entretanto, há uma possível perda associada ao líquido que vaza pela vedação insuficiente dos quadros, caindo na calha localizada abaixo dos mesmos, cuja função é recolher tais derrames de filtrado. Este filtrado vazado, típico de filtros-prensa operando com suspensões de baixa concentração (como no presente caso) é estimado em 5% de todo o filtrado processado. A separação da biomassa utilizando o filtro prensa não foi realizada no presente trabalho, pois a concentração de biomassa não alcançou o valor mínimo de 1 g/L para que a operação em modo contínuo fosse iniciada.

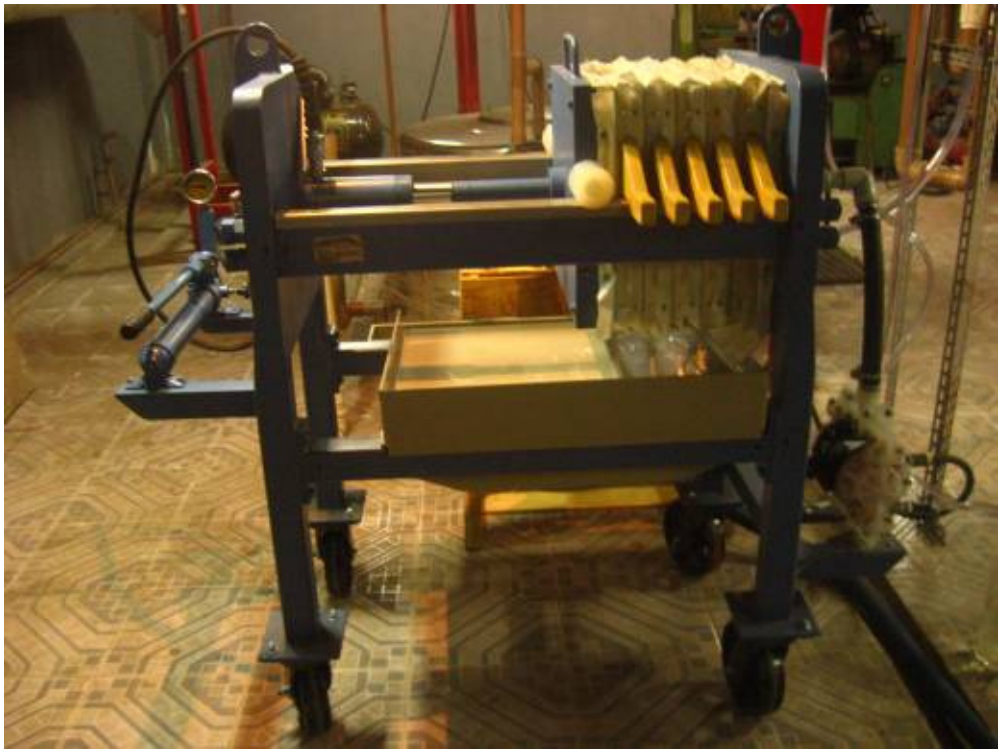


Figura 6.8: Filtro-Prensa da Planta de Separação de Biomassa (SBM).

Figura 6.9: Gasômetro de Medição de Gás Exausto do SGL

6.2 CALIBRAÇÃO E CURVAS OPERACIONAIS DO SISTEMA DE FOTOBIORREAÇÃO

Buscando-se definir as vazões de trabalho de ar comprimido e a taxa de circulação de líquido, foram conduzidos testes preliminares de escoamento utilizando-se água da rede pública e ar comprimido não carbonatado para explorar curvas operacionais do processo. Na versão atual da planta, existem basicamente três sensores de vazões disponíveis cujas leituras devem ser correlacionadas antes de definir-se o ponto operacional do sistema:

- Rotâmetro 1 de Ar, situado na base do RCT, marca APPLITECH, modelo AP-300T, calibrado em P=1bar, T=20°C, Faixa de Leitura 500-5000L/h Erro Médio ≈ 1-2% da leitura se usado na faixa de calibração [***Pressão de Serviço: 2 a 3 bar, Temperatura de Serviço : 20°C***];
- Rotâmetro 2 de Água, situado após SBM na base do RCT, marca APPLITECH, modelo AP1300SS, calibrado em P=1-5 bar, 20°C, Faixa de Leitura 40-1300L/h, Erro Médio ≈ 1-2% da leitura se usado na faixa de calibração [***Pressão de Serviço: 2 a 3 bar, Temperatura de Serviço : 20°C***];
- Gasômetro de Medição de Gás Exausto, LAO, modelo G4 (Fig. 6.9), calibrado em P=1atm, 25°C, Leitura em m^3 de gás circulado

Erro Médio ≈ 1-2% da leitura se usado na faixa de calibração [***Pressão de Serviço: 1 atm, Temperatura de Serviço : 25°C***].

Os objetivos destes experimentos foram:

- Obter a Curva de Operação *air-lift* em termos de L/h de água circulada (leitura no Rotâmetro 2 de Água) versus L/h de ar comprimido injetado (leitura no Rotâmetro 1 de Ar);
- Obter a Curva de Calibração do Rotâmetro 1 em termos de NL/h reais de ar utilizado (a partir de leitura do Gasômetro de Medição) versus L/h de ar comprimido injetado (leitura no Rotâmetro 1 de Ar).

A vazão de ar (L/h) injetado na base do RCT foi controlada através do Rotâmetro 1 de ar. Para cada valor de vazão de ar injetado na base do RCT, foi feita leitura da vazão de líquido obtida através do Rotâmetro 2. Em seguida, a taxa real de ar utilizado no ponto de injeção na base do RCT foi verificada no Gasômetro de Medição de gás exausto instalado após o SGL. Estas medidas de volume liberado foram realizadas em intervalos de tempo de 10 min a fim de calcular-se a real vazão de ar utilizada na injeção, já que o valor em L/h no Rotâmetro 1 não corresponde à realidade, posto que tal Rotâmetro 1 foi calibrado pelo fabricante a 1 atm, mas está sendo utilizado em pressão de 2,5 a 3,0 bar (abs) correspondentes à condição na base do RCT. Por fim, a vazão real de ar utilizado foi convertida de L/h para NL/h (normal litro por hora) considerando-se as condições normais padronizadas (0°C, 1atm). A Tabela 6.3 apresenta os dados experimentais.

Tabela 6.3: Dados Coletados no Teste de Escoamento da Planta Piloto

Tempo (min)	Vazão Ar (L/h)	Vazão Liquido (L/h)	Gasômetro V_{ar} real (m^3)	P_{abs} do ar na base do RCT (bar, abs)	T (ºC)
0	500	400	86,07	2,7	20
10	550	500	86,239	2,7	20
20	500	450	86,391	2,7	20
0	700	600	48,102	2,4	19
10	600	500	48,302	2,4	19
20	750	700	48,489	2,4	19
0	1000	1050	49,827	2,2	19
10	900	1100	50,084	2,3	19
20	750	900	50,264	2,4	19
0	1100	1200	86,575	2,7	20
10	1100	1200	86,839	2,7	20
20	1100	1200	87,101	2,7	20
0	1250	1200	47,433	2,4	19
12	1120	1120	47,745	2,4	19
20	1100	1100	47,985	2,4	19
0	1500	1500	103,28	2,9	20
10	1500	1600	103,625	2,9	20
20	1450	1450	103,967	2,9	20
30	1450	1450	104,312	2,9	
0	1700	1600	85,1	2,5	20
10	1850	1650	85,492	2,5	20
20	1800	1650	85,885	2,5	20
0	2000	1650	51,959	2,3	19
10	2200	1750	52,448	2,4	19
20	1700	1550	52,871	2,2	19

Os dados da Tabela 6.3 foram usados para ajustar, via Mínimos Quadrados, as curvas seguintes, permitindo correlacionar as várias leituras:

- Y = L/h de Água no Rotâmetro 2 versus X = L/h de Ar lido no Rotâmetro 1,

$$Y = -34.5556.\sqrt{X} + 2.6748.X - 0.00052687.X^2 \qquad (6.1)$$

- Y = NL/h de Ar utilizado versus X = L/h de Ar lido no Rotâmetro 1,

$$Y = 278.6916 + 1.1171.X \qquad (6.2)$$

Estas funções ajustadas e os respectivos pontos experimentais foram lançados nas Figuras 6.10 e 6.11. A Figura 6.10 apresenta o ajuste correlacionando a Vazão de Água (L/h) no Rotâmetro 2 *versus* Vazão de Ar (L/h) no Rotâmetro 1, Equação (6.1), com pontos experimentais como círculos. Na Figura 6.11, tem-se o ajuste correlacionando a Taxa Real de Ar (NL/h) utilizado no RCT versus Taxa de Ar (L/h) informada no Rotâmetro 1, Equação (6.2), também com pontos experimentais como círculos.

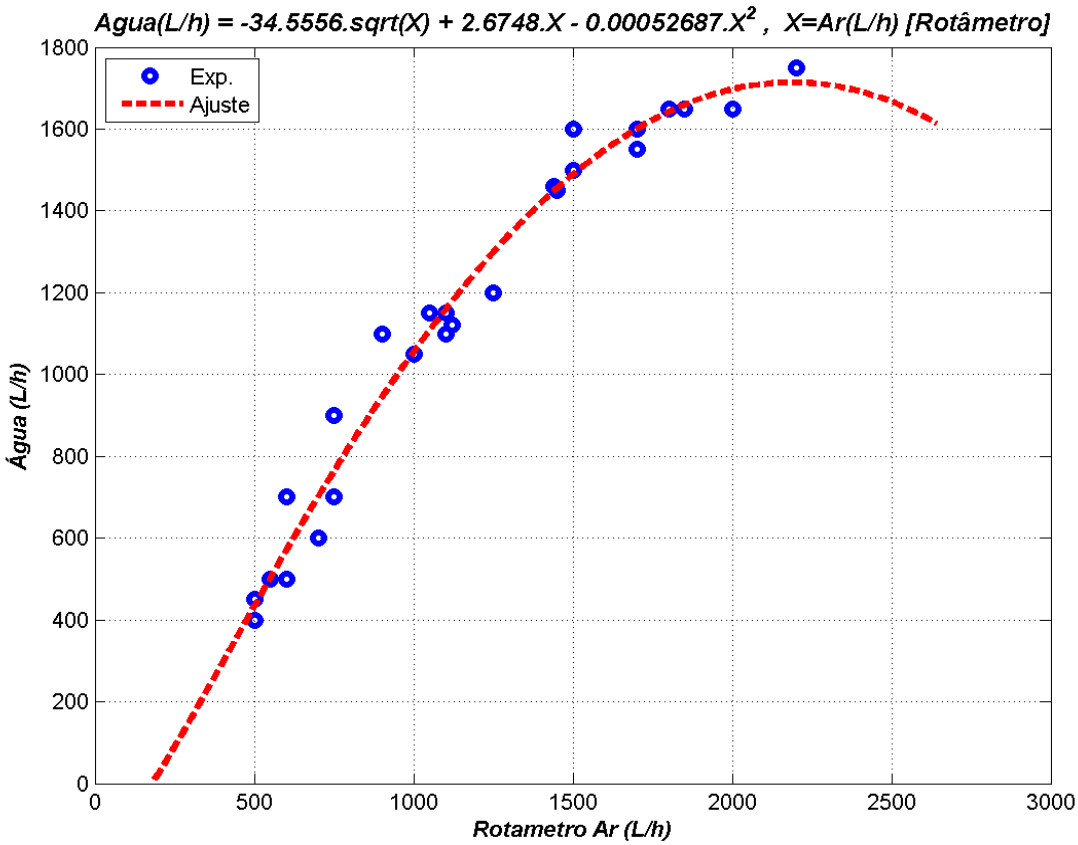


Figura 6.10: Taxa de Líquido (L/h) no Rotâmetro 2 vs Taxa de Ar (L/h) no Rotâmetro 1. Pontos Experimentais: Círculos; Equação Ajustada: linha tracejada.

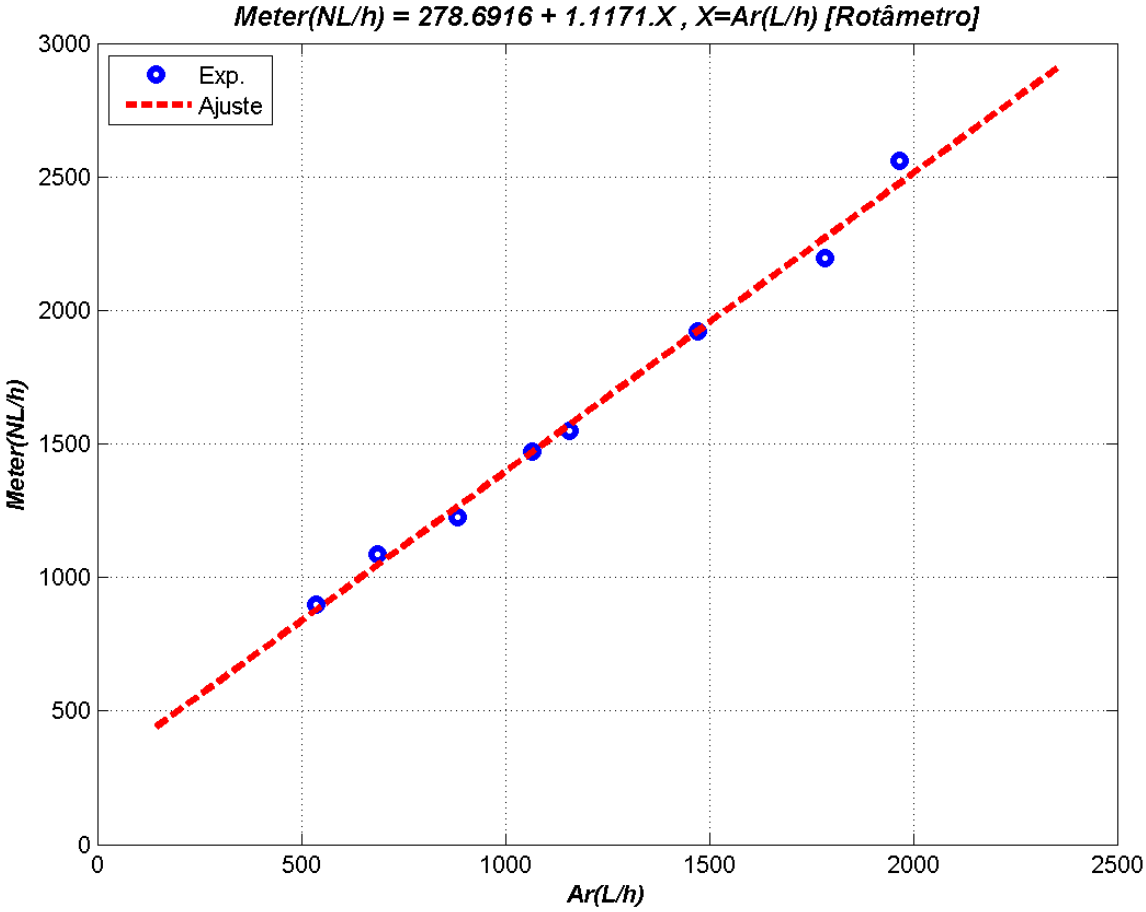


Figura 6.11: Taxa Real de Ar Consumido (NL/h) vs Taxa de Ar (L/h) no Rotâmetro 1. Pontos Experimentais: Círculos; Equação Ajustada: linha tracejada.

A leitura no Rotâmetro 1 de Ar está associada a uma incerteza de 1-2% conforme informado no manual do fabricante. Além desta incerteza agrega-se o fato de que o Rotâmetro 1 foi calibrado em P = 1 atm pelo fabricante, entretanto a pressão absoluta de trabalho está na faixa de 2,5-3,0 bar. Com as leituras no Gasômetro de Medição de Gás, também com incerteza de 1-2 % (dado fornecido pelo fabricante), foi possível calcular-se o valor real da vazão de ar na elevação do líquido e correlacioná-la contra o valor informado no Rotâmetro 1, de acordo com a reta referente à Equação (6.2).

Os ajustes obtidos anteriormente permitiram definir a condição operacional da vazão de ar no Rotâmetro 1 um pouco abaixo de 500 L/h. Pela Figura 6.11, isto corresponde a aproximadamente 350-400 L/h de ascensão de líquido implicando em tempo de residência no FBR (com volume interno próximo de 500L) de

aproximadamente 1 h. Vazões menores de ar dependerão da aquisição de instrumento adequado para medição em faixas menores. A Equação (6.1) também permite estimar a vazão mínima de ar necessária para colocar o líquido em movimento. Isto corresponde (ver Figura 6.10) a um valor próximo de 200 L/h de ar no Rotâmetro 1. Portanto, deve-se operar o RCT com pelo menos 200 L/h de ar na escala do Rotâmetro 1.

CAPÍTULO 7 - CULTIVO *OUTDOOR* DE *I. galbana* NO FOTOBIORREATOR PILOTO

Neste capítulo, são apresentados o procedimento e resultados para duas bateladas realizadas na planta piloto. A primeira batelada teve início em 12/07/2011 (Fotobio 12/07) e a duração de 52 dias, a segunda batelada teve início em 08/11/2011 (Fotobio 08/11) e a duração de 37 dias. A partida do Sistema de Fotobiorreação compreendeu as etapas descritas a seguir.

7.1 PROCEDIMENTO DE PARTIDA DO SISTEMA DE FOTOBIORREAÇÃO

7.1.1 SALINIZAÇÃO E DESINFECÇÃO DA ÁGUA

A água utilizada no sistema foi proveniente da rede pública. Duas caixas d'água de 500 L cada uma (interligadas como em um sistema de vasos comunicantes), localizadas no subsolo, foram preenchidas com água até totalizar aproximadamente 600 L de água, isto é, 300 L em cada caixa. A água fresca foi salinizada com sal marinho sintético (PRODAC Ocean Fish) utilizado em aquários e desinfectada com cloro comercial (solução de hipoclorito 2,35%), sendo adicionados 2 mL e 33 g de sal sintético marinho para cada litro de água. Após a salinização e cloração da água, as caixas d'água foram fechadas e mantidas em repouso por 3 dias para a efetiva ação do cloro como agente de desinfecção. Antes de iniciar a ascensão do líquido a salinidade da água foi medida por um refratômetro portátil (Instrutherm, RTS-101ATC) e corrigida quando os valores ficavam abaixo de 30‰ de salinidade. Além do ajuste da salinidade, a água foi neutralizada com tiossulfato de sódio (solução estoque contendo 250g/L de $NaS_2O_3.5H_2O$), na proporção de 1 mL da solução de tiossulfato para cada 4 mL de solução de hipoclorito adicionados. Este procedimento foi adotado na primeira batelada (Fotobio 12/07).

Na segunda batelada (Fotobio 08/11), o meio de cultura utilizado na primeira batelada foi reaproveitado. Todo o conteúdo líquido do fotobiorreator foi armazenado nas caixas d'água e a cloração foi realizada utilizando o mesmo procedimento que na primeira batelada. Entretanto foi verificada a perda de água. Após completar os volumes das caixas até 300 L, as salinidades foram medidas em 23 $g.L^{-1}$ e 15 $g.L^{-1}$. Foi

adicionado sal sintético até a concentração de 25 $g.L^{-1}$ e NaCl (Sal Marinho, Proquímios) foi utilizado para completar a salinidade até a concentração de $33g.L^{-1}$ de sal. Uma nova desinfecção foi realizada com adição de solução de hipoclorito na concentração de 0,5mL/L. A neutralização com solução de tiossulfato de sódio foi realizada como na primeira batelada.

O volume de água nas caixas d'água foi ajustado para um valor um pouco acima de 300 L em cada caixa (entre 320-340 L), já que o líquido no fundo das mesmas (uma camada de aproximadamente 5cm relativa ao fundo) não pode ser drenado. Este fator é importante quando se reaproveita o meio de cultura, pois com a cloração, a biomassa morta é decantada formando um lodo no fundo o que possibilita a reutilização do meio.

7.1.2 PREENCHIMENTO DA PLANTA PILOTO COM A ÁGUA SALINIZADA E DESINFECTADA

Com a água salinizada e desinfectada iniciou-se o preenchimento da planta piloto com o meio líquido. Uma bomba pneumática (NETZSCH) foi utilizada para enviar o líquido até a base do *Riser* RCT que assim poderá ascender o líquido até o FBR. O sistema *air-lift* é acionado para auxiliar no preenchimento do FBR com a água, injetando-se apenas ar comprimido na base do RCT. Quando a altura de líquido no TRL atingir aproximadamente metade do tanque, a bomba pneumática é desligada e o sistema passa a funcionar como um sistema fechado com circulação do meio líquido por *air-lift*. Neste ponto, a salinidade foi novamente verificada e corrigida com NaCl, quando necessário. O pH também foi verificado (pH= 9,0-9,3) após ascensão do meio líquido. Na primeira batelada, o pH foi ajustado com injeção de CO_2 para o valor de 7,7. Na segunda batelada, não houve modificação no pH, isto é, o pH inicial na primeira batelada foi de 7,7 e na segunda batelada 9,0. A água salinizada permaneceu em movimento no fotobiorreator por 24 h antes da adição de nutrientes e inóculo.

7.1.3 ADIÇÃO DO INÓCULO E NUTRIENTES AO FOTOBIORREATOR

Para dar início aos cultivos no fotobiorreator, *carboys* com 6-8 L de cultura de *I. galbana* foram posicionados no terraço do laboratório H2CIN com o objetivo de aclimatar as células principalmente às condições de variação de temperatura. Os *carboys* foram aerados com ar comprimido. Através de lâmina fresca foi observado o

nível de contaminação e a forma das células de *I. galbana* através da microscopia óptica e apenas as culturas onde as células estavam mais preservadas e com formato próprio da espécie foram utilizadas no inóculo do fotobiorreator. Em ambas as bateladas dois *carboys* foram selecionados para o inóculo inicial. As células e os nutrientes foram adicionados à planta piloto no TRL.

Os cultivos desenvolvidos no fotobiorreator foram realizados em meio F/2 (GUILLARD, 1975), modificado conforme disposto na Tabela 7.1. Inicialmente os nutrientes foram adicionados à água esterilizada em autoclave, apenas no momento da adição ao fotobiorreator. As soluções de metais traços e de vitaminas foram preparadas separadamente, sendo esta última filtrada em membrana com poro de 0,22 μm.

A Tabela 7.2 apresenta um resumo das condições iniciais para as duas bateladas (12/7 e 8/11).

Tabela 7.1: Concentrações de nutrientes no fotobiorreator no início dos cultivos considerando volume de diluição inicial = 622 L

Nutrientes (Sais solúveis)	*Concentração no FBR no início da batelada (mg/L)*	*Vitaminas*	*Concentração no FBR no início da batelada (µg/L)*
$NaNO_3$	363,64	Tiamina	385,85
NaH_2PO_4	25,21	Biotina	1,93
$FeCl_3.6H_2O$	15,31	B12	1,93
EDTA	21,30		
$CuSO_4.5H_2O$	0,047		
$ZnSO_4.7H_2O$	0,106		
$CoCl_2.6H_2O$	0,048		
$MnCl_2.4H_2O$	0,868		
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,030		

Tabela 7.2: Condições iniciais dos cultivos *outdoor*

	Batelada 12/07/11	*Batelada 08/11/11*
Salinidade (‰)	30	30
pH	7,7	9,0
Vazão de líquido (rotâmetro, NL/h)	400-600	400-600
Vazão de ar (rotâmetro, NL/h)	700	1300
Vazão de CO_2 (rotâmetro, NL/h)	190	0
Concentração inicial (cel/mL)	6.10^5	$2,7.10^5$

7.1.4 MONITORAMENTO DOS CULTIVOS NO FOTOBIORREATOR PILOTO

Algumas medidas foram realizadas diariamente no sentido de monitorar a cultura no fotobiorreator, tais como: contagem celular, concentração de nitrato no meio, concentração de fosfato no meio, temperatura e pH. Estes parâmetros eram medidos sempre durante a manhã (entre 9:00 e 12:00 h), tanto na entrada quanto na saída do FBR, com exceção da temperatura que era fornecida pelos termômetros localizados nas colunas 3 e 4 do FBR e no umidostato acoplado ao sensor de temperatura localizado externamente na coluna 2.

A partir da injeção de CO_2 foram realizadas titulações para monitorar o carbono inorgânico dissolvido (DIC) no meio de cultura. Amostras da entrada e da saída do FBR foram centrifugadas, sendo o sobrenadante titulado com HCl e a biomassa liofilizada para determinação da análise elementar.

Para análise da composição bioquímica da célula, amostras (entrada e saída) foram coletadas ao longo de dois dias de cultivo em três diferentes horários, às 10:00, 13:00 e 18:00 h. A cultura foi submetida à análise em citômetro de fluxo, enquanto a biomassa do centrifugado foi liofilizada para análise de composição bioquímica pelos métodos descritos no capítulo 4 do presente trabalho.

A eficiência fotossintética também foi verificada através dos parâmetros de fluorescência. No 35° dia de cultivo da segunda batelada, amostras (entrada e saída) foram coletadas às 10:00, 13:00 e 18:00 h, para análise de fluorescência e determinação da eficiência fotossintética. A análise de composição bioquímica da célula e as medidas de eficiência fotossintética foram realizadas apenas na segunda batelada (08/11).

A Figura 7.1 apresenta um resumo do monitoramento realizado no FBR na segunda batelada.

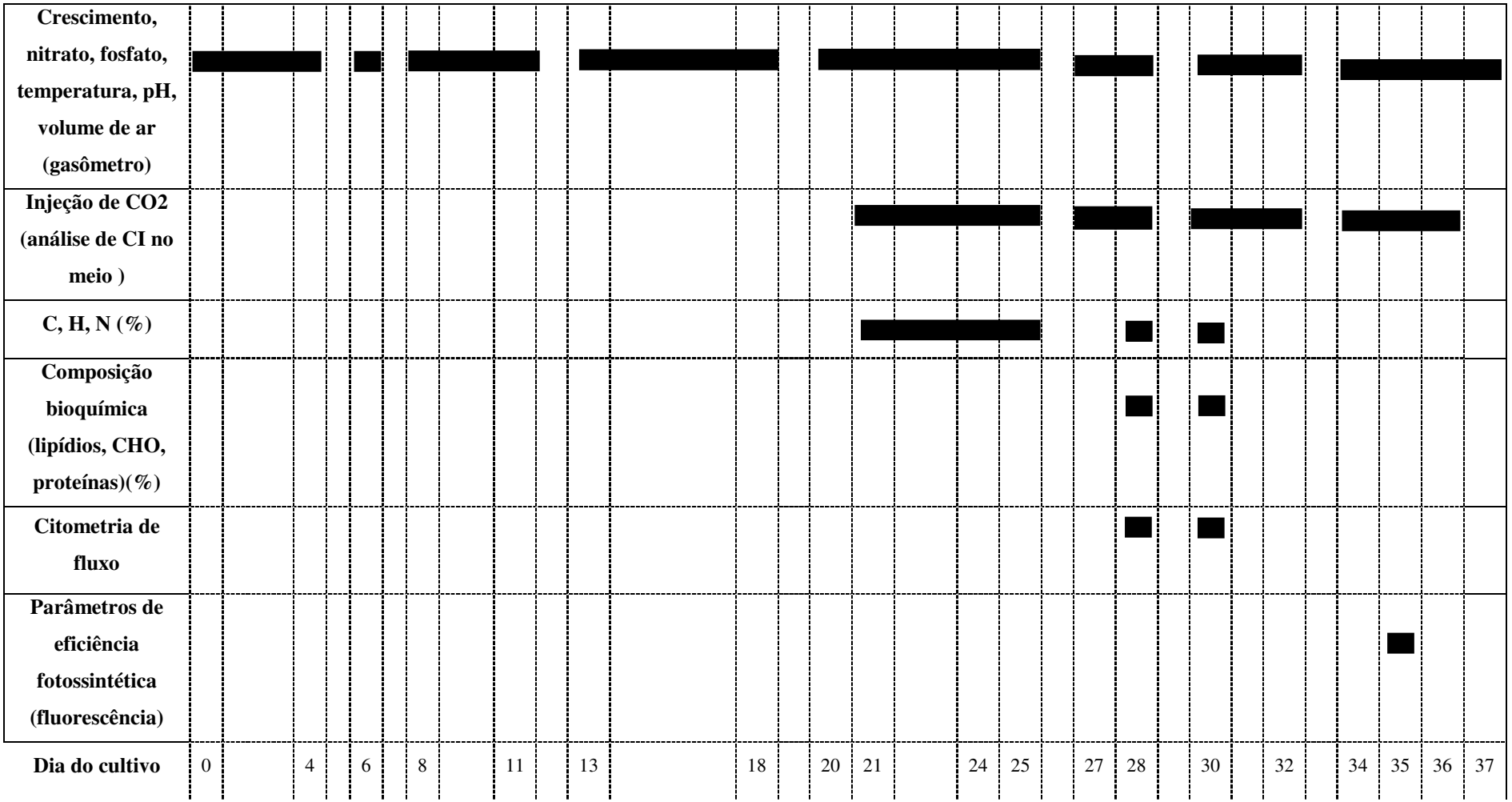
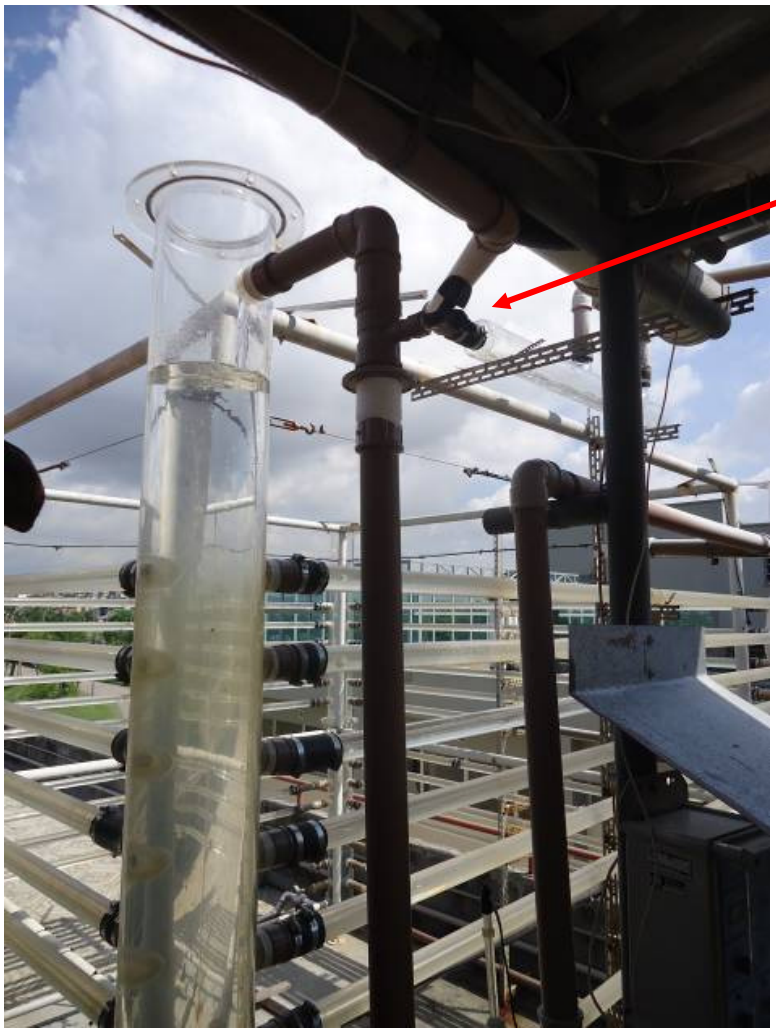


Figura 7.1: Monitoramento da segunda batelada.

7.2 RESULTADOS DOS CULTIVOS NO FOTOBIORREATOR PILOTO

Os resultados apresentados nesta secção foram obtidos em duas bateladas realizadas na planta piloto em cultivo *outdoor*. A primeira batelada teve início em 12/07/2011, e o cultivo foi realizado por 52 dias. A segunda batelada teve início em 08/11/2011 com duração de 37 dias. Todas as amostras foram coletadas na entrada e na saída do FBR (Figura 7.2), isto é, na entrada do FBR no topo da Coluna 1 e na Saída do FBR no fundo da Coluna 4.

.



(a)

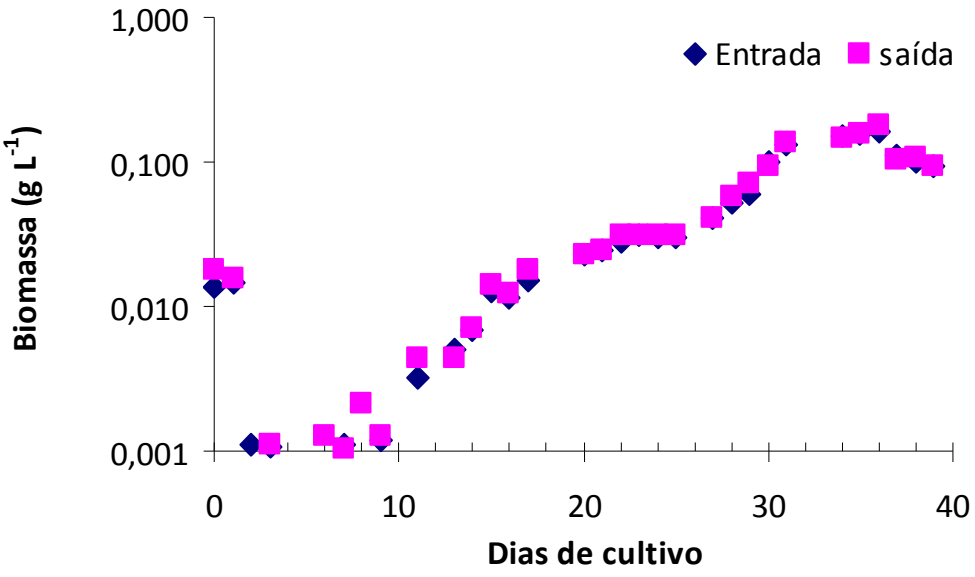
(b)

Ponto de amostragem-
SAÍDA

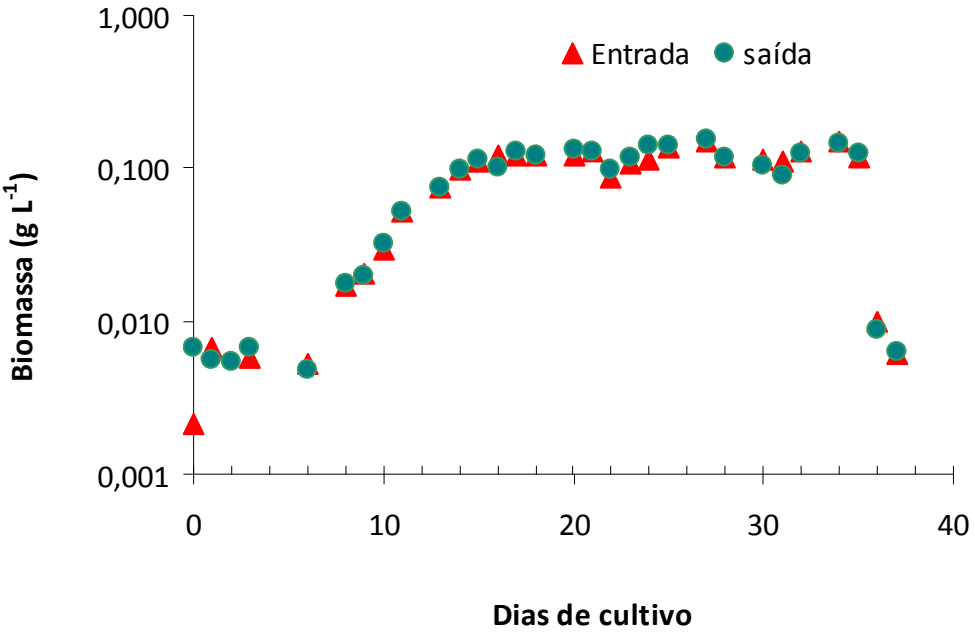
Figura 7.2: Pontos de amostragem no Fotobiorreator
(a) Entrada, (b) Saída.

O crescimento da microalga *Isochrysis galbana* no fotobiorreator *outdoor* foi acompanhado em ambas as bateladas e as curvas são apresentadas na Figura 7.3. Na primeira batelada (Figura 7.3a) a densidade inicial foi de 6.10^5 cel.mL^{-1}, mas no segundo dia do cultivo a concentração celular era de 4.10^4 cel.mL^{-1}, permanecendo esta densidade celular até o 9° dia do cultivo, apresentando assim uma fase *lag* (adaptação celular). As células, então adaptadas, iniciaram crescimento exponencial com taxa específica de crescimento (μ) de 0,33 d^{-1} que perdurou até o 20° dia, quando o cultivo entrou em fase estacionária, com a concentração celular de $1,2.10^6$ cel.mL^{-1}. No 29° dia do cultivo iniciou-se aeração com enriquecimento em CO_2 (cerca de 4,65% de CO_2 no ar v/v), resultando no reestabelecimento do crescimento, com uma taxa específica de 0,39 d^{-1}. Uma nova fase estacionária foi iniciada no 31° dia do cultivo, e uma reposição de fosfato foi realizada no 34° dia. Entretanto, a partir do 37° dia as células entram em uma fase de morte ocasionada por contaminação. A concentração máxima de células foi

de $6{,}9.10^6$ cel.mL^{-1}, alcançada no 36° dia do cultivo, o que corresponde a 0,177 g.L^{-1} em biomassa.



(a)



(b)

Figura 7.3: Curva de crescimento de *I. galbana* em cultivo batelada *outdoor*, (a) batelada 12/07, (b) batelada 08/11. Entrada e Saída correspondem aos pontos de amostragem no fotobiorreator (Figura 7.2).

Na segunda batelada (Figura 7.3b) a densidade do inóculo foi de 2,7 . 10^5 cel mL^{-1}, e no 4° dia do cultivo a densidade celular foi correspondente a $1,15.10^5$ cel.mL^{-1}. A partir do 6º dia, o cultivo entrou em fase exponencial de crescimento, com uma taxa específica de 0,45 d^{-1}. Este cultivo apresentou uma fase de adaptação com pequena queda na concentração celular e a fase *lag* foi reduzida em relação ao primeiro cultivo (6 dias). A fase estacionária iniciou-se no 14° dia do cultivo, e a injeção de CO_2 no 21° dia do cultivo. Nesta segunda batelada a injeção de CO_2 foi automatizada, isto é, uma válvula ON/OFF posicionada após o cilindro de CO_2 era atuada conforme a programação de controle, sendo a variável monitorada o pH e quando o valor era $\geq 8,5$ a válvula era aberta. Outra característica desta batelada é que as células não apresentaram um aumento na taxa de crescimento após injeção de CO_2 como na primeira batelada, permanecendo em uma concentração entre 5.10^6 e 6.10^6 cel.mL^{-1}. Entre o 35° e o 36° dia do cultivo a concentração celular teve uma queda alcançando 4.10^5 cel.mL^{-1}. A morte celular ocorreu rapidamente, em 24 h aproximadamente 90% das células morreram devido à contaminação do cultivo. Na segunda batelada a concentração celular máxima foi de $6,2.10^6$ cel.mL^{-1}, correspondente a 0,156 g.L^{-1}.

Enquanto as taxas de crescimento da primeira e da segunda batelada foram semelhantes, provavelmente a diminuição da fase de adaptação (fase Lag) observada na 2ª batelada foi devido ao maior período de adaptação do cultivo utilizado como inóculo, pois, neste caso, os *carboys* contendo o inóculo foram mantidos no terraço. Entretanto, na parte interna do prédio (Figura 7.4), por dois meses com diluição e adição de meio fresco a cada duas semanas aproximadamente. A temperatura máxima alcançada no carboy foi de 40° C e, ao que parece, a adaptação celular às condições de variação de temperatura foi importante para diminuir o período de adaptação celular no Fotobiorreator. Provavelmente, a eliminação da fase *lag* seria apenas alcançada com uma adaptação a todas as novas condições de cultivo, tais como: temperatura, irradiância e variação da velocidade do fluxo, que é turbulento no *riser* e laminar no FBR. VAN BERGEIJK *et al.* (2010) descrevem a ocorrência de fase Lag no cultivo outdoor de *I. aff. galbana*. Estes autores utilizaram uma proteção sobre a cultura, constituída por várias camadas de uma rede conhecida como *sombrite* para diminuir a alta irradiância no cultivo *outdoor*. Quando a razão entre a irradiância e a densidade celular estava acima de 1,5 uma camada de *sombrite* era removida e a cultura sofria uma

fase Lag ou colapsava, sendo que as culturas que apresentavam crescimento direto (sem adaptação) tiveram razão abaixo de 1,5.

Figura 7.4: Cultivo de *I. galbana* em carboy no terraço do Lab H2CIN.

A taxa específica de crescimento das duas bateladas variou entre valores (0,33 a 0,45 d^{-1}) que se encontram em consonância com os valores reportados (0,38-0,39 d^{-1}) por vários autores para cultivos *outdoor* de *I. galbana* (MOLINA GRIMA *et al.* 1994; ZHU *et al.* 1997; VAN BERGEIJK *et al.* 2010). No presente trabalho em cultivo *indoor* a taxa específica de crescimento foi de 1,1 a 0,96 d^{-1}, valores maiores são comumente obtidos em cultivo *indoor,* como em VAN BERGEIJK *et al.* (2010), que obtiveram 0,91 d^{-1} de taxa de crescimento para *I. galbana* em cultivo *indoor* em reator de 50 L.

A densidade celular máxima foi de 0,156 $g.L^{-1}$ no cultivo *outdoor*, enquanto no cultivo *indoor* a menor densidade celular alcançada foi de 0,29 $g.L^{-1}$ (batelada aerada sem enriquecimento com CO_2). Normalmente, os cultivos *indoor* de microalgas têm maiores produtividades em biomassa, pois trabalham com volumes bem menores, temperatura controlada e baixa e constante irradiância comparada com a luminosidade solar. Quanto à produtividade de *I. galbana* em cultivos *outdoor* em fotobiorreator tubular com volume superior a 200 L, há poucos trabalhos publicados. VAN BERGEIJK *et al.* (2010) cultivaram *T-iso* (*I. aff. galbana*) em reator tubular de 400 L e

descrevem uma produtividade de 0,075 $g.L^{-1}.d^{-1}$. Os autores apontam como possível causa da baixa produtividade a variação das condições do cultivo *outdoor*, sendo necessário o desenvolvimento de um fotobiorreator com controle e maior homogeneidade das variáveis para o cultivo de *T-iso*. Os autores ressaltam o fato de que a espécie *T-iso* não foi taxonomicamente estudada para classificá-la com segurança no gênero *Isochrysis* e que fisiológica e bioquimicamente há diferença entre *I. galbana* e *T-iso*. BOUSSIBA *et al.* (1988) obtiveram uma produtividade de 1,6 $g.L^{-1}.d^{-1}$no cultivo *outdoor* de *T-iso* num fotobiorreator em coluna, entretanto o volume do reator era pequeno (0,8 L) e o inóculo inicial era alto (biomassa > 1 $g.L^{-1}$) para evitar a morte celular por fotoxidação. ZHANG & RICHMOND (2003) relatam uma produtividade de 0,13 $g.L^{-1}.d^{-1}$ para o cultivo de *I. galbana* em reator de placas (V= 350 L), sendo este valor semelhante ao obtido no presente trabalho.

A velocidade do líquido no fotobiorreator é uma variável que também afeta a produtividade. Baixas velocidades de fluxo resultam em células submetidas a maiores períodos em zonas escuras (centro dos tubos e das colunas no FBR). Um escoamento turbulento aumenta a produção de biomassa quando comparado ao escoamento laminar, todavia a velocidade não deve ser elevada (>0,97 $m.\ s^{-1}$) para não causar danos à célula, o que implicaria em menor produtividade (MOLINA GRIMA *et al.* 2001).

As Figuras 7.5 e 7.6 apresentam fotos dos cultivos *outdoor* de *I. galbana* na secção FBR do fotobiorreator piloto. Nestas é possível visualizar o aumento da densidade celular ao longo dos dias de cultivo.

1º dia do cultivo

13º dia do cultivo

20º dia do cultivo

23º dia do cultivo

35º dia do cultivo

43º dia do cultivo

Figura 7.5: Fotobiorreator piloto - primeira batelada.

1º dia do cultivo

8º dia do cultivo

17º dia do cultivo

24º dia do cultivo

28º dia do cultivo

28º dia do cultivo

Figura 7.6: Fotobiorreator piloto - segunda batelada.

(a)

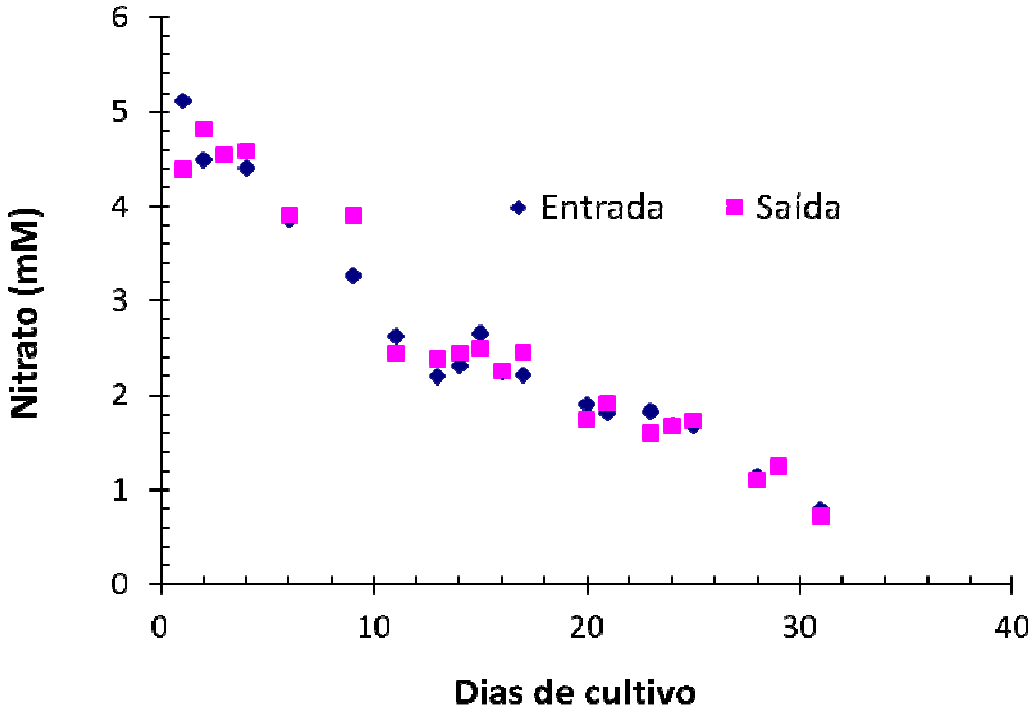
(b)

Figura 7.7: Contaminação em cultivo *outdoor* de *I. galbana* no Fotobiorreator piloto.

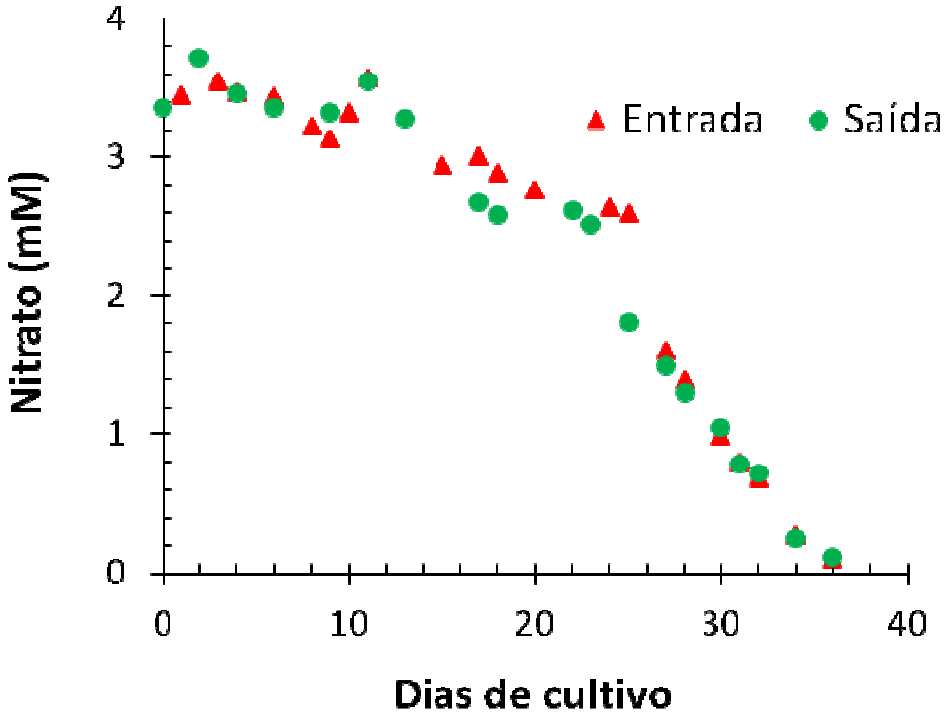
A contaminação ocorreu em ambos os cultivos. Uma das fontes desta contaminação foram os *vents* de topo das colunas, que tinham a função de equilibrar a pressão no sistema, e a entrada de ar não filtrado acarretou, inicialmente, a formação de um anel microbiano no topo das colunas (Figura 7.7a). Com a flutuação da temperatura, que alcançou 41°C, dias estes em que houve paradas anormais do sistema de resfriamento do FBR, o consequente colapso da população de *I. galbana* tornou o interior do FBR propício à proliferação de micro-organismos heterotróficos nutridos pela própria matéria morta de *I. galbana*.

Foram realizados testes para investigar o tipo de contaminação no FBR. Amostras da cultura foram incubadas em meio Agar Simples, Agar Sabouraudi e Agar CZAPEK. A investigação a respeito do tipo de contaminação ocorrida no FBR indicou a presença de uma espécie de levedura de cor rósea, além de bactérias Gram negativo e positivo. O teste não foi objetivo do presente trabalho e teve apenas a intenção de indicar que tipo de contaminação havia na cultura. Outra possível fonte de contaminação é o ar oriundo dos compressores, que mantêm a movimentação da cultura no sistema através da tecnologia *air-lift*. Mais testes devem ser realizados no ar comprimido e na cultura do fotobiorreator para esclarecer as fontes e o tipo de contaminação. Todavia, algumas medidas podem ser tomadas no sentido de minimizar ou mesmo eliminar o problema, como o emprego de filtros microbiológicos na linha de ar comprimido, bem como a utilização de filtros nos *vents* das colunas. Neste caso filtros simples como algodão ou membranas microporosas podem ser utilizados. Um fato importante é que a contaminação através dos *vents* ocorreu nas Colunas 2, 3 e 4 e não na Coluna 1. Provavelmente, como o topo da Coluna 1 é o ponto de entrada de líquido no FBR, a constante chegada de líquido força a saída contínua de ar pelo *vent* de topo, não permitindo contaminação pelo ar externo.

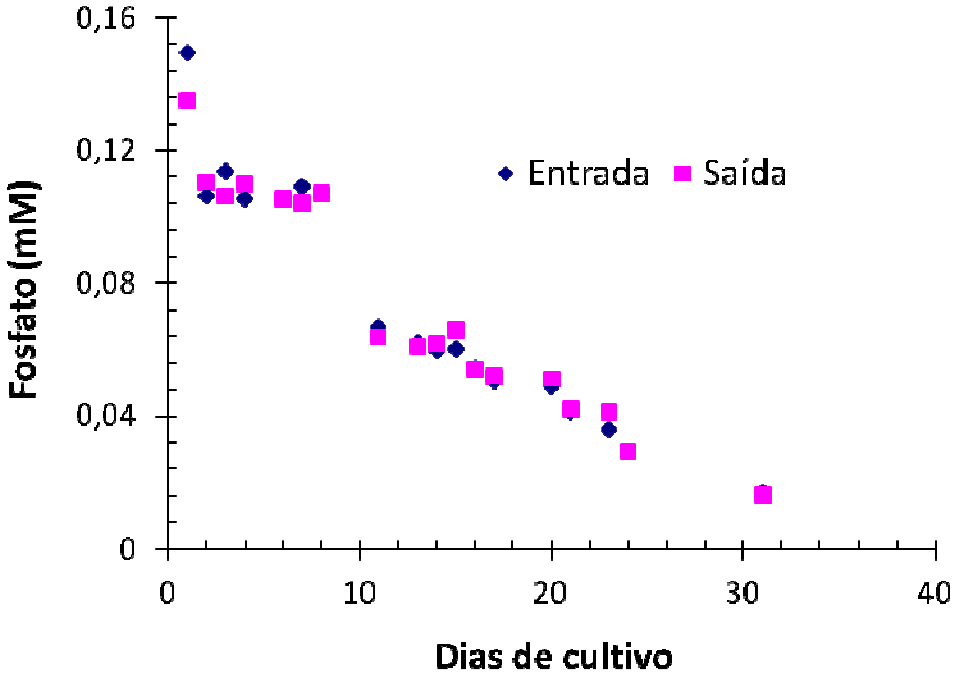
A Figura 7.8 apresenta o perfil de consumo de nitrato (Figura 7.8 a e b) e fosfato (Figura 7.8 c e d) no cultivo *outdoor* de *I. galbana*.


Nitrato (mM)
Dias de cultivo
Entrada
Saída
0
1
2
3
4
5
6
0
10
20
30
40

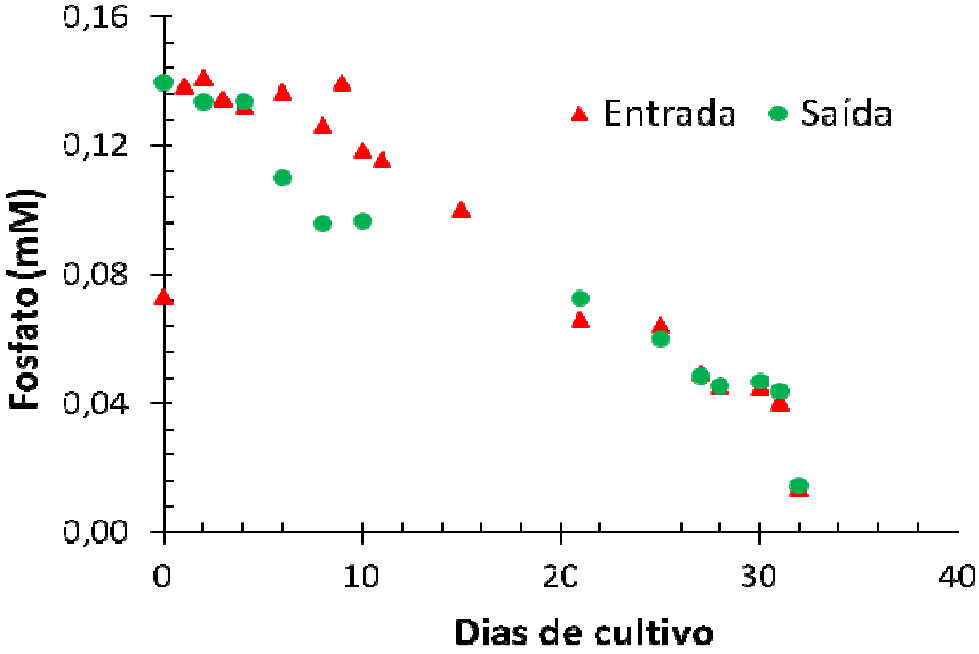
(a)


Nitrato (mM)
Dias de cultivo
Entrada
Saída
0
1
2
3
4
0
10
20
30
40

(b)



(c)



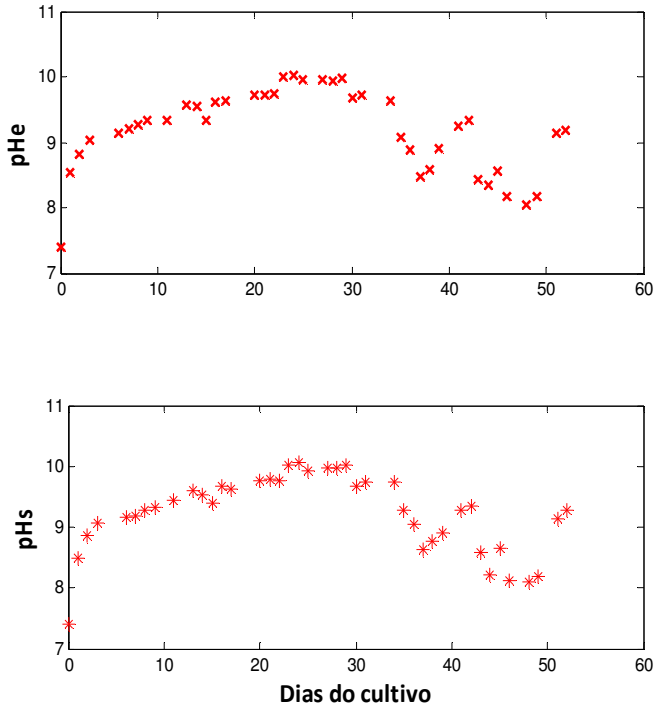
(d)

Figura 7.8: Nitrato residual (a) 12/07 (b) 08/11 e fosfato residual (c) 12/07 (d) 08/11 no meio de cultivo em batelada *outdoor* de *I. galbana.*

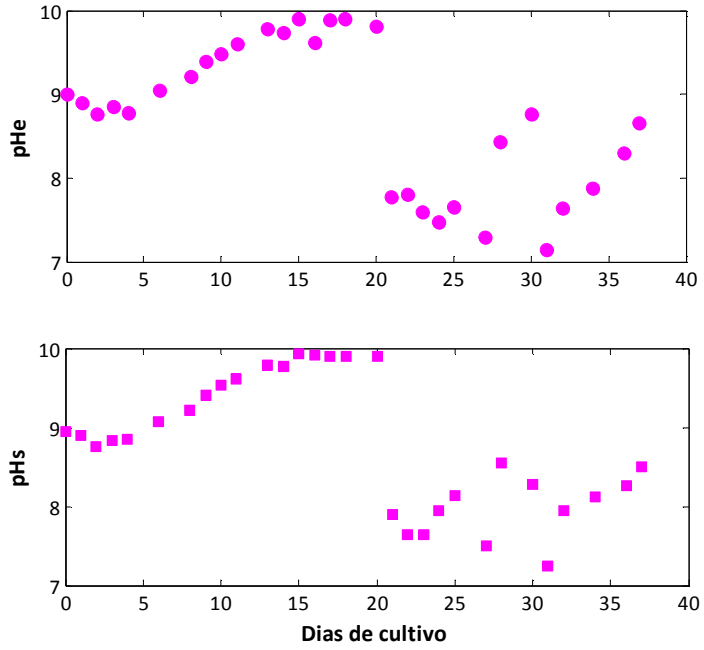
Na primeira batelada, a captação de nitrogênio e fósforo pelas células variou ao longo do cultivo conforme a fase do crescimento. De maneira geral o consumo de nitrogênio e fósforo foi maior na fase exponencial. O consumo de nitrogênio foi de 57 fmol N cel^{-1} d^{-1} na fase exponencial, tendo uma pequena queda para 48 fmol N cel^{-1} d^{-1} na fase estacionária. O consumo de fósforo apresentou o mesmo perfil 5 fmol P cel^{-1} d^{-1} e 1,6 fmol P cel^{-1} d^{-1}, na fase exponencial e estacionária respectivamente. Quando iniciou-se a injeção de CO_2 o consumo de nitrogênio e fósforo foi de 63 fmol N cel^{-1} d^{-1} e 3,5 fmol P cel^{-1} d^{-1}. A disponibilidade de carbono inorgânico no meio aumentou levemente o consumo de N e P. Foi realizada uma reposição de fósforo no 34° dia do cultivo, mas, devido à contaminação, a cultura de *I. galbana* entrou em declínio.

A captação de nitrogênio na segunda batelada apresentou o mesmo perfil, com valores de 50 fmol N cel^{-1} d^{-1} e 28 fmol N cel^{-1} d^{-1}, na fase exponencial e estacionária, respectivamente. A captação de fósforo pelas células na segunda batelada tem uma ligeira queda da fase exponencial para estacionária de 2,0 para 0,8-1,5 fmol P cel^{-1} d^{-1}. Com o enriquecimento de CO_2 a captação de fósforo tem valores na faixa 2,0-3,4 fmol P cel^{-1} d^{-1}, enquanto a captação de nitrogênio aumenta para 209 fmol N cel^{-1} d^{-1}. Em relação à primeira batelada há um aumento na captação de nitrogênio com o enriquecimento em CO_2, enquanto que no consumo de fósforo não há substancial alteração. Entretanto, na segunda batelada a injeção de CO_2 não alterou a taxa de crescimento e as células permaneceram em fase estacionária. MARCHETTI *et al.* (2012) observaram um aumento na captação de nitrogênio de 5 para 70 fmol N cel^{-1} d^{-1} em cultivo de *I. affinis galbana* e na captação de fosfato de 0,3 para 0,8 fmol P cel^{-1} d^{-1} em cultivo com limitação nutricional de nitrogênio e fósforo, respectivamente. Os autores também observaram um declínio na fixação de carbono nestas condições de nutriente limitante, além da relação linear entre a taxa de crescimento e o consumo por célula de nitrogênio e fósforo. MESECK *et al.* (2007) observaram uma menor assimilação de nitrogênio e alta razão C:N no cultivo de *Tetraselmis Chuii* com enriquecimento de CO_2. No presente trabalho o enriquecimento com CO_2 aumentou a assimilação de nitrogênio e fósforo, e a maior disponibilidade de CO_2 no meio na segunda batelada (Figura 7.11) aumentou a assimilação de nitrogênio, o qual foi provavelmente direcionado à reserva devido a alguma condição limitante que a célula encontrou para manter a duplicação celular exponencial.

O pH do cultivo *outdoor* de *I. galbana* foi verificado diariamente na entrada e na saída do FBR. A variação deste parâmetro é apresentada na Figura 7.9 para ambas as bateladas.



(a)



(b)

Figura 7.9: Variação do pH em cultivo batelada *outdoor* de *I. galbana*.
(a) batelada 12/07, (b) batelada 08/11.
(b) pHe = pH na entrada do FBR e pHs = pH na saída do FBR

Antes da adição de inóculo no fotobiorreator na primeira batelada, CO_2 foi injetado para reduzir o pH. O pH foi reduzido de 9,0 para 7,7, e o cilindro de CO_2 foi fechado. No segundo dia, o pH era de 8,5 e seguiu subindo até 9,9-10,0 permanecendo neste valor até o início da injeção de CO_2 no 29° dia de cultivo. Com o início da injeção de CO_2, ocorre uma queda no pH, que passa a variar na faixa de 8,0-9,0. A elevação do pH ocorre no 40° dia de cultivo onde não houve alimentação de CO_2. A seguir, o ar é novamente enriquecido com CO_2 e o pH volta a cair para 8,0. O valor máximo de pH foi 10,0 e o valor mínimo 8,0.

Na segunda batelada, não houve injeção de CO_2 antes da adição de inóculo no fotobiorreator. O pH inicial foi de 9,0, e ao longo dos dias de cultivo prossegue em elevação até alcançar o valor 10,0. No 21° dia de cultivo, inicia-se o enriquecimento de CO_2. O sistema automatizado de injeção de CO_2 é acionado. A partir deste momento, o pH passa a ser controlado via padrão de injeção de CO_2. O cilindro foi fechado por duas vezes às 10:00 h da manhã em dois dias (6 e 8/12/11) para análise do meio de cultura quanto à concentração das espécies de carbono inorgânico (CO_2, HCO_3^-, CO_3^{-2}) com o objetivo de estabelecer a diferença destas concentrações com enriquecimento ou não de CO_2. Nesta segunda batelada, o pH variou na faixa 7,0-10,0, isto é, a injeção de CO_2 foi em maior concentração pois o pH alcançou o valor de 7,0 quando a válvula era aberta.

O valor ótimo de pH para *I. galbana* tem sido relatado na faixa entre 6,0-8,0 (KAPLAN *et al.* 1986; MOLINA GRIMA *et al.* 1994; BOUGARAN *et al.* 2010). Contudo, alguns estudos não têm encontrado influência significativa do pH na densidade celular ou na taxa de crescimento (ABU REZQ *et al.* 1999). KAPLAN *et al.* (1986) investigando as condições ótimas de crescimento de *I. galbana* observaram que não havia uma grande mudança na taxa de crescimento na faixa de pH 5,0 a 9,0, desde que o cultivo não estivesse limitado em Fe^{+3}. Nesta condição limitante, o pH ótimo foi 6,0, e a partir deste valor a taxa de crescimento declinou com o aumento do pH. MARCHETTI *et al.* (2012) verificaram que o pH influencia na taxa de crescimento e o valor para maior produtividade de biomassa de *I. galbana* foi de 6,8. Estes resultados apontam para o fato de que a variável pH tem seu efeito na taxa de crescimento dependente de outras variáveis como a concentração de um nutriente ou a temperatura. Ainda de acordo com os autores, há uma significativa interação entre pH e temperatura e entre pH e irradiância. Eles observaram que para valores de pH acima de 8,0 a

influência da temperatura é reduzida, entretanto para valores de pH menores, isto é, quando há disponibilidade de CO_2 no meio, temperaturas abaixo de 19°C influenciam negativamente na taxa de crescimento, sendo o crescimento celular favorecido em temperaturas mais altas. Neste caso, é importante salientar que quando a literatura se refere a altas temperaturas no cultivo de *I. galbana*, estas se encontram na faixa de 25°C a 32°C (SAOUDI-HELIS *et al.* 1994; ABU REZQ *et al.* 1999; KAPLAN *et al.* 1986). Outra observação importante é que, de forma geral, a faixa de pH em que se tem cultivado *I. galbana*, há uma concentração de CO_2 dissolvido maior, evidenciando a sua afinidade pelo CO_2, como relatado neste trabalho.

A concentração de carbono inorgânico no meio (CI) foi determinada no cultivo *outdoor* de *I. galbana* no fotobiorreator piloto. Na primeira batelada, foram realizadas medidas de CI em três dias do cultivo, em diferentes horários, sendo a primeira amostragem antes do início da injeção de CO_2. Na segunda batelada, as medidas foram realizadas em seis dias do cultivo, e nos últimos dois dias em três horários do dia. O enriquecimento do ar comprimido com CO_2 aumentou a concentração de CO_2 e HCO_3^- dissolvido, e diminuiu a concentração de CO_3^{-2} na entrada e na saída do FBR. Entretanto, a diferença na concentração das espécies de DIC no meio de cultura entre a saída (S) e a entrada (E) do FBR foi negativa para CO_2 e bicarbonato e positiva para carbonato, isto é, as células consumiam o bicarbonato e o CO_2 através do processo da fotossíntese e a concentração de carbonato no meio aumentava como previsto pela equação de equilíbrio:

$$CO_2 + H_2O \overset{k_1}{\leftrightarrow} HCO_3^- + H^+ \overset{k_2}{\leftrightarrow} CO_3^= + 2H^+ \qquad (7.1)$$

O balanço das concentrações das espécies de DIC no meio de cultura no FBR são apresentados nas equações (7.2) a (7.4):

$$\Delta[CO_2] = [CO_2]_S - [CO_2]_E \qquad (7.2)$$

$$\Delta[HCO_3^-] = [HCO_3^-]_S - [HCO_3^-]_E \qquad (7.3)$$

$$\Delta[CO_3^{-2}] = [CO_3^{-2}]_S - [CO_3^{-2}]_E \qquad (7.4)$$

Onde S = saída do FBR e E = entrada do FBR. Os balanços das concentrações das espécies de carbono inorgânico em solução apresentaram valores: **$\Delta CO_2 < 0$, $\Delta HCO_3^- < 0$ e $\Delta CO_3^{-2} > 0$.** Entretanto, com a injeção de CO_2, a diferença na concentração de CO_2 e bicarbonato entre a entrada e a saída foi maior, i.e. $\Delta[CO_2]$= 0,04 sem injeção de CO_2 e $\Delta[CO_2]$= 0,84 após 2 h de injeção de CO_2 (Q_{CO2} = 40 NL/h) na primeira batelada.

As taxas de consumo de carbono, CO_2 e bicarbonato foram calculadas pelo balanço de massa entre a entrada e a saída do FBR, considerando-se uma hora de operação do FBR. Para o cálculo por célula, foi utilizado o valor da diferença entre a contagem celular realizada pela manhã e à tarde. As Figuras 7.10 e 7.11 apresentam a distribuição da concentração de carbono inorgânico dissolvido (DIC) no meio de cultura.

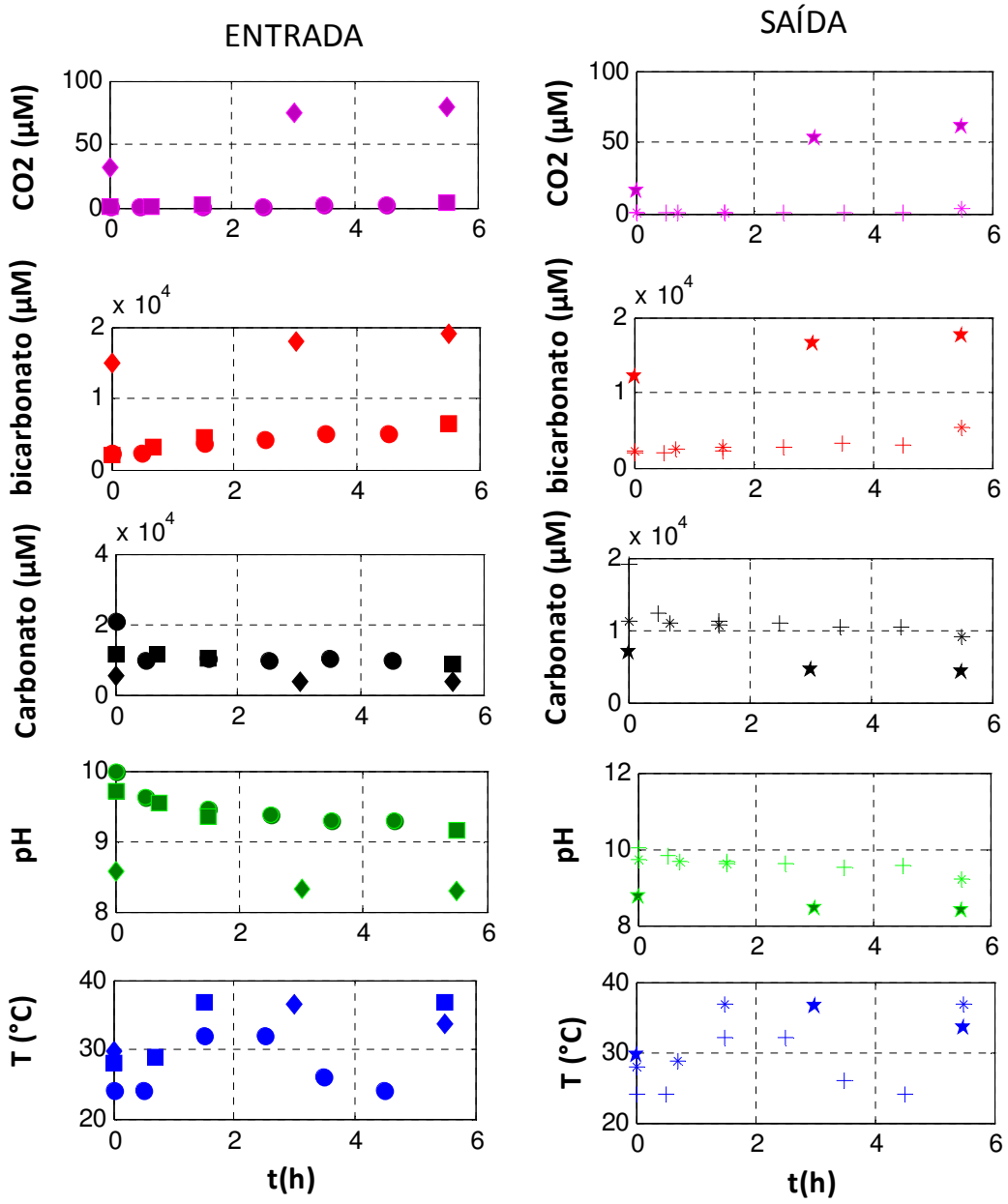


Figura 7.10: Distribuição da concentração de carbono inorgânico dissolvido (DIC) no meio em µmol.L^{-1} no cultivo de *I. galbana* em batelada *outdoor*. Amostras da entrada (●,■,♦) e saída (+,*,★)do FBR na primeira batelada, t = 0 corresponde ao início do monitoramento naquele dia do cultivo. Os dados compreendem amostragem em três dias de injeção de CO_2; (●,+) 29° dia do cultivo, (■,*) 31° dia do cultivo, (♦,★) 38° dia do cultivo. Não houve injeção de CO_2 (cilindro fechado) em t = 0 no 29° dia do cultivo e no 31° dia do cultivo.

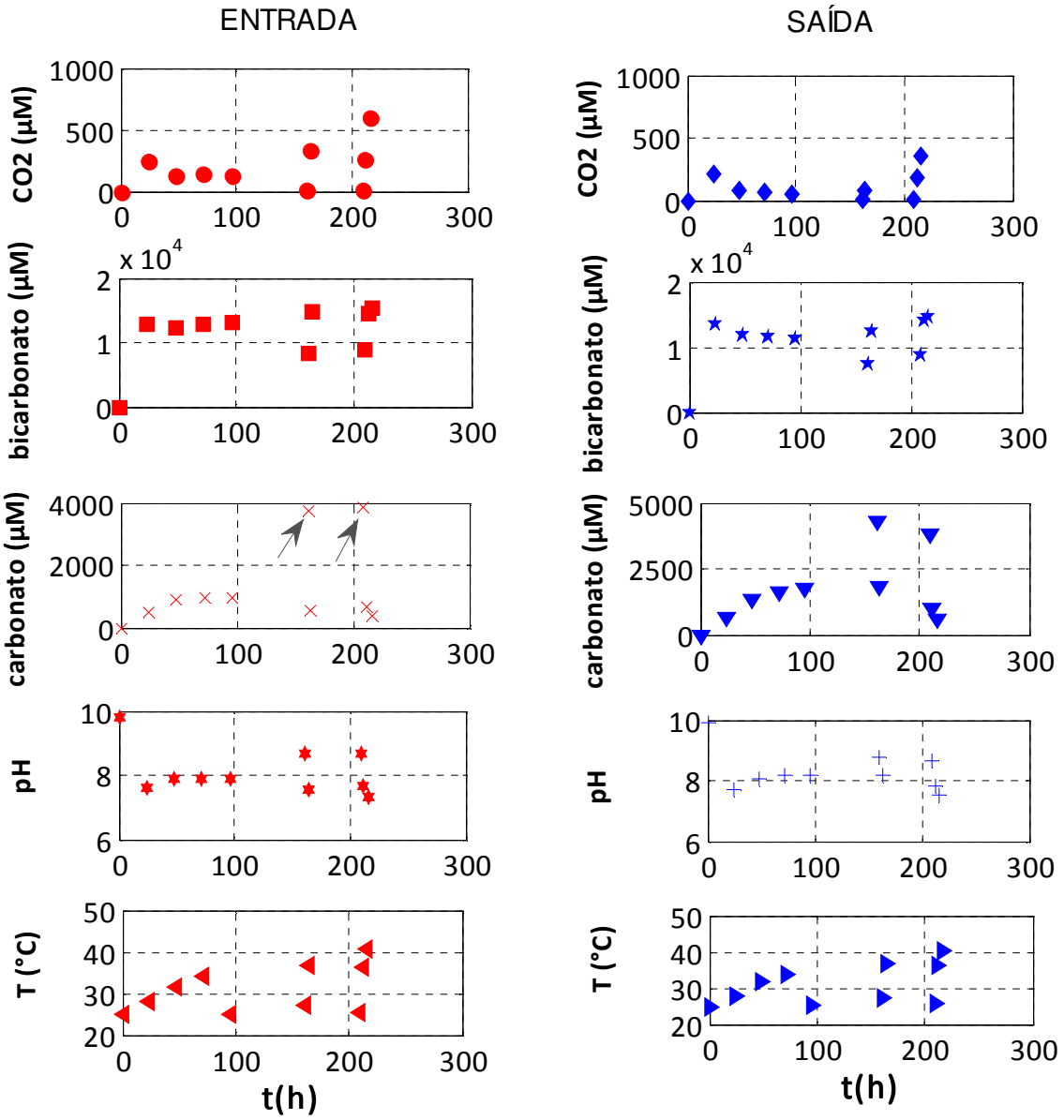


Figura 7.11: Distribuição da concentração de carbono inorgânico dissolvido (DIC) no meio em µmol.L^{-1} no cultivo de *I. galbana* em batelada *outdoor*. Amostras da entrada (vermelho) e saída (azul) do FBR na segunda batelada. O t = 0 corresponde ao início do monitoramento no 21° dia do cultivo, os dados compreendem amostragem em seis dias de injeção de CO_2. As setas indicam que nestes pontos (161 e 209 h) não houve injeção de CO_2 (cilindro fechado).

Rotâmetros manuais foram utilizados na primeira batelada para ajustar a concentração de CO_2 no ar. A vazão de ar e CO_2 foram mantidas em 820 L/h e 40 nL/h, respectivamente. Na segunda batelada, a injeção automatizada de CO_2 através do controle da variável pH aumentou a concentração de CO_2 e bicarbonato no meio líquido, pois maior vazão de CO_2 era alimentada. Como a planta não conta com um sistema totalmente automatizado para medições e controle, a determinação desta vazão não foi possível. Entretanto, pode-se observar que a injeção de CO_2 foi maior devido à rápida queda do pH, que em poucos minutos alcançava valores na faixa de 7,0-7,5 na entrada do fotobiorreator com a abertura da válvula.

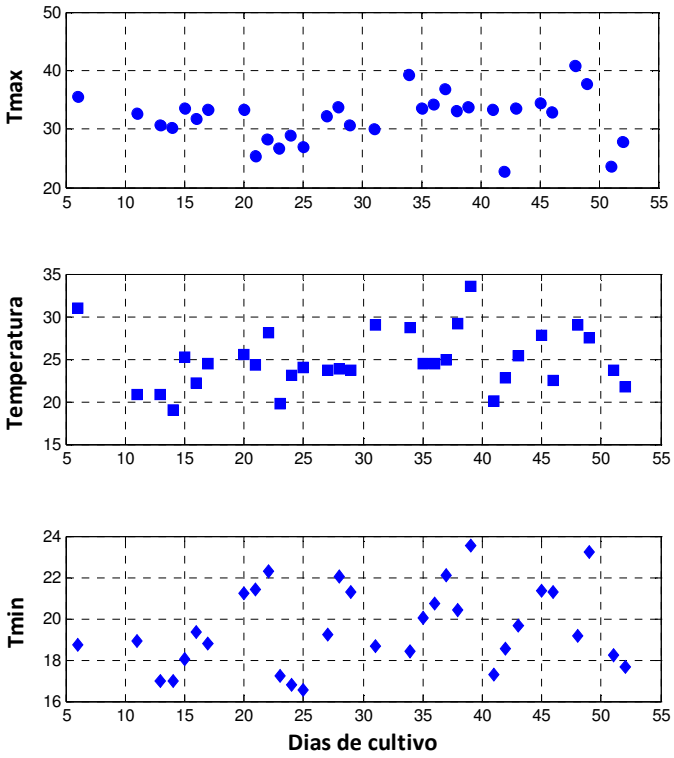
As concentrações determinadas no meio de cultura também indicaram que com o sistema automatizado maior volume de CO_2 foi alimentado ao FBR acarretando em uma concentração de 600 µmol/L (medida máxima na segunda batelada) comparada a uma concentração de 79 µmol/L (medida máxima na primeira batelada) com o controle da alimentação de CO_2 realizado por rotâmetros manuais. Todavia, o aumento de CO_2 alimentado com o sistema automatizado de injeção acarretou na perda de CO_2 no gás exausto do separador gás-líquido, localizado ao final do *riser* de carbonatação e antes da entrada do FBR. A concentração de CO_2 no gás exausto variou entre 2 e 4,9 % (v/v). Entretanto, o limite máximo de detecção do equipamento utilizado era 5% (v/v), isto é, valores maiores podem ter ocorrido, mas não puderam ser determinados devido à limitação de sensores disponíveis. Algumas soluções para esta exaustão de CO_2 incluem a reinjeção deste gás exausto, aumento do comprimento do *riser* ou instalação de unidades de carbonatação em paralelo, menor vazão de CO_2 e maior tempo de injeção utilizando uma válvula proporcional com controle de pH e tempo de injeção.

A taxa de consumo de bicarbonato e CO_2 no primeiro dia de injeção de CO_2 na primeira batelada foi de 1075 $\mu mol.L^{-1}.h^{-1}$ e 0,65 $\mu mol.L^{-1}.h^{-1}$, respectivamente. O consumo por célula foi de 4411,34 fmol HCO_3^-/cel e 2,65 fmol CO_2/cel o que resulta em uma captação de carbono de 868,53 fmol C/cel. Na segunda batelada, as concentrações de CO_2 e de bicarbonato foram aumentando progressivamente ao longo dos dias com injeção de CO_2, enquanto a concentração de carbonato diminuía. As taxas de consumo de CO_2 e bicarbonato aumentaram de 44,14 para 78,80 $\mu mol.L^{-1}.h^{-1}$ e 421,90 para 1724,18 $\mu mol.L^{-1}.h^{-1}$, respectivamente, nos três primeiros dias de injeção na segunda batelada. Por outro lado, a concentração celular na segunda batelada não

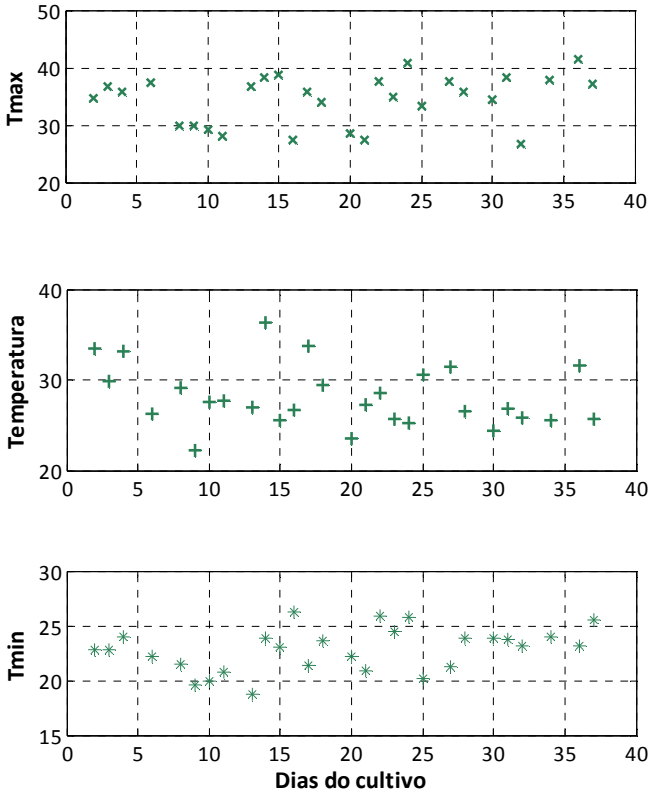
alterou com o enriquecimento de CO_2. MARCHETTI *et al.* (2012) obtiveram valores de conteúdo de carbono por célula de *I. galbana* semelhantes ao do presente trabalho, para condições não limitantes de nitrogênio e fósforo de 704,74 e 885,94 fmol C/cel, respectivamente. A taxa de consumo de carbono na primeira batelada, quando a injeção de CO_2 alterou a taxa de crescimento, foi de 1574,87 mg C/L d. HO *et al.* (2012) relatam uma taxa de consumo de carbono de 1420,6 mg C/L d no cultivo de *Scenedesmus obliquus*.

Com o enriquecimento do cultivo com CO_2, a concentração de CO_2 dissolvido no meio é elevada. Esta disponibilidade de CO_2 leva *I.galbana* a consumir preferencialmente CO_2 em detrimento ao bicarbonato, como pode ser visualizado na Figura 7.11, onde a diferença entre a entrada e a saída fica mais pronunciada conforme aumenta a concentração de CO_2 no meio ao longo das horas de injeção. BHATTI *et al.* (2002) sugerem que em ambientes naturais *I. galbana* utiliza preferencialmente o DIC na forma de CO_2, entretanto esta espécie possui o mecanismo de captação ativo de ambas as espécies de DIC, bicarbonato e CO_2. CAMIRO-VARGAS *et al.* (2005) observaram no cultivo de *I. galbana* e *Rhodomonas sp.* que a taxa de consumo de DIC nos primeiros dias de cultivo foi alta para *I. galbana*, caindo a partir do quarto dia de cultivo; a mesma queda não foi observada para *Rhodomonas sp.* Os autores concluíram que era necessário um suprimento extra de CO_2 para manter a taxa de crescimento de *I. galbana*. Estes relatos estão de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, e pode-se concluir que a produtividade em biomassa de *I. galbana* é afetada pela limitação de CO_2.

Um parâmetro importante e que influencia diretamente o metabolismo da célula é a temperatura do cultivo. A temperatura no cultivo *outdoor* de *I. galbana* foi monitorada diariamente, bem como a temperatura máxima e mínima registradas entre as medições diárias. A Figura 7.12 apresenta os valores diários de temperatura para a primeira e segunda bateladas.



(a)



(b)

Figura 7.12: Variação da temperatura (°C) em cultivo de *I. galbana* em batelada *outdoor*. (a) batelada 12/07, (b) batelada 08/11.
Tmax = temperatura máxima e Tmin = temperatura mínima.

O perfil da temperatura máxima não apresentou uma variação significativa entre os cultivos. Todavia, poucos dias do cultivo na primeira batelada tiveram a temperatura acima de 30°C, e a mínima se manteve abaixo dos 24°C, atingindo 16,6°C. A temperatura máxima alcançada no primeiro cultivo foi de 40,8°C e no segundo foi de 41,4°C.

A faixa de temperatura reportada como ideal para o cultivo de *I. galbana* varia de 24° a 30°C (CLAQUIN *et al.* 2008; MARCHETTI *et al.* 2012). Os efeitos na célula de temperaturas abaixo de 19°C e acima de 32°C têm sido descritos como desde queda na taxa de crescimento ao colapso do sistema fotossintético (KAPLAN *et al.* 1986; OUKARROUM *et al.* 2012). VAN BERGEIJK *et al.* (2010) em cultivo *outdoor* de *I. aff galbana* verificou que abaixo de 15°C não havia crescimento, e que ocorria uma variabilidade na taxa de crescimento com a variação da temperatura em cultivos *outdoor*. GARCÍA-GONZÁLEZ *et al.* (2005) verificaram um aumento da produtividade em biomassa com controle de temperatura, mantida em 25°C, no cultivo *outdoor* em fotobiorreator tubular de *Dunaliella salina* para obtenção de carotenos, quando a temperatura não foi controlada a variação foi de 17° a 30°C e reduziu a produtividade de 2,2 $g.m^{-2}.d^{-1}$ para 0,6 $g.m^{-2}.d^{-1}$. No caso do experimento aqui realizado, não foi observado o colapso do cultivo a 35°C como em RENAUD *et al.* (2002). Entretanto, quando a temperatura do cultivo atingiu 41°C na segunda batelada, a eficiência fotossintética (Fv/Fm) teve uma queda de 0,603 a 0,417 (Tabela 7.4). Após esta queda, a cultura entrou em declínio.

A composição bioquímica da *I. galbana* foi determinada na segunda batelada. As amostras foram coletadas em dois dias do cultivo (28° e 30° dias) em três horários do dia (10:00, 13:00 e 18:00 h). A irradiância na superfície externa do FBR e a temperatura da suspensão celular foram verificadas a cada amostragem. É importante salientar que no período da segunda batelada o horário de verão estava em vigor. O ponto escolhido para medir a irradiância foi a superfície do quinto tubo, de cima para baixo, entre as colunas 3 e 4. A Figura 7.13 apresenta a distribuição da concentração de lipídios totais, carboidratos totais, proteínas totais e a razão C:N na biomassa seca de *I. galbana* em cultivo *outdoor*.

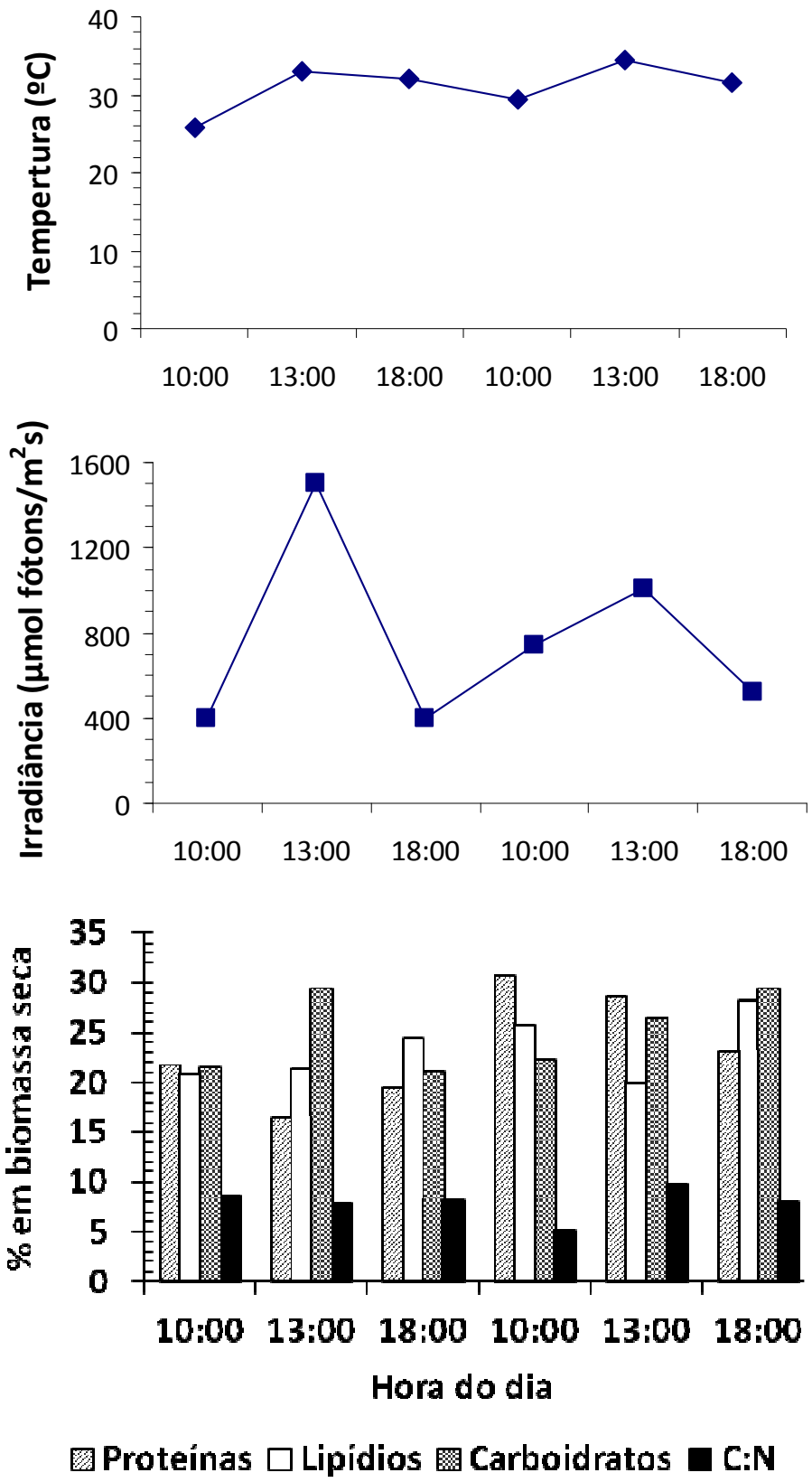


Figure 7.13: Temperatura, irradiância e composição bioquímica da *I. galbana* no cultivo batelada *outdoor* no Fotobiorreator.

A concentração de lipídios totais na biomassa seca variou entre 19,9 e 28,2%, e apresentou o maior valor ao final do segundo dia de amostragem (18:00 h). A concentração de carboidratos totais máxima foi de 29,4%, verificada no horário de maior irradiância (13:00 h). A razão C:N não apresentou variação significativa no primeiro dia de amostragem. Todavia, uma maior razão C:N foi verificada no horário de maior irradiância no segundo dia. A concentração do *pool* metabólico é altamente influenciada pelas condições de cultivo. As variáveis temperatura, irradiância e nutrientes têm sido amplamente investigadas no sentido de encontrar-se os valores ótimos para produção do produto de interesse (GUIHÉNEUF *et al.* 2009; DRAGONE *et al.* 2011; DEVI & MOHAN 2012; CHEN *et al.* 2011; CHEIRSILP & TORPEE 2012; FLAIM *et al.* 2012). De acordo com SUKENIK & WAHNON (1991), o aumento da irradiância eleva os níveis de carboidratos na célula. Por outro lado, a elevação da temperatura pode reduzir o conteúdo celular de carboidratos (RENAUD *et al.* 2002).

A irradiância apresentou maior influência no conteúdo lipídico que a temperatura, pois, para uma temperatura próxima (diferença de 1,5ºC) e uma irradiância cinco vezes menor, o conteúdo de lipídios foi 6,8% maior. A temperatura elevada pode ter contribuído para a elevação da razão C:N na biomassa no segundo dia de amostragem. BERGES *et al.* (2002) verificaram um aumento na fixação de carbono em *Thalassiosira pseudonana* com o aumento da temperatura. ZHU *et al.* (1997) cultivando *I. galbana* em fotobiorreator tubular *outdoor* determinaram a composição bioquímica da célula ao longo do dia, e observaram que o conteúdo de carboidratos aumentou durante o dia alcançando o máximo às 13:00 h, enquanto o conteúdo lipídico apresentou um leve aumento em 48 h. Por outro lado, o conteúdo protéico foi inverso em relação à irradiância, temperatura e carboidratos. A variação da composição bioquímica no presente trabalho foi semelhante à obtida por ZHU *et al.* (1997).

A Tabela 7.3 apresenta a composição elementar (%CHN) da biomassa na segunda batelada.

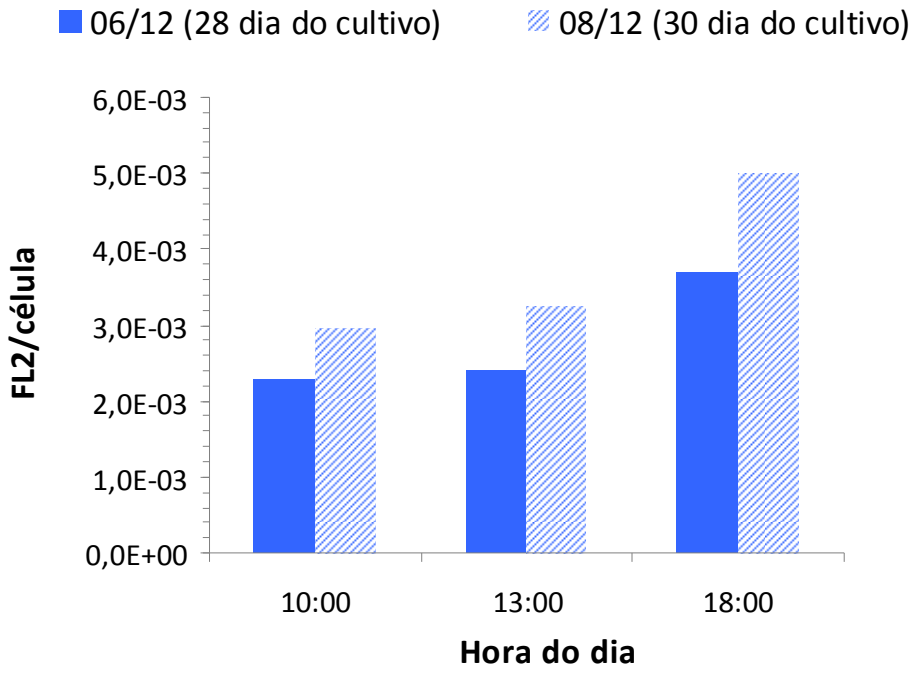
Tabela 7.3: Composição elementar (%CHN) na biomassa seca de *I. galbana*

ponto de amostragem	*data*	*hora*	*N%*	*C%*	*H%*
S	28/11/2011*	17:00	3,81±0,17	28,70±4,01	5,35±0,22
S	29/11/2011	17:00	3,81±0,77	44,46±1,10	6,36±0,03
S	30/11/2011	17:00	4,03±0,14	34,02±1,62	5,63±0,01
S	01/12/2011	17:00	4,23±0,32	40,79±0,99	6,19±0,08
S	02/12/2011	17:00	3,33±0,69	34,52±2,86	5,73±0,24
E	06/12/2011	10:00	4,93±0,17	33,80±2,10	6,12±0,27
E		13:40	8,65±1,80	39,06±2,93	6,59±0,15
S		10:00	4,12±0,13	35,31±1,14	6,53±0,35
S		13:40	5,44±0,62	42,17±0,22	6,86±0,036
E	08/12/2011	10:30	7,68±0,38	35,65±0,62	6,17±0,05
E		13:40	7,18±0,92	41,06±0,72	6,44±0,08
E		17:00	5,77±0,71	38,43±1,58	6,35±0,09
S		10:30	8,25±0,13	41,71±1,13	6,46±0,10
S		13:40	3,89±0,23	38,02±1,31	6,75±0,20
S		17:00	4,49±0,63	35,57±3,58	6,00±0,11

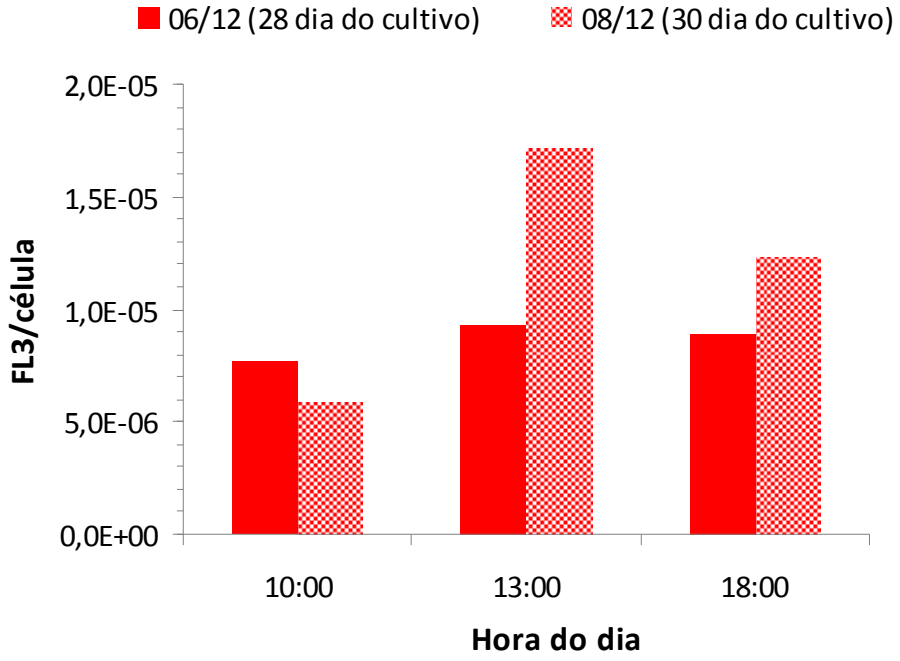
*Sem enriquecimento com CO_2

A concentração de carbono na biomassa variou de 28,7% a 44,5%. A menor concentração de carbono foi verificada antes do início da injeção de CO_2 no 20° dia do cultivo, enquanto a maior concentração de C foi observada logo no primeiro dia de injeção de CO_2, quando a concentração de CO_2 no meio aumentou de 0,1 para 248 $\mu mol.L^{-1}$. A biofixação de carbono apresentou uma tendência de aumento com a irradiância, com valor na faixa de 40,08±1,88 % C em média no horário de maior incidência solar (13:00 h). A disponibilidade de CO_2 no meio de cultura e a irradiância sugerem um aumento na biofixação de carbono pela célula (HO *et al.* 2012).

A distribuição de lipídios neutros e polares ao longo do dia na segunda batelada foi determinada por citometria de fluxo. As células coradas com Nile Red foram analisadas e os resultados obtidos em termos de fluorescência (pulsos de voltagem) foram plotados na Figura 7.14.



(a)



(b)

Figura 7.14: Composição celular de lipídios ao longo do dia em termos de fluorescência (a) lipídios neutros (b) lipídios polares. FL2 é o canal que detecta na faixa 590-650 nm (Fluorescência laranja - lipídios neutros) e FL3 é o canal que detecta a 682 nm (Fluorescência vermelha - lipídios polares).

Houve um progressivo aumento do conteúdo de lipídios neutros ao longo do dia. Por outro lado, as células apresentaram maior conteúdo de polares no horário do dia de maior incidência solar. Este resultado sugere que enquanto há luminosidade as células, através da fotossíntese, biofixam o CO_2 e produzem macromoléculas de elevado conteúdo em carbono, como os lipídios neutros. Já os lipídios polares são comumente associados a membranas fotossintéticas. O conteúdo por célula de lipídios neutros foi significativamente maior. Isto se deve principalmente ao fato de que esta análise foi realizada com as células em estado estacionário, onde há um acúmulo de lipídios de reserva como os triglicerídeos e uma diminuição nos lipídios de membrana como os fosfolipídios (FIDALGO *et al.* 1998).

Na análise por citometria, também foi verificado que em muitas amostras havia duas populações distintas de *I. galbana* com relação ao conteúdo de lipídios neutros. As Figuras 7.15, 7.16 e 7.17 apresentam os gráficos 3D da análise por citometria de fluxo.

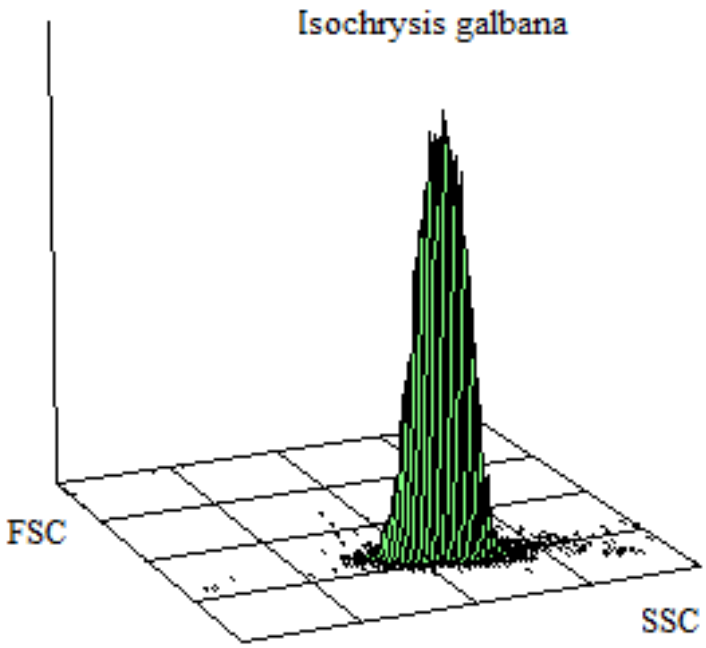
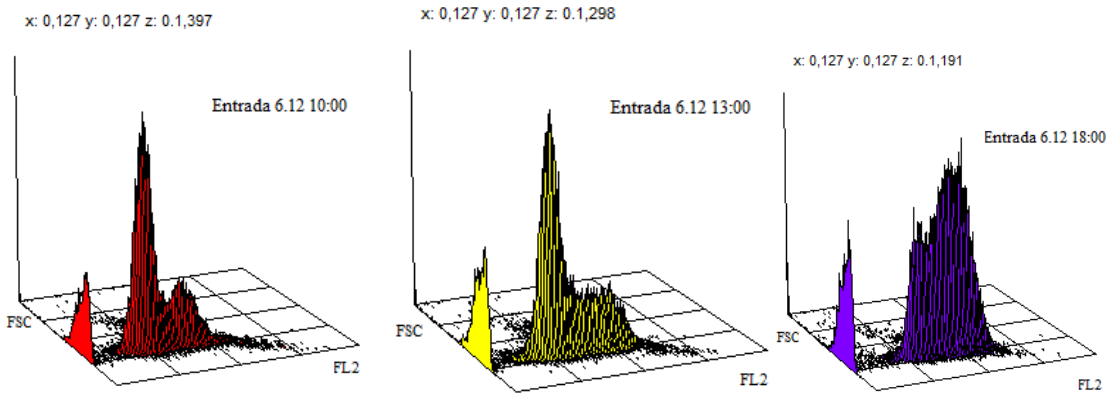
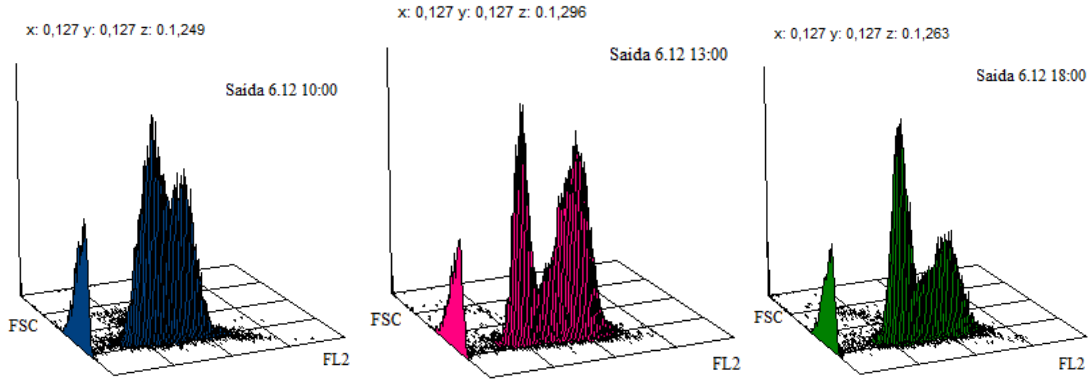


Figura 7.15: População de *I. galbana*, FSC= Foward Scatter (tamanho de partícula), SSC= Side Scatter (complexidade celular).

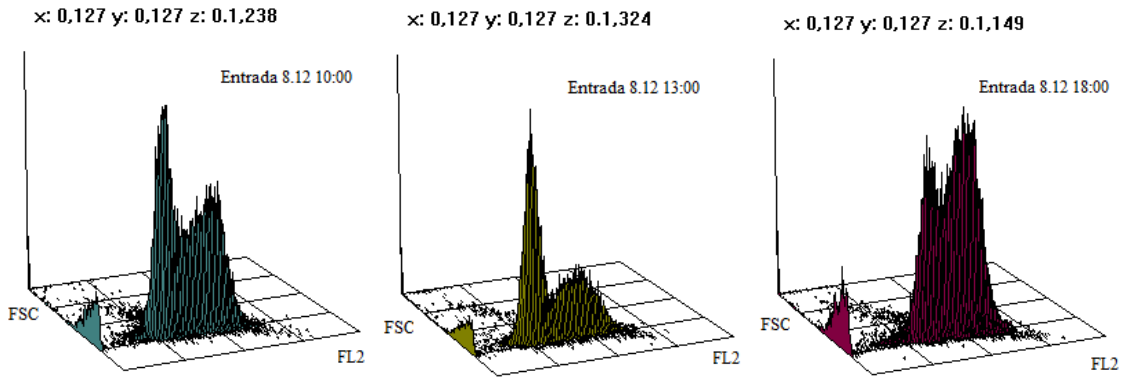


(a)

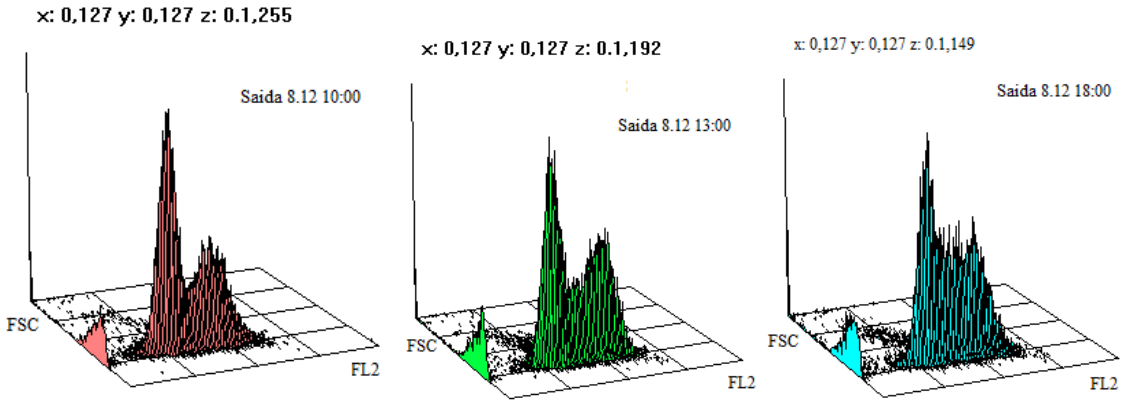


(b)

Figura 7.16: População de *I. galbana* de cultivo *outdoor* corada com Nile Red em FL2 (lipídios neutros), (a) entrada (28° dia de cultivo), (b) saída (28° dia de cultivo).



(a)



(b)

Figura 7.17: População de *I. galbana* de cultivo *outdoor* corada com Nile Red em FL2 (lipídios neutros), (a) entrada (30° dia de cultivo), (b) saída (30° dia de cultivo).

O gráfico da Figura 7.15 apresenta uma única população distinta, o que indica que a contaminação neste momento do cultivo ainda era pontual no FBR, localizada unicamente no topo das colunas, e as amostras analisadas no citômetro continham majoritariamente *I. galbana*. Assim, as duas populações que podem ser visualizadas nas Figuras 7.16 e 7.17 são provavelmente células com diferentes idades e, portanto, com volumes e conteúdo intracelulares diferentes. Uma das funcionalidades da citometria de fluxo é exatamente distinguir, a partir do SSC e corantes específicos nos canais FL, qual a fase do ciclo celular. É importante salientar que estas duas populações são

visualizadas apenas no canal FL2, isto é, a diferenciação ocorreu quanto ao conteúdo de lipídios apolares. A distribuição de lipídios apolares apresentada na Figura 7.14 compreende a média das populações.

Parâmetros de fluorescência da fotossíntese foram determinados usando fluorímetro de Pulso Modulado. As amostras foram coletadas em três horários, às 10:00, 13:00 e 18:00 h do 35° dia de cultivo. O rendimento quântico máximo (Fv/Fm) foi determinado em amostras da entrada e saída do FBR adaptadas ao escuro por no mínimo 20 min, bem como o rendimento quântico das amostras não adaptadas ao escuro. A irradiância foi verificada no FBR na superfície externa do quinto tubo de vidro entre as colunas 3 e 4. A taxa de transporte de elétrons foi calculada de acordo com a equação (4.12), os dados são apresentados na Tabela 7.4.

Tabela 7.4: Parâmetros fisiológicos da *I. galbana* em cultivo *outdoor* em fotobiorreator.

Hora	*Ponto de amostragem (entrada ou saída)*	*Condição*	*PAR µmol fótons . $m^{-2}.s^{-1}$*	*Rendimento Quântico* (Φ)*	*ETR calculada µmol elétrons . $m^{-2}.s^{-1}$*
10:00	E	Adaptada ao escuro	0	0,649	---------
		Adaptada à luz	1755	0,646	478,59
	S	Adaptada ao escuro	0	0,651	--------
		Adaptada à luz	1755	0,615	480,07
13:00	E	Adaptada ao escuro	0	0,609	--------
		Adaptada à luz	1723	0,602	440,78
	S	Adaptada ao escuro	0	0,605	---------
		Adaptada à luz	1723	0,587	437,89
18:00	E	Adaptada ao escuro	0	0,613	--------
		Adaptada à luz	-------	0,604	--------
	S	Adaptada ao escuro	0	0,417	--------
		Adaptada à luz	1273	0,403	223,11

*desvio padrão máximo = 0,014

A curva de luz rápida das amostras do FBR foi realizada. A Figura 7.18 apresenta as RLC para o cultivo *outdoor* de *I. galbana*.

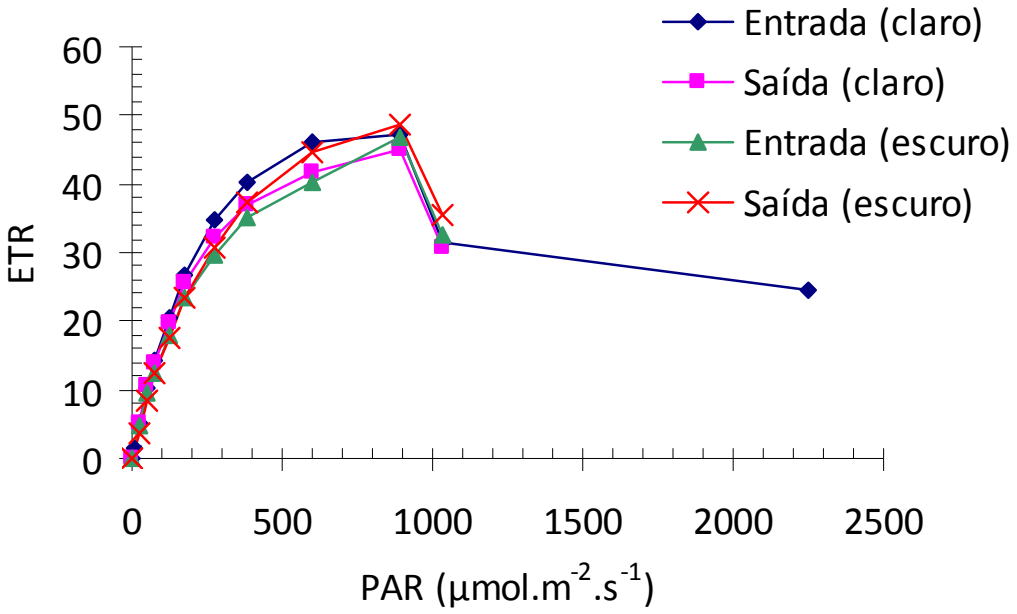


Figura 7.18: Curva de Luz Rápida (RLC) das amostras de entrada e saída do FBR adaptadas ao escuro e adaptadas à luz.

O rendimento fotoquímico no cultivo *outdoor* foi menor que no cultivo *indoor*. Isto se deve a algum fator de estresse no cultivo *outdoor*, o qual pode provocar a queda do rendimento quântico no sistema PSII, tais como, irradiância, temperatura e estresse nutricional. A ETR é diretamente proporcional à irradiância, até o ponto de saturação luminosa. A irradiância não teve uma grande variação ao longo do dia da amostragem (Tabela 7.4), caindo levemente no final da tarde. Entretanto, este dia do cultivo registrou a maior temperatura (T = 41°C), além disto, o fluxo encontrava-se muito baixo, aumentando o tempo de residência no FBR. Estes fatores explicam a discrepância entre as amostras de entrada e saída do horário de 18:00 h, bem como a queda no rendimento fotoquímico nas células da saída do FBR. Como as células da entrada ficaram mais tempo no TRL, CRL e *riser* (parte do sistema onde a luminosidade é mínima), apresentaram Fv/Fm compatível com os demais horários. Como o parâmetro Fv/Fm tem relação com a saúde da célula, a queda no rendimento quântico demonstrou que *I. galbana* estava sob estresse, apresentando baixa eficiência fotossintética. O rendimento fotoquímico do fotossistema II (Fv/Fm) foi utilizado como parâmetro para a remoção do *sombrite* no cultivo *outdoor* de *I. galbana* por VAN BERGEIJK *et al.* (2010), quando as células apresentaram rendimento fotoquímico de no mínimo 0,55, a primeira camada do *sombrite* foi removida.

As RLC também apresentaram diferença entre os cultivos *indoor* e *outdoor* de *I. galbana*, valores menores de taxa de transporte de elétrons foram observados em cultivo *outdoor* para a mesma irradiância do cultivo *indoor*. Esta diferença entre as curvas de luz rápida tem relação com a menor eficiência quântica verificada nas células no cultivo *outdoor*, ambos os parâmetros (Fv/Fm e ETR) estão relacionados a um fator de estresse celular como elevada temperatura ou irradiância. A ETR calculada resultou em valores maiores que os verificados na RLC para o cultivo *outdoor*, esta diferença entre taxa de transporte de elétrons calculada e medida também sugere que as células encontravam-se fisiologicamente alteradas. De acordo com MOLINA GRIMA *et al.* (1996b), a degradação da capacidade das microalgas absorverem luz tem sido atribuída a uma destruição de componentes-chave do fotossistema PSII (SAMUELSON *et al.* 1985). JENSEN & KNUTSEN (1993) demonstraram que este é um processo reversível no qual degradação e regeneração de componentes essenciais do aparato fotossintético coexistem e a quantidade disponível de centros fotossintéticos funcionais é o resultado de um equilíbrio entre os dois processos. A fotoinibição ocorre normalmente em altas irradiâncias, comuns no cultivo *outdoor*. Todavia, a luminosidade média na cultura é variável devido aos pontos com sombreamento, menor irradiância e diferentes volumes específicos dependentes da região do Fotobiorreator. Contudo, o processo de regeneração pode ocorrer durante toda a extensão da cultura no Fotobiorreator.

CAPÍTULO 8 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES

8.1 CONCLUSÕES

- A Metodologia de Screening desenvolvida provou ser eficiente utilizando banco de dados, métricas e engenharia de processos, e resultou nas mesmas espécies candidatas: *I. galbana e B. braunii*;

- o enriquecimento de CO_2 promoveu aumento na produtividade de biomassa no cultivo *indoor* sem impacto significativo sobre a acumulação de lipídios;

- a batelada alimentada provou ser útil para o acúmulo de lipídios resultando em 37% de óleo na biomassa;

- o regime semicontínuo resultou em maior produtividade devido à concentração de biomassa atingir nível superior;

- irradiância, razão C:N no meio de cultura e tempo de reposição de nutrientes foram os parâmetros de maior impacto na produtividade da cultura em modo semicontínuo;

- o projeto de fotobiorreator e seu protótipo construído operou com resultados positivos no cultivo *outdoor* da microalga selecionada: *I. galbana*;

- o cultivo *outdoor* de *I.galbana* promoveu acúmulo de lipídios (28% de óleo na biomassa cultivada em regime batelada);

- baixas vazões de ar enriquecido com CO_2 com tempos mais prolongados de injeção, como na primeira batelada, demonstraram um uso mais eficiente do CO_2;

- variações de temperatura, irradiância e baixa velocidade no FBR (fluxo laminar) são os fatores apontados no presente trabalho como principais responsáveis pela baixa produtividade;

- o consumo de CO_2 foi maior em relação ao bicarbonato, sugerindo a preferência da *I. galbana* pelo CO_2;

- respostas do sistema PSII da célula indicaram alterações fisiológicas na célula, provocadas por algum fator de estresse como a elevada temperatura do cultivo.

8.2 CONCLUSÃO GERAL

O Fotobiorreator Piloto apresentou resultados positivos quanto ao cultivo *outdoor* de *Isochrysis galbana*, com potencial na produção de óleo e biofixação do CO_2.

8.3 SUGESTÕES

No presente trabalho, o sistema de fotobiorreação foi dimensionado, construído e testado quanto a sua capacidade de produção de *Isochrysis galbana*. O sistema montado em 2010, com colunas de plástico policarbonato de seção quadrada, apresentou incontornáveis problemas de vazamentos intermitentes, que se agravavam com a amplitude térmica dos dias. Disto resultou que tais colunas tiveram de ser substituídas por novas colunas cilíndricas, sem pontos de colagem expostos, no primeiro semestre de 2011. Como resultado foi reduzida a janela de tempo disponível para experimentos a praticamente a segunda metade de 2011, dificultando a execução de mais corridas no sentido de explorar aumentos de produtividade de biomassa e testar os limites da planta, que está diretamente relacionada com a capacidade do *Riser* RCT de prover transferência de massa gás-líquido. Entretanto, foi possível observar que melhorias no sistema devem ser consideradas para aumentar a produtividade. Algumas destas possíveis modificações são listadas a seguir:

- Aumento da capacidade do sistema de resfriamento do FBR por aspersão de névoa d'água para que a temperatura do mesmo não ultrapasse a marca dos 35ºC no verão;
- Filtração microbiológica de todo ar entrando no sistema;
- Melhorias na automação da planta, como por exemplo, controladores de vazão e válvula de controle para o sistema *air-lift* e injeção de CO_2, e termopares nas colunas ligados ao sistema de névoa d'água;

- Aumento da vazão de líquido dentro do FBR, por exemplo, com a injeção de ar em baixa vazão nas colunas.

Alguns aspectos quanto às células também podem ser otimizados:

- Adaptação celular às condições de irradiância para diminuir ou eliminar a fase *lag*, a qual pode ser feita no próprio FBR utilizando-se alguma cobertura semitransparente que possa ser removida aos poucos, como um *sombreiro*, ou adaptação nos próprios *carboys* utilizando-se lâmpadas fluorescentes;
- Inocular o sistema com mais células;
- Realizar cultivo massivo, isto é, adição de células novas semanalmente, por exemplo, mantendo a *I. galbana* sempre em condições biológicas competitivas;
- Utilizar outra cepa com maior resistência à variação de temperatura e irradiância. Neste caso, o ideal é uma espécie para ser cultivada no outono/inverno e outra na primavera/verão. Outra possibilidade é uma célula geneticamente modificada de acordo com a necessidade, como as temperaturas no Rio de Janeiro são elevadas no verão uma célula com crescimento ótimo em 35ºC levaria a maiores produtividades.

Outra questão relevante está relacionada à colheita da biomassa, que não foi alvo do presente trabalho, mas vem sendo estudada pelo grupo de pesquisa em microalgas do Laboratório H2CIN da Escola de Química da UFRJ. Diferentes métodos de floculação estão sendo testados para separação da biomassa de *I. galbana* no sentido de otimizar e diminuir os custos das operações unitárias de separação. Melhorias relacionadas à planta e célula devem ser realizadas para aumentar a produtividade e verificar-se o limite real de produção da planta piloto. Após as modificações sugeridas será possível analisar o escalonamento da planta piloto com a multiplicação das unidades e/ou do número de *risers*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AASBERG-PETERSEN K., Bak Hansen J-H, Christensen T.S.; *et al.* 2001. Technologies for large-scale gas conversion. Appl Catal A. 221,379–387.

ABU REZQ T.S.; Al Musallam L.; Al Shimmari J.; Dias P. 1999. Optimum production conditions for different high-quality marine algae. Hydrobiologia. 403, 97–107.

ACIÉN F.G., Fernández J.M., Magán J.J., Molina Grima E. 2012. Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. Biotechnology Advances. A*rticle in press*.

ACIÉN FERNÁNDEZ F.G.; Camacho F. G.; Sánchez Pérez J.A. 1998. Fernández Sevilla, J.M.; Molina Grima E. M. Modelling of biomass productivity in tubular photobioreactors for microalgal cultures: effects of dilution rate, tube diameter and solar irradiance. Biotechnology and Bioengineering. 58 (6), 605-616.

ACIÉN FERNANDEZ, F.G., Hall, D. O., Guerrero, E. C., Rao, K. K., Grima, E. M. 2003. Outdoor production of *Phaeodactylum tricornutum* biomass in a helical reactor. Journal of Biotechnology. 103, 137-152.

AFFAN A.; Karawita R.; Jeon Y-J.; Lee J-B. 2007. Growth characteristics and antioxidant properties of the benthic diatom *Navicula incerta* (bacillariophyceae) from jeju island Korea. Journal of Phycology. 43, 823–832.

ALBERTS B. *et al.*; 2008. Molecular Biology of THE CELL. Quinta edição. Plublicado por Garland Science Taylor & Francis Group.

AMARO H.M., Guedes A.C., Malcata F.X. 2011. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. Applied Energy 88, 3402–3410.

ANASTAS P. T.; Zimmerman J. B. 2003. Design through the Twelve Principles of Green Engineering. Environmental Science Technology. 37, 94A-101A.

ANDREASSON K. I. M.; Wangberg S. A. 2007. Reduction in growth rate in *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) and *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) induced by UV-B radiation. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 86, 227–233.

ARANTES A.C.C., Dzuman M.J., Bosa J.A. et al. 2010. Comparação de meios de cultivo autotróficos, mixotróficos e heterotróficos para produção de biomassa de microalgas com foco em biocombustíveis e co-produtos. 5° Congresso Internacional de Bioenergia, 10 a 13 de agosto de 2010, Curitiba, PR, Brasil. Disponível em: http://www.slideshare.net/andrebmariano/artigo-3-comparao-de-meios-de-cultivoautotrficos-mixotrficos-e-heterotrficos-para-produo-de biomassa-de-microalgas-com-foco-em-biocombustveis-e-coprodutos

ARAUJO O. Q. F.; Gobbi C. N.; Chaloub R. M.; Coelho M. A. Z. 2009. Assessment of the Impact of Salinity and Irradiance on the Combined Carbon Dioxide Sequestration and Carotenoids Production by *Dunaliella salina*: A Mathematical Model. Biotechnology and Bioengineering. 102 (2), 425-435.

ARAUJO S. C.; Garcia V. M. T.; Garda J.; Furlong E. B. 2005. Growth and biochemical composition of the diatom *Chaetoceros cf. wighamii Brightwell* under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. I. protein, carbohydrates and lipids. Aquaculture. 246, 405– 412.

BANERJEE A., Sharma R., Chisti Y., Banerjee U. C. 2002. *Botryococcus braunii*: A renewable source of hydrocarbons and other chemicals. Critical Reviews in Biotechnology. 22(3), 245-279.

BARCLAY W.R., Maeger K.M., Abril J.R. 1994. Heterotrophic production of long chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms. Journal of Applied Phicology. 6,123–129.

BEN-AMOTZ A. 2009. Bio-Fuel and CO2 Capture by Algae. ANR Meeting on Third generation Biofuels 5thFebruary 2009. Disponível em: http://www.czechtechnologydays.org/sites/default/files/17b_Mr.%20Nedbal.pdf

BENEMANN R. J.; Oswald W. J. 1996. Systems and economics analysis of microalgae ponds for conversion of CO2 to Biomass. To the department of energy Pittsburg energy technology center under grant No DE-FG22-93PC93204.

BERGES J.A.; Varela D.E.; Harrison P.J. 2002. Effects of temperature on growth rate, cell composition and nitrogen metabolism in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). Marine Ecology Progress Series. 225,139–146.

BHATTI S.; Huertas I. E. 2002. Colman B**.** Acquisition of inorganic carbon by the marine haptophyte *Isochrysis galbana* (prymnesiophyceae). Journal of Phycology. 38, 914–921.

BICALHO R. 2009. Perspectivas do investimento em energia. Rio de Janeiro: UFRJ, Instituto de Economia, 226 p. Relatório integrante da pesquisa "Perspectivas do Investimento no Brasil", em parceria com o Instituto de Economiada UNICAMP, financiada pelo BNDES. Disponível em: http://www.projetopib.org/?p=documentos.

BORGES L.; De Faria B. M.; Odebrecht C.; Abreu P. C. 2007. Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas usadas na aquicultura: primeiros passos para o desenvolvimento de um "mecanismo de desenvolvimento limpo". Atlântica, Rio Grande. 29(1), 35-46.

BOROWITZKA M. A. 1997. Microalgae for aquaculture: Opportunities and constrains. Journal of Applied Phycology. 9, 393–401.

BOUGARAN G.; Bernard O.; Ciandra A. 2010. Modeling continuous cultures of microalgae colimited by nitrogen and phosphorus. Journal of Theoretical Biology. 265 (3), 443-454.

BOUGARAN G.; Le Déan L.; Lukomska A. W. E.; Kaas R.; Baron R. 2003. Transient initial phase in continuous culture of *Isochrysis galbana* affinis *tahiti.* Aquatic Living Resources. 16, 389–394.

BOURNE Jr. J. K. "Green Dreams", *National Geographic Magazine*, October, 2007.

BOUSSIBA S., Sandbank E., Shelef G., Cohen Z., Vonshak A., Ben-Amotz A., Arad S., Richmond A. 1988. Outdoor Cultivation of the Marine Microalga *Isochrysis galbana* in Open Reactors. Aquaculture. 72, 247-253.

BOUSSIBA S.; Vonshak A. 1991. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. Plant and Cell Physiology. 32, 1077-1082.

BRENNAN L.; Owende P. 2010. Biofuels from microalgae — a review of technologies for production, processing and extractions of biofuels and co-products. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 14, 557–577.

BRENTNER L.B., Eckelman M.J., Zimmerman J.B. 2011. Combinatorial Life Cycle Assessment to Inform Process Design of Industrial Production of Algal Biodiesel. Environmental Science Technology. 45,7060-7067.

BROWN M. R.; Jefrey S. W.; Garland C. D. 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture: a literature review. CSIRO Mar Lab Rep. 205,1-44.

BROWN M.R. 1991. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 145,79-99.

BROWN R. M.; Mccausland A. M.; Kris K. 1998. The nutritional value of four australian microalgal strains fed to pacific oyster C*rassostrea gigas* Spat. Aquaculture. 165, 281–293.

BUEKENS A. 2005. Energy Recovery from Residual Waste by Means of Anaerobic Digestion Technologies. Conference "The Future of Residual Waste Management in Europe".

CAMIRO-VARGAS T. K.; Hernández-Ayon J. M.; Valenzuela-Espinoza E.; Delgadillo-Hinojosa F.; Cajal-Medrano R. 2005 Dissolved inorganic carbon uptake by *Rhodomonas sp.* and *Isochrysis aff. galbana* determined by a potentiometric technique. Aquacultural Engineering. 33, 83–95.

CARVALHO A. P.; Meireles L. A.; Malcata F. X. 2006. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. Biotechnol. Prog. 22, 1490−1506.

CENBIO. Comparação entre Tecnologias de Gaseificação de Biomassa Existentes no Brasil e no Exterior e Formação de Recursos Humanos na Região Norte. Estado da Arte da Gaseificação. 2002. Disponível em: http://cenbio.iee.usp.br/

CHAGAS B.M.E. 2010. Influência do estresse nutricional programado na composição da microalga marinha *Isochrysis galbana*. Dissertação de mestrado. PPGEQ/UFRN.

CHANNIWALA S.A., Parikh P.P. 2002. A unified correlation for estimating HHV of solid, liquid and gaseous fuels. Fuel. 81,1051-1063.

CHAUMONT D.; Gudin C.; Thepenier C. 1988. Scaling up of a tubular photoreactor for continuous culture of *Porphyridium cruentum*– From laboratory to pilot plant. In Stadler T.; Morillon J.; Verdus M. C.; Karamanos Y.; Morvan H.; Christiaen D. [eds.] Algal biotechnology. Elsevier, London, 199–208.

CHEIRSILP B.; Torpee S. 2012. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. Bioresource Technology. 110, 510–516.

CHEN F.; Johns M. R. 1991. Effect of C/N ratio and aeration on the fatty acid composition of heterotrophic *Chlorella sorokiniana*. Journal of Applied Phycology. 3, 203–209.

CHEN F.; Johns M. R. 1996a. Heterotrophic growth of *Chlamydomonas reinhardtii* on acetate in chemostat culture. Process Biochemistry. 31, 601–604.

CHEN F.; Johns M. R. 1996b. High cell density culture of *Chlamydomonas reinhardtii* on acetate using fed-batch and hollow-fibre cell-recycle systems. Bioresource Technology. 55, 103-110.

CHEN X.; Yvonne Goh Q.; Tan W.; Hossain I.; Chen W.N.; Lau R. 2011. Lumostatic strategy for microalgae cultivation utilizing image analysis and chlorophyll a content as design parameters. Bioresource Technology. 102, 6005–6012.

CHISTI Y. 2007. Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances. 25, 294–306.

CHISTI Y. 2008.Biodiesel from microalgae beats bioethanol. Trends in Biotechnology, 26 (3), 126-131.

CHIU S-Y; Kao C-Y; Tsai M-T; Ong S-C; Chen C-H; Lin C-S. 2009. Lipid accumulation and CO_2 utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO_2 aeration. Bioresource Technology. 100, 833–838.

CHU W-L; Phang S-M; Goh S-H. 1996. Environmental effects on growth and biochemical composition of *Nitzschia inconspicua* Grunow. Journal of Applied Phycology. 8, 389-396.

CIFERNO J. P.; Marano J. J. 2002. Benchmarking Biomass Gasification Technologies for Fuels, Chemicals and Hydrogen Production. U.S. Department of Energy.

CLAQUIN P.; Probert I.; Lefebvre S.; Veron B. 2008. Effects of temperature on photosynthetic parameters and TEP production in eight species of marine microalgae. Aquatic Microbial Ecology. 51 (1), 1–11.

CLARENS A.F., Resurreccion E.P., White M.A., Colosi L.M. 2010. Environmental Life Cycle Comparison of Algae to Other Bioenergy Feedstocks. Environ Sci Technol. 44,1813–1819.

COLLOS Y.; Mornet F.; Sciandra A.; Waser N.; Larson A.; Harrison P. J. 1999. An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures. Journal of Applied Phycology. 11, 179–184.

COOK J.R., Heinrich B. 1965. Glucose vs acetate metabolism in Euglena. Journal of Protozoology.12, 581–583.

COSGROVE J.J. 2007. Marine phytoplankton primary production and Ecophysiology using Chlorophyll-A Fluorescence, Thesis presented for the degree of doctor of philosophy of Murdoch University.

COSTA J.A.V.; Morais M.G. 2011. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. Bioresource Technology. 102, 2–9.

COURCHESNE N. M.; Parisien A.; Wang B.; Lan C. Q. 2009. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. Journal of Biotechnology. 141(1-2),31-41.

DASÍ M.J., Miracle M.R., Camacho A., Soria J.M., Vicente E. 1998. Summer phytoplankton assemblages across trophic gradients in hard-water reservoirs. Hydrobiologia 370, 27-43.

DAY J.D., Edwards A.P., Rodgers G.A. 1991. Development of an industrial-scale process for the heterotrophic production of a microalgal mollusc feed. Bioresource Technology. 38, 245–250.

DAYANANDA C., Sarada R., Usha Rani M., Shamala T.R., Ravishankar G.A. 2007. Autotrophic cultivation of *Botryococcus braunii* for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides in various media. Biomass Bioenerg. 31,87–93.

DE LA JARA A.; Mendoza H.; Martel A.; Molina C.; Nordströn L.; De La Rosa V.; Diaz R. 2003. Flow citometric determination of lipid content in a marine dinoflagellate, *Crypthecodinium cohnii.* Journal of Applied Phycology. 15, 433–438.

DEMIRBAS A. 2006. Oily products from mosses and algae via pyrolysis. Energy Sources Part A Recovery Utilization and Environmental Effects.28, 933–40.

DEVI M.P.; Mohan S.V. 2012. CO_2 supplementation to domestic wastewater enhances microalgae lipid accumulation under mixotrophic microenvironment: Effect of sparging period and interval. Bioresource Technology. 112, 116–123.

DIJKSTRA A.J. 2006. Revisiting the formation of trans isomers during partial hydrogenation of triacylglycerol oils. Eur J Lipid Sci Tech. 108, 249–64.

DOUCHA J.; Livansky K. 1995. Novel outdoor thin-layer high density microalgal culture system: Productivity and operational parameters. Algological Studies 76, 129–147.

DRAGONE G.; Fernandes B.D.; Abreu A. P.; Vicente A. A.; Teixeira J. A. 2011. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. Applied Energy. 88, 3331–3335.

DROOP M.R. 1955. Carotogenesis in Haematococcus pluvialis. Nature, London 175, 42.

DROOP M.R. 1974. Heterotrophy of carbon. In Stewart WDP (ed.), Algal Physiology and Biochemistry. Blackwell, Oxford, 530–559.

DUBOIS M.; Gilles K. A.; Hamilton J. K.; Rebers P. A.; Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry. 28, 350–356.

DUNAHAY T. G.; Jarvis E. E.; Roessler P. G. 1995. Genetic transformation of the diatoms C*yclotella cryptica* and *Navicula saprophila*. Journal of Phycology. 31, 1004–1012.

DUNAHAY T. G.; Jarvis, E. E.; Dais S. S.; Roessler P. G. 1996. Manipulation of microalgal lipid production using genetic engineering. Applied Biochemistry and Biotechnology. 57–58, 223–231.

EISSLER Y, Wang K, Chen F, Wommack K.E., Coats D.W. 2009. Ultrastructural characterization of the lytic cycle of an intranuclear virus infecting the diatom *chaetoceros cf. wighamii (bacillariophyceae)* from chesapeake bay, USA. Journal of Phycology. 45, 787–797.

ENDO H., Sansawa H., Nakajima K. 1977. Studies on *Chlorella regularis*heterotrophic fast growing strain. II. Mixotrophic growth in relation to light intensity and acetate concentration. Plant Cell Physiol. 18,199–205.

FAJARDO A. R., Esteban Cerdán L.; Robles Medina A.; Muñío Martínez M. M.; Hita Peña E.; Molina Grima E. 2006. Concentration of Eicosapentaenoic Acid by Selective Esterification Using Lipases. JAOCS. 83 (3), 215-221.

FALKOWSKI P.G.; Raven J.A. 2007. Aquatic Photosynthesis: Second Edition published by Princeton University Press and copyrighted.

FEINBERG D. 1984. Fuel Options from microalgae with representative chemical composition. Solar Energy Research Institute, SERI/TR—231-2427. UC Category: 61a. DE84013019, Department of Energy, No. DE-AC02-83CH10093.

FIDALGO P. J.; Cid A.; Torres E.; Sukenik A.; Herrero C. 1998. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. Aquaculture. 166, 105–116.

FLAIM G.; Obertegger U.; Guella G. 2012. Changes in galactolipid composition of the cold freshwater dinoflagellate *Borghiella dodgei* in response to temperature. Hydrobiologia. Article in press.

FOLCH J.; Lees M.; Sloane-Stanley G. H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. Journal of Biological Chemistry. 226, 497–509.

FUENTES M. M. R.; Garcıa-Sanchez J. L.; Fernandez-Sevilla J. M.; Acién-Fernández F.G.; Sánchez-Pérez J. A.; Molina-Grima E. 1999. Outdoor continuous culture of *Porphyridium cruentum* in a tubular photobioreactor: quantitative analysis of the daily cyclic variation of culture parameters. Journal of Biotechnology. 70, 271–288.

GARCÍA, M.C.C., Camacho F.G., Mirón A.S., Sevilla J.M.F., Chisti Y., Molina Grima E. 2006. Mixotrophic Production of Marine Microalga *Phaeodactylum tricornutum* on Various Carbon Sources. Journal of Microbiology and Biotechnology. 16, 689–694.

GARCÍA-GONZÁLEZ M., Moreno J., Manzano J.C., Florencio F.J., Guerrero M.G. 2005. Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis-β-carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. Journal of Biotechnology. 115, 81–90.

GENTY B., Briantais J.M., Baker N.R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence.Biochim Biophys Acta. 990,87–92.

GHIRARDI M. L.; Zhang J. P.; Lee J. W.; Flynn T.; Seibert M.; Greenbaum E. et al. 2000. Microalgae: a green source of renewable H2. Trends in Biotechnology. 18, 506–11.

GLADUE R.M. 1991. Heterotrophic microalgae production: Potential for application to aquaculture feeds. In Fulks W., Main K.L. (eds), Rotifer and Microalgae Culture Systems, Oceanic Institute, Honolulu, 275–286.

GLADUE R.M., Maxey J.E. 1994. Microalgal feeds for aquaculture. Journal of Applied Phycology 6, 131–141.

GONZÁLEZ M. J. I.; Medina A. R.; Molina Grima, E.; Giménez A. G.; Carstens M.; Cerdána L. E. 1998. Optimization of Fatty Acid Extraction from *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 640 Biomass. JAOCS. 75 (12), 1735-40.

GRIFFITHS M.J., Harrison S.T.L. 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. Journal of Appllied Phycology. 21,493–507.

GUIHÉNEUF F.; Mimouni V.; Ulmann L.; Tremblin G. 2009. Combined effects of irradiance level and carbon source on fatty acid and lipid class composition in the microalga *Pavlova lutheri* commonly used in mariculture. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 369, 136–143.

GUILLARD R. R. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith W. L.; Chanley M. H. [eds.], Culture of Marine Invertebrate Animals. New York plenum, 29-60.

HERZIG R. R.; Falkowski P. G. 1989. Nitrogen limitation in *Isochrysis galbana* (haptophycea) i. Photosynthpitic energy conversion and growth efficiencies. Journal of Phycology. 25, 462-471.

HIRANO K., Hon-Namia S., Kunitoa M., Hadab Y., Ogushib. 1998. Temperature effect on continuous gasification of microalgal biomass: theoretical yield of methanol production and its energy balance. Catalysis Today. 45, 399-404.

HITCHINGS M. A.; "Algae: the Next Generation of Biofuels," *Fuel*, 2007, Hart Energy Publishing, Houston, TX.

HO S-H.; Chen C-Y.; Chang J-S. 2012. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO_2 fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. Bioresource Technology. 113, 244-252.

HO T-Y; Quigg A.; Finkel Z. V.; Milligan A. J.; Wyman K.; Falkowski P. G.; Morel F. M. M. 2003. The elemental composition of some marine phytoplankton. Journal of Phycology. 39, 1145–1159.

HOFFMANN M.; Marxen K.; Schulz R.; Vanselow K. H. 2010. TFA and EPA Productivities of *Nannochloropsis salina* Influenced by Temperature and Nitrate Stimuli in Turbidostatic Controlled Experiments. Marine Drugs. 8, 2526-45.

HSIEH, C-H., Wu, W-T., 2009. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. Bioresource Technology. 100, 3921–26.

HU Q., Sommerfeld M., Jarvis E., Ghirardi M., Posewitz M., Seibert M., Darzins A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. The Plant Journal. 54, 621–639.

HU Q.; Richmond A. 1994. Optimizing the population density in *Isochrysis galbana* grown outdoors in a glass column photobioreactor. Journal of Applied Phycology. 6, 391–396.

HU Q.;Guterman H.; Richmond A. 1996. A flat inclined modular photobioreactor (FIMP) for outdoor mass cultivation of photoautotrophs. Biotechnology and Bioengineering. 51, 51–60.

HUANG A. G.; Chen F.; Wei D.; Zhang X.; Chen G. 2010. Biodiesel production by microalgal biotechnology. Applied Energy. 87, 38–46.

IEA. Biogas Production and Utilisation. 2005. Disponível em: http://www.novaenergie.ch/iea-bioenergy-task37

ILLMAN A.M.; Scragg A.H.; Shales S.W**.** 2000. Increase in Chlorella strains calorific values when grown in low nitrogen medium. Enzyme and Microbial Technology. 27, 631-648.

JACOB-LOPES E., Lacerda L.M.C.F., Franco T.T. 2008. Biomass production and carbon dioxide fixation by *Aphanothece microscopica Nageli* in a bubble column photobioreactor. Biochemical Engineering Journal. 40,27–34.

JENSEN S.; Knutsen G. 1993.Influence of light and temperature on photoinhibition of photosynthesis in *Spirulina platensis*. Journal of Applied Phycology. 5, 495-504.

JIANG Y.; Chen F. 2000. Effects of Temperature and Temperature Shift on Docosahexaenoic Acid Production by the Marine Microalga *Crypthecodinium cohnii*. JAOCS. 77 (6), 613-617.

JIMENEZ C., Cossio B.R., Labella D., Niell F.X 2003. The feasibility of industrial production of *Spirulina (Arthrospira)* in southern Spain. Aquaculture. 217, 179–190.

KAEWPINTONG K.; Shotipruk A.; Powtongsook S.; Pavasant P. 2007. Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor. Bioresource Technology. 98, 288–295.

KANAZAWA Z., Fujita C., Yuhara T., Sasa T. 1958. Mass culture of unicellular algae using the “open pond circulation method”. J. Gen. Appl. Microbiol. 4,135–139.

KAPLAN D.; Cohen Z.; Abeliovich A. 1986. Optimal growth conditions for *Isochrysis galbana* Biomass. 9(1), 37-48.

KNUCKEY R. M.; Brown M. R.; Robert R.; Frampton D. M. F. 2006. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. Aquacultural Engineering. 35, 300–313.

KOBAYASHI M., Kakizono T., Yamaguchi K., Nishio N., Nagai S. 1992. Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions. Journal of Fermentation and Bioengineering. 74,12–20.

KOBAYASHI M., Kurimura Y., Tsuji Y. 1997. Light-independent astaxanthin production by the green microalga *Haematococcus pluvialis* under salt stress. Biotechnology Letters. 19, 507–509.

KRICHNAVARUK S.; Loataweesup W.; Powtongsook S.; Pavasant P. 2005. Optimal growth conditions and the cultivation of *Chaetoceros calcitrans* in airlift photobioreactor. Chemical Engineering Journal. 105, 91–98.

KROMKAMP J., Peene J. 1999. Estimation of phytoplankton photosynthesis and nutrient limitation in the eastern scheldt estuary using variable fluorescence. Aquatic Ecology. 33, 101–104.

KURANO N.; Ikemoto H.; Miyashita H.; Hasegawa T.; Hata H.; Miyachi S. 1995. Fixation and Utilization of Carbon Dioxide by Microalgal Photosynthesis. Energy Conversion and Management. 36 (6-9) 689-692.

LARDON L., Hélias A., Sialve B., Steyer J.P., Bernard O. 2009. Life-Cycle Assessment of Biodiesel Production from Microalgae. Environmental Science Technology. 43,6475–6481

LAVÍN P.L., Lourenço S.O. 2005. An evaluation of the accumulation of intracellular inorganic nitrogen pools by marine microalgae in batch cultures. Brazilian Journal of Oceanography. 53(1/2), 55-68.

LAWS E.A., Terry K.L., Wickman J., Chalup M. 1983 A simple algal production system designed to utilise the flashing light effect. Biotechnology and Bioengineering 25, 2319– 2335.

LEE Y. K. Ding S. Y.; Low C. S.; Chang Y. C.; Forday W. L.; Chew P. C. 1995. Design and performance of an α-type tubular photobioreactor for mass cultivation of microalgae. Journal of Applied Phycology. 7, 47–51.

LEE Y. K. 2001. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and Potential. Journal of Applied Phycology. 13, 307–315.

LEE Y. K.; Low C. S. 1991. Effect of photobioreactor inclination on the biomass productivity of an outdoor algal culture. Biotechnology and Bioengineering. 38, 995–1000.

LEWIN J.C., Lewin R.A. 1967. Culture and nutrition of some apochlorotic diatoms. Journal of General Microbiology 11, 361–367.

LEWIS, E.; Wallace D. 1998. Program developed for CO2 System calculation. Carbon Dioxide Information Analysis Center Oak Ridge National Laboratory, Oak

Ridge, Tennessee, U.S.A. Disponível em: http://cdiac.ornl.gov/oceans/co2rprt.html#preface

LI Y.; Horsman M.; Wu N.; Lan C. Q.; Dubois-Calero N. 2008. Biofuels from Microalgae. Biotechnology Progress. 24, 815-820.

LIU Y.; Guan Y.; Gao Q.; Tam N. F. Y.; Zhu W. 2010. Cellular responses biodegradation and bioaccumulation of endocrine disrupting chemicals in marine diatom Navicula incerta. Chemosphere. 80, 592–599.

LIU C-P and Lin L-P. 2001.Ultrastructural study and lipid formation of *Isochrysis* sp. CCMP1324. Botanical Bulletin of Academia Sinica. 42, 207-214.

LIU Z-Y, Wang G-C, Zhou B-C. 2008. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. Bioresource Technology. 99, 4717–22.

LOURENÇO O. S.; Barbarino E.; Marquez L. M. U.; Aidar E. 1998. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: basis for the calculation of specific nitrogen-to-protein conversion factors. Journal of Phycology. 34**,** 798–811.

MA F.; Hann M. A. 1999. Biodiesel production: a review. Bioresource Technology. 70, 1-15.

MARCHETTI J.; Bougaran G.; Le Dean L. *et al.* 2012. Optimizing conditions for the continuous culture of Isochrysis affinis *galbana* relevant to commercial hatcheries. Aquaculture, 326-329,106-115.

MARQUEZ F.J., Nishio N., Nagai S. 1995. Enhancement of biomass and pigment production during growth of *Spirulina platensis* in mixotrophic culture. Journal of Chemical Technology & Biotechnology 62, 159–164.

MARSOT P.; Pelletier É.; St-Louis R. 1995. Effects of *Triphenyltin Chloride* on Growth of the Marine microalga *Pavlova lutheri* in continuous culture. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 54, 389-395.

MARTINEZ F., Orus M.I. 1991. Interactions between glucose and inorganic carbon metabolism in *Chlorella vulgaris* strain UAM101. Plant Physiology. 95,1150–55.

MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ E., Acosta-Salmón H., Southgate P.C. 2006. The nutritional value of seven species of tropical microalgae for black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera, L.*) larvae. Aquaculture. 257,491–503.

MASOJÍDEK J.; Papácek Š.; Sergejevová M. *et al.* 2003. A closed solar photobioreactor for cultivation of microalgae under supra-high irradiance: basic design and performance. Journal of Applied Phycology. 15, 239–248.

MATA M. T.; Martins A. A.; Caetano S. N. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 14, 217–232.

MEINERZ L.I. 2007. Influência da Temperatura, salinidade e nutrientes dissolvidos (N e P) no cultivo de microalgas de água estuarina e costeira. Dissertação, Universidade Federal do Rio Grande.

MESECK S.L.; Smith B.C.; Wikfors G.H.; Alix J.H.; Kapareiko D. 2007. Nutrient interactions between phytoplankton and bacterioplankton under different carbon dioxide regimes. Journal of Applied Phycology. 19, 229–237.

MIAO X.; Wu Q. 2004. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. Journal of Biotechnology. 110, 85–93.

MIAO X.; Wu Q. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. Bioresource Technology. 97, 841–846.

MIRÓN A. S.; García M. C. C.; Gómez A. C.; Camacho F. G.; Grima E. M.; Chisti Y. 2003. Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. Biochemical Engineering Journal. 16, 287–297.

MIRON A. S.; Gomez A. C.; Camacho F. G.; Grima E. M.; Chisti Y. 1999. Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae. Journal of Biotechnology. 70, 249–270.

MOAZAMI-GOUDARZI M., Colman, B. 2012. Changes in carbon uptake mechanisms in two green marine algae by reduced seawater pH. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 413, 94–99.

MOHAN D.; Pittman Jr. C. U.; Steele P. H. 2006. Pyrolysis of Wood/Biomass for Bio-oil: A Critical Review. Energy & Fuels. 20, 848 – 889.

MOHEIMANI N.R., Borowitzka M.A. 2006.The long-term culture of the coccolithophore *Pleurochrysis carterae* (Haptophyta) in outdoor raceway ponds. Journal of Applied Phycology.18, 703–712.

MOLINA GRIMA E, Belarbi E-H, Acién Fernández FG, Robles Medina A, Chisti Y. 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. Biotechnology Advances. 20, 491–515.

MOLINA GRIMA E.; Fernández J.; Acién F. G.; Chisti Y. 2001. Tubular Photobioreactor Design for Algal Cultures. Journal of Biotechnology. 92, 113-131.

MOLINA GRIMA E.; Sánchez Pérez J. A.; Camacho F. G.; Fernández Sevilla J. M.; Acién Fernández F. G. 1996a. Productivity analysis of outdoor chemostat

culture in tubular air-lift photobioreactors. Journal of Applied Phycology. 8, 369-380.

MOLINA GRIMA E.; Sánchez Pérez J. A.; Camacho F. G.; García Sánchez J. L.; Acién Fernández F. G.; Alonso D. L. 1994. Outdoor culture of *Isochrysis galbana* ALII-4 in a closed tubular photobioreactor. Journal of Biotechnology. 37 (2), 159-166.

MOLINA GRIMA E; Femtidez Sevilla J.M.; Sanchez Perez J.A.; Garcia Camacho F. 1996b. A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. Journal of Biotechnology. 45, 59-69.

MONTEIRO J.G.M., Araújo O.Q.F., Medeiros J.L. 2009. Sustainability metrics for eco-technologies assessment, Part II. Life cycle analysis. Clean Technologies Environmental Policies.11, 459-472.

MORENO J., Vargas A., Rodriguez H., Rivas J., Guerrero M.G. 2003. Outdoor cultivation of a nitrogen-fixing marine cyanobacterium, *Anabaena sp.* ATCC 33047. Biomolecular Engineering. 20, 191–197.

MURPHY R.; Woods J.; Black M.; McManus M. 2011. Global developments in the competition for land from biofuels. Food Policy. 36, S52–S61.

NAKAMURA T.; Senior C. L.; Olaizola M.; Bridges T.; Flores S.; Sombardier L.; Masutani S. M. 2005. Recovery and Sequestration of CO_2 from Stationary Combustion Systems by Photosynthesis of Microalgae. DOE Contract No. DE-FC26-00NT40934, U.S. Department of Energy National Energy Technology Laboratory, Pittsburgh.

NEENAM B.; Feinberg D.; Hill A. Mclntosh R.; Terry K. 1986. Fuels from Microalgae: Technology Status, Potential, and Research Requirements. SERIISP-231-2550, DE86OlO739, UC Category: 61c, Prepared under Task No. 4513.20, FTP No. 5131986, Prepared for the U.S. Department of Energy, Contract No. DE-AC02-83CH10093.

NELSON D.L.; Cox M.M. 2011. Princípios de bioquímica de Lehninger, quinta edição, Editora ARTMED.

NORLAND S.; Fagerbakke K. M.; Heldal M. 1995. Light element analysis of individual bacteria by x-ray microanalysis. Applied and Environmental Microbiology. 61 (4), 1357–1362.

OGAWA T., Aiba S. 1981. Bioenergetic analysis of mixotrophic growth in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus.* Biotechnology and Bioengineering. 23, 1121–32.

OGBONNA J.C., Tomiyama S., Tanaka H. 1998 Heterotrophic cultivation of Euglena gracilis Z for efficient production of α-tocopherol. Journal of Applied Phycology. 10, 67–74.

OHSE, S.; Derner R. B.; Ozório R. A.; Braga M. V. C.; Cunha P.; Lamarca C. P.; Santos M. E. 2008. Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário. Biotemas. 21(2), 7-18.

OLAIZOLA M. 2000. Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. Journal of Applied Phycology. 12, 499–506.

OLAIZOLA M. 2003. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. Biomolecular Engineering. 20, 459-466.

OLOFSSON I.; Nordin A.; Söderlind U. 2005. Initial Review and Evaluation of Process Technologies and Systems Suitable for Cost-Efficient Medium-Scale Gasification for Biomass to Liquid Fuels. ETPC Report. University Umeå e Mid Swedish University. Suécia.

OTERO A.; García D.; Fábregas J. 1997. Factors Controlling Eicosapentaenoic Acid Production in Semicontinuous Cultures of Marine Microalgae. Journal of Applied Phycology. 9, 465-469.

OUKARROUM A.; Perreault F.; Popovic R. 2012. Interactive effects of temperature and copper on photosystem II photochemistry in *Chlorella vulgaris* Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 110, 9–14.

PAHL S.L., Lewis D.M., Chen F., King K.D. 2010. Heterotrophic growth and nutritional aspects of the diatom *Cyclotella cryptica (Bacillariophyceae)*: Effect of some environmental factors. J Biosci Bioeng. 109,235–239.

PALMUCCI, M., Ratti, S., Giordano, M., 2011. Ecological and evolutionary implications of carbon allocation in marine phytoplankton as a function of nitrogen availability: a fourier transform infrared spectroscopy approach. Journal of Phycology. 47, 313-323.

PATNI N. J.; Dhawale S. W.; Aaronson S. 1977. Extracellular phosphatases of *Chlamydomonas reinhardi* and their regulation. Journal of Bacteriology. 130(1), 205-211.

PICARDO M. C.; de Medeiros J. L.; Monteiro J. G. M.; Chaloub R. M.; Giordano M.; Araújo O. Q. F. 2012. A methodology for screening of microalgae as a decision making tool for energy and green chemical process applications. Journal of Clean Technologies and Environmental Policy. DOI: 10.1007/s10098-012-0508-z, *article in press*.

PITTMAN J.K.; Dean A.P.; Osundeko O. 2011. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. Bioresource Technology. 102,17–25.

PIZARRO C.; Mulbry W.; Blerscha D.; Kangasa P. 2006. An economic assessment of algal turf scrubber technology for treatment of dairy manure effluent. Ecological Engineering. 26(4), 321-327.

POSTEN C. 2009. Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. Engineering in Life Sciences. 9, 165–77.

POWELL, N., Shilton, A.N., Pratt, S., Chisti, Y. 2008. Factors influencing luxury uptake of Phosphorus by microalgae in waste stabilization ponds. Environmental Science Technology 42, 5958–5962.

PRATOOMYOT J.; Srivilas P.; Noiraksar T. 2005. Fatty acids composition of 10 microalgal species. Songklanakarin Journal of Science and Technology 27(6), 1179-1187.

PUSHPARAJ B., Pelosi E., Tredici M.R., Pinzani E., Materassi R. 1997. An integrated culture system for outdoor production of microalgae and cyanobacteria. Journal Applied Phycology. 9, 113–119.

RAGHAVAN G.; Haridevim C. K.; Gopinathan C. P. 2008. Growth and proximate composition of the *Chaetoceros calcitrans f. pumilus* under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. Aquaculture Research. 39, 1053-1058.

RENAUD S. M.; Thin L. V.; Lambrinidis G.; Parry D. L. 2002. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microagae grown in batch culture. Aquaculture. 211, 195-214.

RENAUD S.M., Thinh L.V., Parry D.L. 1999. The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. Aquaculture. 170,195-214.

RICHMOND A.; Lichtenberg E.; Stahl B.; Vonshak A. 1990. Quantitative assessment of the major limitations on productivity of *Spirulina platensis* in open raceways. Journal of appllied Phycology. 2, 195–206.

RIVERO-RODRIGUEZ S.; Beaumont A. R.; Lora-Vilchis M. C. 2007. The effect of microalgal diets on growth, biochemical composition and fatty acid profile of *Crassostrea corteziensis* (Hertlein) juveniles. Aquaculture. 263, 199-210.

ROESLER K.; Shintani D.; Savage L.; Boddupalli e Ohlrogge J. 1997. Targetting of the A*rabidopsis homomeric* Acetyl-Coa Carboxylase to plastids of rapeseeds. Plant Physiol. 113, 75-81.

ROSENBERG J. N.; Oyler G. A.; Wilkinson L.; Betenbaugh M. J. 2008. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. Current Opinion in Biotechnology.19, 430–436.

ROSENBERG J.N.; Mathias A.; Korth K., Betenbaugh M.J., Oyler G.A. 2011. Microalgal biomass production and carbon dioxide sequestration from an integrated ethanol biorefinery in Iowa: A technical appraisal and economic feasibility evaluation. Biomass and Bioenergy. 3 5, 3 8 6 5-7 6.

RUNNING J.A., Huss R.J., Olson P.T. 1994. Heterotrophic production of ascorbic acid by microalgae. Journal of Applied Phycology. 6, 99–104.

RYU K, Rorrer G.L. 2010. Changes in total lipid contents of marine diatom *Nitzschia frustulum* at various temperatures under Si deficiency. Korean Journal of Chemical Engineering. 27,567-569.

SAMUELSON G., Lonneborg A., Rosenqvist E., Gustafsson, P., Oquist G. 1985. Photoinhibition and reactivation of photosynthesis in the cyanobactetium *Anactys nidulans*. Plant Physiol. 79, 992-995.

SÁNCHEZ A., Maceiras R., Cancela A., Pérez A. 2012. Culture aspects of *Isochrysis galbana* for biodiesel production. Applied Energy. *article in press*.

SANCHEZ J. F.; Fernandez J. M.; Acie F. G.; Rueda A.; Perez-Parra J.; Molina Grima E. 2008. Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. Process Biochemistry. 43, 398–405.

SANDNES J. M.; Källqvist T.; Wenner D.; Gislerød H. R. 2005. Combined influence of light and temperature on growth rates of *Nannochloropsis oceanica*: linking cellular responses to large-scale biomass production. Journal of Applied Phycology. 17, 515–525.

SAOUDI-HELIS L.; Dubacq J.P.; Marty Y.; Samain J.F.; Gudin C. 1994. Influence of growth rate on pigment and lipid composition of the microalga *Isochrysis aff. galbana* clone *T.iso*. Journal of Applied Phycology. 6 (3), 315–322.

SATO T.; Yamada D.; Hirabayashi S. 2010. Development of virtual photobioreactor for microalgae culture considering turbulent flow and flashing light effect. Energy Conversion and Management 51,1196–1201.

SCHENK P. M.; Thomas-Hall S. R.; Stephens E.; Marx U. C.; Mussgnug J. H.; Posten C.; Kruse O.; Hankamer B. 2008. Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. Bioenerg. Res. 1, 20-43.

SCRAGGI A.H.; Illman A.M.; Carden A.; Shales S.W. 2002. Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor. Biomass and Bioenergy. 23, 67-74.

SENSOZ S.; Demiral I.; Gercel H. F. 2006. Olive bagasse (*Olea europea L.)* pyrolysis. Bioresource Technology. 97, 429–436.

SINGH R.N., Sharma S. 2012. Development of suitable photobioreactor for algae production – A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 16, 2347–2353.

SPECTOR C.; Gobbi C. N.; Conceição R. C.; Araújo O. Q. F.; Chaloub R. M. 2008. Cultivo de Microalgas para Seqüestro de CO_2, XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Recife-PE.

SPOLAORE P.; Joannis-Cassan C.; Duran E.; Isambert A. 2006. Commercial applications of microalgae. Journal Biosci. Bioeng. 101, 87–96.

STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER 11th. ed. New York : American Public Health Association, 1960. xxi, 626 p.

STEPHENSON P.G.; Moore C.M.; Terry M.J.; Zubkov M.V.; Bibby T.S. 2011. Improving photosynthesis for algal biofuels: toward a green revolution. Trends in Biotechnology. 29 (12), 615-623.

SUKENIK A.; Wahnon, R. 1991. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition: I. *Isochrysis galbana*. Aquaculture. 97(1), 61–72.

SUNLU F.S., Kutlu B., Buyukisik H.B. 2010. Comparison of growth kinetcs of *Chaetoceros gracilis* isolated from two different areas in the Aegean sea (the bay of Izmir and the Homa Lagoon). J. Anim Vet adv. 9,1796-1803.

TAKAGI M., Watanabe K., Yamaberi K., Yoshida T. 2000. Limited feeding of potassium nitrate for intracellular lipid and triglyceride accumulation of *Nannochloris sp.* UTEX LB1999, Appl. Microbiol. Biotechnol. 54, 112-117.

TAN C.K., Johns M.R. 1991. Fatty acid production by hetrotrophic *Chlorella saccharophila.* Hydrobiologia 215,13–19.

THOMAS W. H.; Tornabene T. G; Weissman J. 1984. Screening for lipid yield microalgae: activities for 1983. SERI/STR-231-2207, U. S. Department of Energy.

THOMAS W.H., Seibert D.L.R., Alden M., Eldridge P., Neori A. 1983. Yields, Photosynthetic Efficiencies, and Proximate Chemical Composition of Dense Cultures of Marine Microalgae. Institution of Oceanography University of California at San Diego. U.S. Department of Energy.

TORZILLO G.; Pushparaj B.; Bocci F.; Balloni W.; Materassi R.; Florenzano G. 1986. Production of Spirulina biomass in closed photobioreactors. Biomass. 11, 61–74.

TRAVIESO L.; Hall D.O.; Rao K.K.; Benítez F.; Sánchez E.; Borjac R. 2001. A helical tubular photobioreactor producing Spirulina in a semicontinuous mode. International Biodeterioration and Biodegradation. 47, 151–155.

TREDICI M. R. 1999. Encyclopedia of Bioprocess Technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation; Flickinger, M.C., Drew, S.W., Eds.; Wiley: New York, 1, 395-419.

TREDICI M.R.; Carlozzi P.; Zittelli C.G.; Materassi R. 1991. A vertical aveolar panel (VAP) for outdoor mass cultivation of microalgae and cyanobacteria. Bioresource Technology. 38, 153–159.

TSAVALOS A.J., Day J.G. 1994. Development of media for the mixotrophic/heterotrophic culture of *Brachiomonas submarina*. Journal of Applied Phycology. 6, 431–433.

TZOVENIS I.; De Pauw N.; Sorgeloos P. 2003. Optimisation of T-Iso biomass production rich in essential fatty acids I. Effect of different light regimes on growth and biomass production. Aquaculture. 216, 203–222.

TZOVENIS I.; Fountoulaki E.; Dolapsakis N. et al. 2009. Screening for marine nanoplanktic microalgae from Greek coastal lagoons (Ionian Sea) for use in mariculture. Journal Applied Phycology. 21, 457–469.

UDUMAN N.; Ying Q.I.; Danquah K. M.; Forde M. G.; Hoadley A. 2010. Dewatering of microalgal cultures: a major bottleneck to algae-based fuels. Journal of Renewable and Sustainable Energy. 2, 012701-15.

UGWU C. U.; Aoyagi H.; Uchiyama H. 2008. Photobioreactors for Mass Cultivation of Algae. Bioresource Technology. 99, 4021–4028.

UGWU C. U.; Ogbonna J. C.; Tanaka H. 2005. Light/Dark Cyclic Movement of Algal Cells in Inclined Tubular Photobioreactors With Internal Static Mixers for Efficient Production of Biomass. Biotechnology Letters. 27, 75-78.

VALENZUELA-ESPINOZA E., Millán-Núnez R., Núnez-Cebrero F. 2002. Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll a content in *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. Aquacultural Engineering. 25,207– 216.

VAN BERGEIJK S.A., Salas-Leiton E., Canavate J.P. 2010. Low and variable productivity and low efficiency of mass cultures of the haptophyte *Isochrysis aff. galbana (T-iso)* in outdoor tubular photobioreactors. Aquacultural Engineering. 43,14–23.

WANG L, Min M, Li Y, Chen P, Chen Y, Liu Y, Wang Y, Ruan R. 2009. Cultivation of Green Algae *Chlorella sp.* in Different Wastewaters from Municipal Wastewater Treatment Plant. Appl Biochem Biotech. 162,1174-86.

WATANABE Y., Delanoue J., Hall D.O. 1995. Photosynthetic performance of a helical tubular photobioreactor incorporating the cyanobacterium *Spirulina platensis*, Biotechnology and Bioengeering 47, 261–269.

WATANABE, Y., Hall, D.O., 1996. Photosynthetic production of the filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* in a cone-shaped helical tubular photobioreactor. Appl. Microbiol. Biotechnol. 44, 693–698.

WEILAND P. 2000. Anaerobic waste digestion in Germany – Status and recent developments. Biodegradation. 11, 415–421.

WEN Z-Y; Chen F. 2000. Heterotrophic production of eicosapentaenoid acid by the diatom *Nitzschia laevis*: effects of silicate and glucose. Journal of industrial microbiology and biotechnology. 25, 218-224.

WENDER I. 1996. Reactions of synthesis gas. Fuel Process Technol. 48,189-297.

WILHELM C.; Selmar D. 2011. Energy dissipation is an essential mechanism to sustain the viability of plants:The physiological limits of improved photosynthesis. Journal of Plant Physiology.168, 79–87.

WILTSHIRE K. H.; Boersma M.; Möller A.; Buhtz H. 2000. Extraction of pigments and fatty acids from the green alga *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). Aquatic Ecology 34, 119–126.

WU L.F., Chen P.C., Huang A.P., Lee C.M. 2012.The feasibility of biodiesel production by microalgae using industrial wastewater. Bioresource Technology.113, 14–18.

WU S. T.; Yu S. T.; Lin L. P. 2005. Effect of culture conditions on docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium sp.* S31. Process Biochemistry. 40, 3103–3108.

WU Z. C.; Zmora O.; Kopel R.; Richmond A. 2001. An industrial-size flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis sp.* Eustigmatophyceae. Aquaculture. 195, 35–49.

XIN L.; Hong-Ying H.; Ke G.; Ying-Xue S. 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalgae *Scenedesmus sp.* Bioresource Technology. 101, 5494–5500.

YANG C.; Hua Q.; Shimizu K. 2000. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic. Biochemical Eng Journal. 6, 87-102.

YANG Y.; Gao K. 2003. Effects of CO_2 concentrations on the freshwater microalgae, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* (*Chlorophyta*). Journal of Applied Phycology. 00, 1–11.

YINGYING S.; Changhai W. 2009. The optimal growth conditions for the biomass production of *Isochrysis galbana* and the effects that phosphorus, Zn^{2+}, CO_2 , light intensity have on the biochemical composition of *Isochrysis galbana* and the activity of extracellular CA. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 14, 225-231.

YOO C., Jun S-Y, Lee J-Y, Ahn C-Y, Oh H-M. 2010. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. Bioresource Technology. 101, S71–S74

ZEILER K.G.; I-ieacox D. A.; Toon S. T.; Kadam K. I.; Brownthe L. M. 1995. Use of microalgae for assimilation and utilization of carbon dioxide from fossil fuel-fired power plant flue gas. Energy Conversion and Management. 36(6-9), 707-712.

ZEPKA L.Q., Jacob-Lopes E., Goldbeck R., Queiroz M.I. 2008. Production and biochemical profile of the microalgae *Aphanothece microscopica Nägeli* submitted to different drying conditions. Chemical Engineering and Processing. 47, 1305–1310.

ZHANG C.W., Richmond A. 2003. Sustainable, High-Yielding Outdoor Mass Cultures of *Chaetoceros muelleri var. subsalsum* and *Isochrysis galbana* in Vertical Plate Reactors Marine Biotechnology. 5, 302–310.

ZHANG J.; Toghiani H.; Mohan D.; Pittman Jr. C. U.; Toghiani R. K. 2007. Product Analysis and Thermodynamic Simulations from the Pyrolysis of Several Biomass Feedstocks. Energy and Fuels. 21, 2373 – 2385.

ZHANG K., Kurano N., Miyachi S. 1999. Outdoor culture of a cyanobacterium with a vertical flat-plate photobioreactor: effects on productivity of the reactor orientation, distance setting between the plates and culture temperature. Applied Microbiology and Biotechnology. 52,781–786.

ZHILA N.O., Kalacheva G.S., Volova T.G. 2005. Influence of nitrogen deficiency on biochemical composition of the green alga *Botryococcus*. Journal of Applied Phycology 17,309–315.

ZHU J.C.; Lee K.Y. 1997. Determination of biomass dry weight of marine microalgae. Journal of Applied Phycology. 9,189–194.

ZHU J.C.; Lee K.Y.; Chao M. T. 1997. Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. Journal of Applied Phycology. 9, 451–457.

ZITTELLI G.C., Rodolfi L., Tredici M.R. 2003. Mass cultivation of *Nannochloropsis sp.* in annular reactors. Journal of Applied Phycology 15, 107–114.

ZOU, N., Richmond, A. 1999. Effect of light path length in at plate reactors outdoors on output rate of cell mass and of EPA in *Nannochloropsis sp*. Journal of Biotechnology. 70, 351-356.

ANEXO 1-PLANILHAS DO PROGRAMA CO2SYS

Microsoft Excel - CO2SYS_12.07 saída 19.08

Arquivo Editar Exibir Inserir Formatar Ferramentas Dados Janela Ajuda

Digite uma pergunta

Comic Sans MS 12 85%

A2 About this Macro

The code for this Macro was taken directly from Ernie Lewis' "CO2SYS.BAS" Basic Program. (See the "INFO" sheet in the macro for contact information).

What it Does...

From two known CO2 parameters (TA, TCO2, pH, pCO2 or fCO2), the program will calculate the other 3,as well as other quantities such as Omega, Revelle Factor, Carbonate species concentrations...(referred to as "Auxiliary Data" in the conditions

What it Doesn't do...

Unlike CO2Sys.BAS, this macro does not calculate the sensitivity of the output on the input(referred to as "Partials" in the original program).

HOW TO RUN THE CO2Sys MACRO.

In Sheet "INFO":
-- You can select which section of the program you want information on by selecting the appropriate option from the top drop-down list. The information will be listed in the text box below.
-- Single click on the text box to make the vertical scroll bar appear and scroll down the text.

In Sheet "INPUT":
-- Select the set of CO2 constants you want to use for the calculations
-- Select the KHSO4
-- Select the pH scale of your data.

In Sheet "Data":
-- If copying from another Excel file, it is suggested to only paste the VALUES in the cells.
-- Input your data in the appropriate columns for Salinity, Temperature (oC) and Pressure (dbars). Total Si and Total P (in umol/kg SW) are optional.
-- Input the CO2 parameters in their respective columns. If more than two are entered, the FIRST TWO from the left will be used. You may use different sets of parameters in different rows.
-- Set the output conditions at which you want your results.
-- Click the red "Start" Button located on the top left part of the "Data" sheet.
-- Calculations will stop when an entire row of data (columns "A" to "L") is empty.
-- You can either clear your data (columns "A" to "L") or clear the results (columns "L" to the end) by clicking on the appropriate button located on top of the column "M" in this sheet.

After the program starts:
-- You will be asked if you entered your data properly...this gives you a chance to cancel your action.
-- You will be asked if you want to calculate the "Auxiliary Data". This corresponds to Omega, Revelle Factor...etc...any column right of the pCO2 column in both the "Input Conditions" and the "Output Conditions" sections. Choosing "N
-- Results at the "Input Conditions" are posted in columns "Q" to "AK" and are labeled "in". Those at the "Output Conditions" are posted in columns "AM" to "BB" and are labeled "out".
-- If Pressure, Total P or Total Si are missing, equal to -999, or -9, their value is set to zero and the calculation performed anyway. In this case, the whole corresponding row is colored in red and column "BC" (labeled "SubFlag") will menti

INFO INPUT DATA

Desenhar AutoFormas

Pronto NÚM

Iniciar 3 Adobe Reader dados fotobiorrea... Tese Marta FINAL... anexos - Microsof... Microsoft Excel - ... PT 23:14

Microsoft Excel - CO2SYS_12.07 saída 19.08

	A	B	C
1	***Set of Constants***	***KHSO4***	***pH Scale***
2	K1, K2 from Roy, et al, 1993	Dickson	Total scale (mol/kg-SW)
3	K1, K2 from Goyet and Poisson, 1989	Khoo et al	Seawater scale (mol/kg-SW)
4	K1, K2 from Hansson, 1973 refit by Dickson and Millero, 1987		Free scale (mol/kg-SW)
5	K1, K2 from Mehrbach et al, 1973 refit by Dickson and Millero, 1987		NBS scale (mol/kg-H2O)
6	K1, K2 from Hansson and Mehrbach refit by Dickson and Millero, 1987		
7	GEOSECS constants (NBS scale); K1, K2 from Mehrbach et al, 1973		
8	Constants from Peng et al (NBS scale); K1, K2 from Mehrbach et al		
9	Salinity = 0 (freshwater); K1, K2 from Millero 1979		
10	Mojica Prieto, 2000		
11	Mojica Prieto, 2000 Corrected for fCO2		
12	Mojica Prieto, 2000 Corrected for TCO2		
13	Millero, 2006		
14			

INFO / INPUT / DATA

CO2SYS_macro_MAC_PC_2011 saída [Modo de Compatibilidade] - Microsoft Excel uso não comercial

A2 INPUT CONDITIONS

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
2	INPUT CONDITIONS					OUTPUT CONDITIONS		DATA (leave empty if no data)						SCALES and CONSTANTS	
3	Salinity	t(°C)	P (dbars)	Total P (µmol/kgSW)	Total Si (µmol/kgSW)	t(oC)	P (dbars)	TA (µmol/kgSW)	TCO2 (µmol/kgSW)	pH (Chosen Scale)	fCO2 (µatm)	pCO2 (µatm)	Clear DATA <----	DO NOT MODIFY...THE PROGRAM WILL DO IT!	
4	30	25	10	0,0221		28	10	1,4478E+07		7,69				pH Scale:	Seawater scale (mol/kg-SW)
5	30	25	10	0,0305		31,6	10	1,4133E+07		8,05			Clear Results --->		
6	30	25	10	0,0285		34	10	1,4306E+07		8,15				Constants:	K1, K2 from Mehrbach et al, 1973 refit by
7	30	25	10	0,0252		25,2	10	1,4530E+07		8,20					
8	30	25	10	0,0151		27,2	10	1,5616E+07		8,77				KSO4 Source:	Dickson
9	30	25	10	0,0151		36,7	10	1,5426E+07		8,17					
10	30	25	10	0,0151		25,60	10	1,6029E+07		8,65					
11	30	25	10	0,0151		36,10	10	1,5685E+07		7,83					
12	30	25	10	0,0151		40,50	10	1,5426E+07		7,54					

INFO INPUT DATA

Pronto 74%

CO2SYS_macro_MAC_PC_2011 saída [Modo de Compatibilidade] - Microsoft Excel uso não comercial

A2 INPUT CONDITIONS

RESULTS (Output Conditions)

t(oC) out	P (dbars) out	pH out	fCO2 out (µatm)	pCO2 out (µatm)	HCO3 out (µmol/kgSW)	CO3 out (µmol/kgSW)	CO2 out (µmol/kgSW)	B Alk out (µmol/kgSW)	OH out (µmol/kgSW)	P Alk out (µmol/kgSW)	Si Alk out (µmol/kgSW)	Revelle out	ΩCa out	ΩAr out	xCO2 out (dry at 1 atm) (ppm)	SubFlag
28,000	10,0	7,649	7462450,3	7485475,0	13195202,3	641403,4	201883,7	37,1	3,2	0,0	0,0	18,999	16172,00	10626,76	7770531,0	
31,600	10,0	7,952	3321653,3	3331469,3	11569045,5	1282103,1	82640,7	72,7	8,8	0,0	0,0	13,320	32697,96	21740,61	3488885,4	
34,000	10,0	8,016	2806981,3	2815043,8	11185598,8	1559996,9	66251,9	85,5	12,5	0,0	0,0	12,000	40132,72	26907,83	2968315,4	
25,200	10,0	8,197	1745867,7	1751440,4	11085520,7	1722063,8	50616,5	98,3	9,0	0,0	0,0	11,555	43091,16	28075,63	1807672,1	
27,200	10,0	8,736	333998,3	335038,8	7248233,2	4183566,4	9212,8	207,2	37,0	0,0	0,0	8,983	105241,71	68983,25	347193,5	
36,700	10,0	7,997	3171129,1	3179952,9	11934014,7	1745949,5	70746,3	87,2	14,9	0,0	0,0	11,731	45405,81	30745,27	3382668,3	
25,600	10,0	8,641	485680,3	487223,0	8546153,5	3741452,4	13939,3	184,2	25,8	0,0	0,0	8,953	93717,29	61132,71	503254,5	
36,100	10,0	7,676	7668853,5	7690343,0	13798375,7	943061,8	173198,1	47,1	6,8	0,0	0,0	16,321	24464,27	16528,30	8163774,9	
40,500	10,0	7,356	17014335,2	17059629,0	14340440,3	542772,1	352431,0	26,8	4,6	0,0	0,0	18,493	14359,88	9867,50	18413694,4	