



Avaliação da produtividade e do conteúdo de  
óleo da microalga *Chlorella* sp. nos meios de  
cultivo ASM-1 e BG11 com depleção de  
nitrogênio e fósforo

Mayara Louzada Amorim

Projeto Final de Curso

Orientadores:

Prof. Yordanka Reyes Cruz, Doutora

Gisel Chenard Diaz, Doutora

Fevereiro de 2019

**AVALIAÇÃO DA PRODUTIVIDADE E DO CONTEÚDO  
DE ÓLEO DA MICROALGA *CHLORELLA* SP. EM MEIOS  
DE CULTIVO ASM-1 E BG11 COM DEPLEÇÃO DE  
NITROGÊNIO E FÓSFORO**

*Mayara Louzada Amorim*

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de bacharel em Química Industrial.

Aprovado por:

---

Prof. Adriana dos Anjos Silva, Doutora

---

Leonard Guimarães Carvalho, Doutor

---

Mariana Monteiro Fortes, Doutora

Orientado por:

---

Prof. Yordanka Reyes Cruz, Doutora

---

Gisel Chenard Diaz, Doutora

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Fevereiro de 2019

Amorim, Mayara Louzada.

Avaliação da produtividade e do conteúdo de óleo da microalga *Chlorella* sp. nos meios de cultivo ASM-1 e BG11 com depleção de nitrogênio e fósforo/ Mayara Louzada Amorim. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2019.

viii, 57 p.; il.

(Monografia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2019.

Orientadora: Yordanka Reyes Cruz, Gisel Chenard Diaz.

1. Cultivo de microalgas. 2. Depleção de nutrientes 3. Teor de lipídeos. 4. Monografia. (Graduação - UFRJ/EQ). 5. Yordanka Reyes Cruz. I. Título.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que contribuíram direta e indiretamente com a realização deste trabalho. Relembrando o período do curso, foram anos de estudo e esforço, e tudo isso se tornou mais produtivo e gratificante com pessoas como:

Professora Marcella Fernandes de Souza, a grande responsável por me apresentar o mundo das microalgas. Além disso, me estendeu a mão quando precisei, foi um prazer tê-la como orientadora de estágio, e com certeza aprendi muito.

Professora Yordanka Reyes Cruz por ter aceitado ser minha orientadora, me ajudando, analisando todos os resultados comigo com paciência e ter feito do meu trabalho o trabalho dela.

Pesquisadora Gisel, a quem eu sempre podia recorrer no laboratório. Me ajudando desde o preparo de um cultivo, análise de dados e nas minhas ligações desesperadas.

Professor Donato Alexandre Gomes Aranda, por ter acatado minha solicitação de orientação e me apresentado a professora Yordanka tão rapidamente.

Mayara Silva de Almeida. Quando se trabalha e faz seu projeto final ao mesmo tempo, ter uma pessoa que abraça o trabalho como se fosse você é de grande sorte e gratidão.

Meus amigos de faculdade e vida: Felipe Pereira, Johnny Mourão, Larissa Araujo, Michael Lopes e Victor Hugo Cardozo. Pelo ombro amigo quando chorava, pelo suporte em uma noite não dormida estudando, pela paciência de explicar algo da matéria e também pelas festas e papos jogados fora.

Por último, queria agradecer aos meus pais e avós que sempre se preocuparam com a minha educação. Com certeza, se não fosse por eles, eu não estaria em uma universidade como a UFRJ. O agradecimento não é só pelo suporte financeiro, mas muito pelo suporte emocional, não sei se conseguiria fazer tanto por alguém como vocês fizeram por mim.

Resumo do Projeto Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de bacharel em Química Industrial.

## **AVALIAÇÃO DA PRODUTIVIDADE E DO CONTEÚDO DE ÓLEO DA MICROALGA *CHLORELLA* SP. NOS MEIOS DE CULTIVO ASM-1 E BG11 COM DEPLEÇÃO DE NITROGÊNIO E FÓSFORO**

Mayara Louzada Amorim

Fevereiro, 2019

Orientadores: Prof.DSc. Yordanka Reyes Cruz

DSc. GiselChenard Diaz.

As microalgas oferecem diversos produtos biotecnológicos, podendo ser utilizadas em diferentes áreas como tratamento de águas residuais, na indústria alimentícia, na indústria farmacêutica e na produção de biocombustíveis. Elas podem alcançar uma alta produtividade de óleo e assim são fonte promissoras de triglicerídeos que podem ser utilizados na produção de biocombustíveis. A espécie *Chlorella* sp. pertence ao filo Chlorophyta, e como a maioria das microalgas desse filo apresenta crescimento rápido e tolerância às condições de cultivo. Além disso, a Organização mundial da saúde reconheceu a *Chlorella* sp e a *Spirulina* sp. como “Alimento do Milênio” para a utilização na alimentação humana. Então, após a extração dos lipídeos a biomassa remanescente pode ser utilizada como fonte de alimento. Assim, esse estudo teve como objetivo principal cultivar a espécie de microalga *Chlorella* sp., realizando modificações nos meios que permitissem uma maior produção de biomassa e lipídeos. Como primeiro passo, testou-se em qual meio, ASM-1 ou BG 11, ocorreriam maior produtividade celular, em biomassa e em teor de lipídeos, como ambos os meios mostraram resultados próximos em ambos parâmetros, os dois foram utilizados nas seguintes fases do estudo. Posteriormente, três alterações nas condições nutricionais dos meios de cultivo foram realizadas após sete dias de cultivo em meio sem restrição de nutrientes. A primeira, uma redução da concentração da fonte de nitrogênio (nitrato) em 50%; a segunda, uma redução da concentração da fonte de fósforo (fosfato) em 50%; e a terceira, uma redução da concentração da fonte de nitrogênio (nitrato) em 75%. Os resultados obtidos dessas alterações foram comparados sempre ao controle realizado nos meios ASM-1 e BG 11, ambos suplementados no sétimo dia com o meio sem restrição de nutrientes. Tanto no meio ASM-1 como no meio BG 11, constatou-se maior teor de lipídeos nos experimentos com depleção de nitrogênio, maior a depleção, maior o teor de lipídeos. Já os cultivos com redução da concentração de fósforo em ambos os meios, tiveram uma concentração de biomassa superior que os meios ASM-1 e BG 11 na condição controle. Entretanto, os teores de lipídeos foram aproximados em relação ao controle do meio BG 11 e inferiores em relação ao controle do meio ASM-1, indicando uma acumulação de carbono através de outra molécula diferente da lipídica, como por exemplo, o amido.

# ÍNDICE

I.	Introdução	1
II.	Objetivo	3
II.1.	Objetivo Geral	3
II.2.	Objetivos Específicos	3
III.	Revisão bibliográfica	4
III.1.	Características Gerais das Microalgas	4
III.2.	<i>Chlorella</i> sp.	4
III.3.	Metabolismo de microalgas	6
III.3.1.	Fotossíntese	6
III.4.	Exigências nutricionais das microalgas	9
III.5.	Fatores que influenciam o metabolismo das microalgas	9
III.5.1.	Intensidade Luminosa	9
III.5.2.	Temperatura	10
III.5.3.	Agitação e Aeração	10
III.5.4.	Condições de pH	10
III.5.5.	Disponibilidade de nutrientes	11
III.6.	Lipídeos	12
III.6.1.	Síntese de ácidos graxos e triglicerídeos	13
III.7.	Sistemas de cultivo de microalgas	17
III.7.1.	Sistemas abertos	17
III.7.2.	Sistema Fechados	18
III.7.3.	Sistemas híbridos	19
III.8.	Principais aplicações das microalgas	19
IV.	Metodologia Experimental	21
IV.1.	Microrganismo	21
IV.2.	Meios de Cultivo	21
IV.3.	Manutenção e Propagação dos cultivos	22
IV.4.	Cultivo em balão de 3 L da microalga <i>Chlorella</i> sp.	24
IV.5.	Avaliação de diferentes meios de cultivo para a produção de biomassa.	25
IV.6.	Avaliação do efeito das diferentes condições de cultivo no crescimento e acúmulo de lipídeos na microalga <i>Chlorella</i> sp.	25
IV.7.	Métodos analíticos	27
IV.7.1.	Densidade celular	27
IV.7.2.	Determinação da biomassa seca	28

IV.7.3. Determinação da velocidade específica de crescimento e tempo de duplicação	29
IV.7.4. Determinação da produtividade em biomassa e em células	30
IV.7.5. Determinação do teor de lipídeos	30
IV.7.6. Determinação da produtividade de óleo	31
V. Resultados e Discussões	33
V.1. Crescimento celular e produtividade da microalga <i>Chlorella</i> sp. em diferentes meios de cultivo.	33
V.2. Crescimento celular e produtividade da microalga <i>Chlorella</i> sp. em diferentes condições de cultivo.	35
VI. Conclusões	44
VII. Referências Bibliográficas	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura III.1 - Fotografia microscópica da <i>Chlorella</i> sp.	5
Figura III.2 - Esquema da organela cloroplasto.	7
Figura III.3 - Ciclo de Calvin.	8
Figura III.4 - Curva de crescimento de um cultivo descontínuo, em que as diferentes fases podem ser observadas: 1= fase lag; 2= fase exponencial que representa a taxa máxima de crescimento celular; 3= fase de crescimento linear; 4= fase estacionária de crescimento, e 5= declínio ou fase de morte. Os nutrientes (linha tracejada) segue o padrão oposto, indicando depleção de nutrientes durante as fases de cultivo. Em sistemas autotróficos a luz para a fotossíntese geralmente se torna o fator limitante	12
Figura III.5 - Adição de dois carbonos a uma cadeia acil graxo em crescimento. 1- A condensação de um grupo acila ativado (um grupo acetil da acetil-CoA é o primeiro grupo acila) e dois carbonos derivados da malonil-CoA, com a eliminação de CO <sub>2</sub> do grupo malonila, alonga a cadeia acila em dois carbonos. O produto β-cetônico dessa condensação é, então, reduzido em três etapas 2- o grupo β-cetônico é reduzido a um álcool, 3- a eliminação de H <sub>2</sub> O cria uma ligação dupla, e 4- a ligação dupla é reduzida, formando o grupo acil graxo saturado correspondente.	16
Figura III.6 - Sistema raceway, tanques de forma a permitir uma boa iluminação em toda sua extensão e presença de um agitador que faz com que a água percorra um circuito.	18
Figura III.7 - Fotobiorreator em coluna. Em comparação com outros tipos de fotobiorreatores, os fotobiorreatores em coluna apresentam uma mistura da cultura mais eficiente, a maior taxa de transferência de gases e um maior controle sobre as condições do meio de cultura (ERIKSEN, 2008a).	19
Figura IV.1 - Sequência de propagação da cultura.	23
Figura IV.2 - Cultivo da microalga <i>Chlorella</i> sp. em balão de 3L.	24
Figura IV.3 - Câmara de Fuchs-Rosenthal, a direita sua visão ampla e a esquerda um "quadrado grande" ampliado.	28
Figura IV.4 - Membranas após o processo para a determinação do peso seco da microalga <i>Chlorella</i> sp.	28
Figura IV.5 - Lavagem fase etérea com água deionizada para remoção do HCl.	31
Figura V.1 - Curva de crescimento celular no cultivo do inóculo da microalga <i>Chlorella</i> sp. em diferentes meios. Os valores são a média de três réplicas ± desvio padrão.	33
Figura V.2 - Variação da biomassa seca da microalga <i>Chlorella</i> sp. ao longo do tempo de cultivo dos inóculos nos diferentes meios. Os valores são a média de três réplicas ± desvio padrão.	34
Figura V.3 - Curva de crescimento da microalga <i>Chlorella</i> sp. em meio ASM-1 relativas aos experimentos C1, A1, A2 e A3.	35
Figura V.4 - Variação da biomassa seca da microalga <i>Chlorella</i> sp. ao longo do tempo de cultivo dos inóculos em meio ASM-1 relativa aos experimentos C1, A1, A2 e A3. Os valores são a média de três réplicas ± desvio padrão.	37
Figura V.5 - Curva de crescimento da microalga <i>Chlorella</i> sp. em meio BG 11 relativas aos experimentos C2, B1, B2 e B3.	39
Figura V.6 - Variação da biomassa seca da microalga <i>Chlorella</i> sp. ao longo do tempo de cultivo dos inóculos em meio BG 11 relativa aos experimentos C2, B1, B2 e B3. Os valores são a média de três réplicas ± desvio padrão.	41



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela III.1 - Tabela de porcentagem de lipídeos na biomassa seca e a porcentagem dos diferentes tipos em relação aos lipídeos totais	13
Tabela III.2 - Tabela com a produtividade de óleo em litro por hectares de diferentes matérias-primas.	20
Tabela IV.1- Composição do meio de cultivo ASM-1.	21
Tabela IV.2 - Composição do meio de cultivo BG 11.	22
Tabela IV.3 - Tabela demonstrativa dos cultivos realizados para a avaliação da produtividade de biomassa, a cinética de crescimento celular e o teor de lipídeos da <i>Chlorella</i> sp. em diferentes meios de cultivo.	25
Tabela IV.4 - Tabela demonstrativa dos experimentos realizados, exibindo a concentração no nitrato e fosfato suplementados à cultura no sétimo dia de cultivo.	27
Tabela V.1 - Velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ), tempo de duplicação ( $t_d$ ), máxima biomassa seca atingida durante o cultivo ( $X$ ), produtividade de células ( $P_{cél}$ ) e de biomassa ( $P_{bio}$ ) e teor de óleo ( $T_{óle}$ ).	34
Tabela V.2 – Tabela com os parâmetros específicos de cada experimento antes da suplementação (1ªetapa) e após suplementação (2ª etapa) em meio ASM-1.	36
Tabela V.3 – Tabela com parâmetros relativos a biomassa seca dos experimento C1, A1, A2 e A3 cultivados em meio ASM-1.	37
Tabela V.4 – Tabela com os teor de óleo no meio de cultivo sem alterações (ASM-1) e nos meios com alterações (C1, A1, A2 e A3).	39
Tabela V.5 - Tabela com os parâmetros específicos de cada experimento antes da suplementação (1ªetapa) e após suplementação (2ª etapa) em meio BG 11.	40
Tabela V.6 - Tabela com parâmetros relativos a biomassa seca dos experimento C2, B1, B2 e B3 cultivados em meio BG 11.	41
Tabela V.7 - Tabela com os teor de óleo no meio de cultivo sem alterações (BG 11) e nos meios com alterações (C2, B1, B2 e B3).	42

# Capítulo I

## I. Introdução

Microalgas possuem muitas propriedades biotecnológicas e, portanto, é possível aplicá-las em áreas de desenvolvimento de tecnologias limpas, tratamento de águas residuais, produção de energia e obtenção de compostos de interesse para as indústrias alimentícia, química e farmacêutica, dentre outras. As microalgas são fontes de diversos produtos de alto valor agregado, tais como ácidos graxos insaturados e pigmentos, como astaxantina, luteína,  $\beta$ -caroteno e ficobilinas. Além disso, podem ainda ser utilizadas na aquicultura e alimentação animal.

Na produção de energia, as microalgas podem ser utilizadas na produção de biocombustíveis. Elas são capazes de fixar aproximadamente 2 kg de CO<sub>2</sub> para produzir 1 kg de biomassa microalgácea através da fotossíntese (KUMAR *et al.*, 2011). E podem alcançar uma produção de óleo por hectare 100 vezes maior se comparadas ao óleo de soja, por exemplo. Com os constantes aumentos dos preços dos combustíveis fósseis, o aumento do efeito estufa e por seu cultivo não competir com a alimentação humana, há interesse em substituir os combustíveis fósseis por biocombustíveis provenientes de biomassa microalgácea.

O biodiesel é um combustível renovável constituído por ésteres alifáticos de cadeia longa, esses ésteres são obtidos através de processos como a esterificação, pirólise e transesterificação dos componentes lipídicos de óleos, gorduras e até mesmo de óleo de cozinha usado. O processo mais usado industrialmente é a transesterificação, no qual triglicerídeos em presença de álcool (metanol ou etanol) e catalisador (ácido, básico ou enzimático) são convertidos à biodiesel, tendo o glicerol como subproduto. As microalgas são fonte de ácidos graxos, e devido sua alta produtividade são consideradas uma fonte promissora de triglicerídeos, podendo ser usada para a produção de biodiesel em substituição ao diesel fóssil.

Além da sua alta produtividade de óleo por hectare em condições normais de nutrição, as microalgas são capazes de aumentar sua produção lipídica quando submetidas à restrição de nitrogênio e fosfato. A acumulação de triglicerídeos pode ser induzida atingindo valores elevados de 40 até 70% (BREUER *et al.*, 2012).

Em 2017, foram consumidos 4 bilhões de litros de biodiesel no Brasil, o que representa um aumento de 4,5% em relação a 2016. Além disso, o setor teve avanços importantes, com o aumento do percentual obrigatório de 7% para 8%, em março daquele ano (Empresa de Pesquisa Energética - EPE, 2018). A Resolução Conselho Nacional de Política Energética - CNPE nº 23, de 09 de novembro de 2017 (CNPE, 2017b), estabeleceu a adição obrigatória, em volume, de dez por cento de biodiesel ao óleo diesel (B10) vendido ao consumidor final, em qualquer parte do território nacional, a partir de 1º de março de 2018. Essa obrigatoriedade faz do Brasil o segundo maior produtor e consumidor de biodiesel, antecedido pelos EUA, e sucedido pela Alemanha e Argentina

Grande parte do consumo do biodiesel do Brasil deve-se, então, ao seu percentual mandatório na composição do diesel como produto final. A venda de óleo diesel aumentou 0,9% de 2016 para 2017, de 54,279 bilhões de litros para 54,772 bilhões de litros, segundo a ANP. Desse total, o setor de transporte é responsável por 74,3% do consumo total, o setor industrial por 7% e o setor agrícola 1,3%. Sendo assim, o diesel é fundamental para economia do país, principalmente por sua participação no setor de transporte, setor que realiza trabalho para diversos setores da economia. Com o aumento do consumo do diesel e consequentemente do biodiesel, estudos de matérias-primas que não competem com a alimentação humana para a produção desse biocombustível e formas de otimizá-la são necessários.

Os óleos encontrados nas microalgas possuem características físico-químicas similares aos dos óleos vegetais e esta vantagem, dentre inúmeras outras corroboram o apontamento para as microalgas como sendo matérias-primas promissoras para a produção de biodiesel (HALIM *et al.*, 2012). Assim, nesse trabalho, objetivou-se a produção da microalga *Chlorella* sp. em diferentes meios e condições de cultivo para avaliação de sua produtividade e otimização da produção de seu conteúdo lipídico.

## Capítulo II

### II. Objetivo

#### II.1. Objetivo Geral

Avaliar a produtividade de células, produtividade de biomassa e teor de lipídios acumulado pela microalga *Chlorella* sp. submetida a diferentes meios e condições nutricionais.

#### II.2. Objetivos Específicos

- Realizar o cultivo da microalga *Chlorella* sp. utilizando dois meios de cultivo diferentes (ASM-1 e BG 11) para avaliar em qual destes meios a microalga estudada tem maior produtividade de células e de biomassa e maior acúmulo de lipídeos.
- Avaliar o efeito da depleção de nitrato e fosfato na produtividade de células, biomassa e no acúmulo lipídeos da microalga *Chlorella* sp. cultivada nos meios previamente selecionados.
- Monitorar o crescimento da microalga *Chlorella* sp., cultivada nas condições selecionadas, mediante contagem de células em microscópio óptico para avaliação da produtividade de células.
- Monitorar o crescimento da microalga *Chlorella* sp., cultivada nas condições selecionadas, mediante análise de peso seco para avaliação da produtividade de biomassa.
- Quantificar o teor de lipídeos acumulado pela microalga *Chlorella* sp., cultivada nas condições selecionadas, utilizando o método J:Schmid-Bondzynski-Ratzlaff.

## Capítulo III

### III. Revisão bibliográfica

#### III.1. Características Gerais das Microalgas

As algas são divididas em microalgas, macroalgas e cianobactérias. As cianobactérias são procarióticas e pertencem ao Reino *Monera*. Enquanto, as algas eucarióticas pertencem ao Reino *Protista*. A grande maioria das espécies é unicelular podendo formar colônias filamentosas, ou colônias sem forma definida envolvidas por membrana mucilaginosa; outras espécies, como as algas pardas, são multicelulares (AZEREDO, 2012).

Em relação ao metabolismo, as algas podem ser fotoautotróficas, heterotróficas ou mixotróficas. As algas fotoautotróficas possuem pigmentos, como a clorofila a, b, c, e d ou outros tipos de pigmentos mais um aparato celular capaz de captar a energia luminosa e substâncias orgânicas, as transformando em outras moléculas orgânicas, como carboidratos e outras moléculas orgânicas. As heterotróficas não possuem tal aparato celular, não sendo capazes de realizar fotossíntese, necessitam, então, de substrato orgânico para seu crescimento e sobrevivência. Os mixotróficos ora agem como fotoautotróficas ora como heterotróficas.

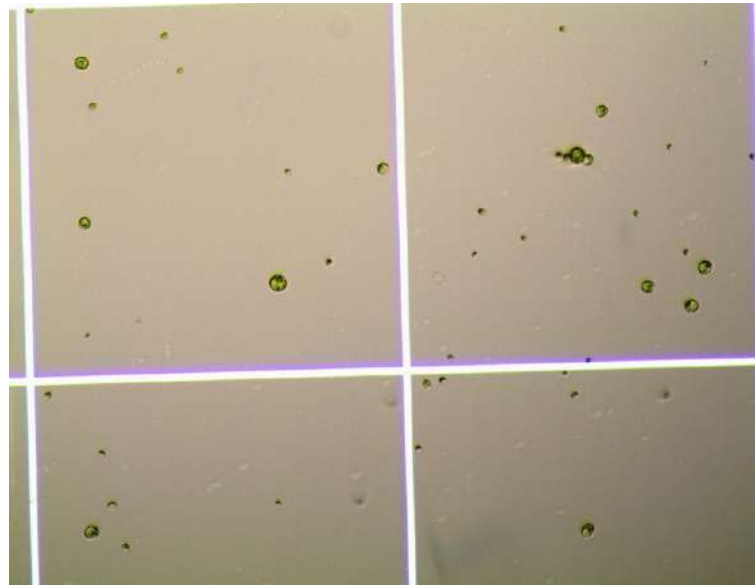
Segundo Richmond (2004), há mais de 50.000 espécies de microalgas que existem no mundo, mas somente um número de aproximadamente 30.000 já foram caracterizadas. As microalgas são organismos unicelulares ou multicelulares fotossintetizantes que habitam quase todos os ambientes existentes. A alta produtividade de biomassa em relação à área e ao tempo e a capacidade de algumas espécies armazenarem lipídeos as destacam em estudos para seu uso em âmbito industrial. Além de lipídeos, a biomassa pode ser utilizada para a obtenção de compostos de interesse industrial tais como: proteínas, hidrocarbonetos, carotenoides, enzimas, vitaminas e antibióticos. Sendo os lipídeos usados, principalmente, na produção de biodiesel.

#### III.2. *Chlorella* sp.

A *Chlorella* (Figura III.1) é uma microalga unicelular microscópica, esférica com diâmetro que varia de 5-10  $\mu\text{m}$ , encontradas em lagos, com grande habilidade de

realizar fotossíntese (COSTA *et al.*, 2006). Segundo Souza, (2017), pertence à ordem dos Chlorococcales, da classe Chlorophyceae, filo Chlorophyta. Sua reprodução ocorre de forma assexuada, com a formação de autoesporos, não tendo sido observada nenhuma reprodução sexuada em microalgas desse gênero (YAMAMOTO *et al.*, 2004). E são promissora fonte de lipídeos e proteínas devido ao seu rápido crescimento, fácil cultivo e resistência a contaminações.

Figura III.1 - Fotografia microscópica da *Chlorella* sp.



Fonte: Autorial Própria

Microalgas do gênero *Chlorella* acumulam carbono primariamente na forma de amido, que se encontra no interior de seus cloroplastos (BALL *et al.*, 2011). A classe Chlorophyceae (algas verdes), ao qual pertencem, é caracterizada por possuir clorofilas a e b e vários carotenoides (xantofilas e carotenos) e as células podem mudar sua coloração em condições de stress, como deficiência de nitrogênio. O uso comercial e também industrial das algas verdes compreende relativamente poucos gêneros entre os quais se encontra a *Chlorella*, *Dunaliella* e *Haematococcus* (SALAZAR, 2015).

A microalga *Chlorella* possui em média 53% de proteínas, 23% de carboidratos, 9% de lipídios e 5% de minerais (HENRIKSON, 1994). Ela contém ainda mais de 2% de clorofila, o que lhe permite rápido crescimento, pois assim como as plantas superiores, seu metabolismo principal é a fotossíntese, onde a fonte principal de energia é a luz solar (VONSHAK, 1997). A *Chlorella* também é rica em vitaminas do complexo B, principalmente a B12, vital na formação e regeneração das células sanguíneas que

juntamente com o ferro fazem desta microalga um produto indicado no tratamento e prevenção de anemia (VIEIRA, 2013).

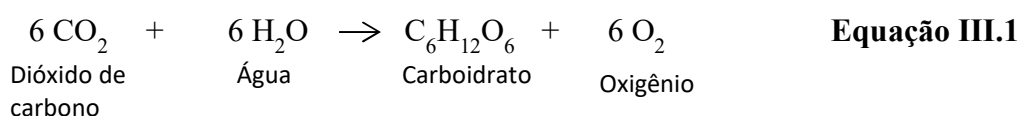
### III.3. Metabolismo de microalgas

As microalgas podem ser fotoautotróficas, heterotróficas ou mixotróficas. Porém, grande parte delas são fotoautotróficas, ou seja, realizam fotossíntese, convertendo moléculas inorgânicas, na forma de CO<sub>2</sub>, em moléculas orgânicas através da absorção de energia luminosa. Segundo Andersen (2005), cerca de 50-60% do oxigênio produzido é oriundo de algas.

As microalgas podem usar diferentes tipos de metabolismos energéticos, como a respiração, fotossíntese ou fotorrespiração e fixação de nitrogênio para manter suas estruturas, mas seu uso depende principalmente das condições ambientais e de cultivo. A manipulação das condições ambientais e os diferentes estágios de crescimento podem alterar a composição bioquímica das microalgas (BROWN *et al.*, 1989).

#### III.3.1. Fotossíntese

As microalgas fotoautotróficas e mixotróficas realizam fotossíntese, processo pelo qual carbonos inorgânicos, geralmente na forma de CO<sub>2</sub>, na presença de água são transformados em moléculas orgânicas com liberação de oxigênio por intermédio da absorção de energia luminosa, como mostrado na Equação III.1.

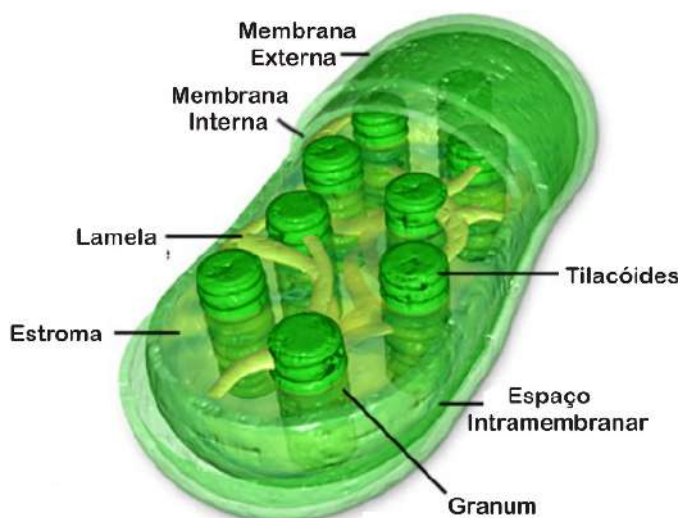


A fotossíntese das microalgas eucarióticas ocorre no interior de organelas de microalgas fotossintetizantes, chamadas cloroplastos. Os cloroplastos (Figura III.2) são formados, principalmente, pelos tilacóides e o estroma que é uma fase aquosa. Os tilacóides são camadas alternadas de membranas lipoproteicas formadas por mono- e digalactosildiacil glicerol arranjados em uma bicamada onde as proteínas são encaixadas, formando os complexos fotossintéticos.

O processo de fotossíntese é dividido em duas fases: a fase clara, também conhecida como fase fotoquímica e a fase escura. Na fase clara, ocorre a absorção da energia luminosa e a geração de ATP e NADPH; simultaneamente, O<sub>2</sub> é liberado. Essa

absorção só é possível graças aos complexos fotossintéticos formados entre os pigmentos fotossintetizantes e as proteínas, esses complexos formam estruturas, que se encontram nas membranas dos tilacóides, chamadas antenas que captam e levam a energia para os fotossistemas, também presentes nos tilacóides. No fim, as membranas dos tilacóides possuem como seus principais complexos: antenas, fotossistema II (PSII) e fotossistema I (PSI), citocromo *b<sub>6</sub>f* e ATP-sintase.

Figura III.2 - Esquema da organela cloroplasto.



Fonte: Só Biologia, 2018

O início da fase clara se dá pela captação do fóton pela antena, essa energia é levada aos centros de reação do PSI e PSII, P700 e P680 respectivamente, e a partir dessa excitação, os centros de reação dos fotossistemas liberam elétrons. O elétron liberado no PSII passa ao PSI, por intermédio do complexo de citocromos *b<sub>6</sub>f* e da proteína solúvel plastocianina, e o P700 excitado por meio de uma série de carregadores, transfere esses elétrons para a ferredoxina, que então reduz  $\text{NADP}^+$  a NADPH. O elétron recebido pelo P680 do PSII estabiliza o P700 do PSI. Porém o centro de reação do fotossistema II continua oxidado, assim os elétrons do P680 são repostos pela foto-oxidação da água, liberando  $\text{O}_2$ .

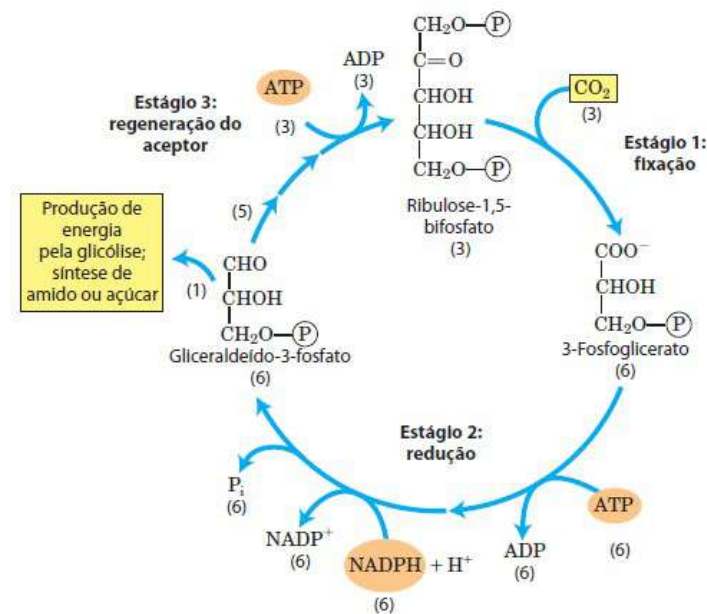
Ainda na fase clara, ocorre a produção de ATP (Adenosina Trifosfato). Essa produção ocorre na fosforilação acíclica, fluxo de elétrons do PSII pelo complexo de citocromos *b<sub>6</sub>f* e, então, pelo PSI até o  $\text{NADP}^+$ , que produz um gradiente de prótons, utilizado para promover a síntese de ATP, e NADPH, utilizado em processos biossintéticos redutores. E principalmente pela fosforilação cíclica, os elétrons que



passam do P700 para a ferredoxina não continuam até o  $\text{NADP}^+$ , retornam ao complexo de citocromos  $b_6f$  até a plastocianina, essa doa então elétrons ao P700, que os transfere novamente a ferredoxina. Esse reciclo de elétrons é acompanhado pelo bombeamento de prótons pelo complexo de citocromos  $b_6f$ , responsável pela fosforilação de ADP (Adenosina Difosfato) a ATP.

A fase escura utiliza os produtos da fase fotoquímica, NADPH e ATP, como agente redutor e fonte de energia, respectivamente. Essa fase ocorre no estroma e converte  $\text{CO}_2$  em carboidratos (principal produto), lipídios, aminoácidos e ácidos orgânicos através de uma série de reações conhecidas como ciclo de Calvin-Benson. A assimilação do  $\text{CO}_2$  ocorre em 3 fases (Figura III.3). O primeiro estágio na assimilação do  $\text{CO}_2$  em biomoléculas é a reação de fixação de carbono: a condensação de  $\text{CO}_2$  com um acceptor de cinco carbonos, a ribulose-1,5-bifosfato, para formar duas moléculas de 3-fosfoglicerato. No segundo estágio, o 3-fosfoglicerato é reduzido a trioses-fosfato. No terceiro estágio, cinco das seis moléculas de triose-fosfato são usadas para regenerar três moléculas de ribulose-1,5-bifosfato, o material de partida. A sexta molécula de triose-fosfato, o produto líquido da fotossíntese, pode ser usada para produzir hexoses para combustível e blocos construtivos, sacarose para transporte para tecidos não fotossintéticos ou amido para armazenamento (NELSON & COX, 2014).

Figura III.3 - Ciclo de Calvin.



Fonte: NELSON & COX, 2014

Além da fotossíntese, as microalgas realizam a respiração aeróbia, consumindo carbono orgânico e  $O_2$  e produzindo  $CO_2$ , ATP e moléculas precursoras para vias anabólicas. Somente pela respiração as células são capazes de sintetizar 2-oxoglutarato, precursora da síntese de glutamato, que é necessário para a síntese de diversos aminoácidos e das clorofilas (SOUZA, 2017).

#### **III.4. Exigências nutricionais das microalgas**

Outros elementos além do carbono, adquirido pelas vias metabólicas mencionadas, se fazem necessários para o crescimento e manutenção da estrutura celular das microalgas, como nitrogênio, potássio, magnésio, cálcio, enxofre e fósforo. O cálcio, por exemplo, participa da assimilação de nitrato nos gêneros *Chlorella* e *Scenedesmus* e na assimilação de fosfato inorgânico no gênero *Scenedesmus*. O cálcio participa da foto-oxidação da água para estabilizar o fotossistema II. O ferro é essencial a fotossíntese, respiração, fixação de nitrogênio e síntese de DNA (Ácido Desoxirribonucleico). O magnésio está presente na clorofila, sendo essencial para a fotossíntese.

Além desses nutrientes, também necessitam de elementos traços como zinco, manganês, molibdênio, cobre, cobalto e boro para atuar, principalmente, como cofatores em diversas vias. O nitrogênio e o fósforo, porém são extremamente necessários. O nitrogênio é necessário na formação das proteínas, e o fósforo é indispensável nas reações de transferência de energia e na síntese de ácidos nucleicos. Assim, esses elementos são indispensáveis para o crescimento e manutenção das microalgas.

#### **III.5. Fatores que influenciam o metabolismo das microalgas**

##### **III.5.1. Intensidade Luminosa**

A luz é essencial para o metabolismo das microalgas fotoautotróficas, em razão da fotossíntese. A energia luminosa é essencial para a fixação de carbono inorgânico, sendo essa a principal fonte de produção de biomassa, e influenciando também na taxa de crescimento da microalga.

O excesso de luz pode inibir a fotossíntese através de dois processos: foto-inibição e foto-oxidação. A foto-inibição envolve danos aos centros de reação, especialmente PSII quando eles são superexcitados. No fotossistema II, ocorre perda da proteína envolvida na transferência de elétrons entre P680 e plastoquinona. Esta

proteína pode ser recuperada posteriormente. A foto-oxidação é um processo irreversível e envolve diretamente os pigmentos receptores de luz, os quais, ao absorverem muita luz, ficam muito tempo excitados e interagem com o O<sub>2</sub> produzindo radicais livres, como superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), podendo destruir os pigmentos. Há algumas defesas bioquímicas utilizadas pelas plantas, como a enzima superóxido dismutase (SOD) que destrói os radicais livres. No entanto estas defesas são insuficientes se a exposição à alta luminosidade é prolongada (TAIZ & ZIEGER, 2006).

### **III.5.2. Temperatura**

A temperatura altera taxas metabólicas e o crescimento da microalga, alterando assim a composição bioquímica dessas. Porém, essa variação é variável para cada espécie. Quando as células de *Chlorella* sp. são cultivadas em temperatura entre 25 e 35°C, o teor de proteína diminui e o de carboidratos aumenta (OGBONNA; TANAKA, 1996).

### **III.5.3. Agitação e Aeração**

A agitação permite a homogeneização das células, impedindo que alguns fiquem presas ao fundo e outras na superfície com excesso de luminosidade que pode foto-oxidar seus pigmentos. Além disso, permite homogeneização dos nutrientes no meio, otimização de transferência térmica e de gases.

A aeração, processo mecânico, aumenta o nível de oxigênio dissolvido, utilizado na respiração aeróbica. A aeração se faz mais necessária durante a noite, quando a taxa da respiração é maior, quando as células estão com alguma limitação de desenvolvimento ou na carência de luz, pois esses podem afetar a geração de O<sub>2</sub> causando morte repentina da biomassa. Mas a concentração de oxigênio também deve ser controlada, pois uma alta concentração pode saturar a ribulose-bisfosfato carboxilase oxigenase, principal enzima que atua na produção de carboidratos.

### **III.5.4. Condições de pH**

O pH é fundamentalmente influenciado pelas proporções entre as formas de carbono dissolvidas no meio de cultivo, interferindo na disponibilidade de CO<sub>2</sub> que afeta diretamente no crescimento das microalgas (LOURENÇO, 2006). A variação de

pH no cultivo de microalgas ocorre devido ao consumo de substratos, solubilização e consumo do dióxido de carbono, e à degradação de metabólicos produzidos (GRIMA *et al.*, 1999). Sendo o pH neutro a alcalino o melhor para o cultivo de diversas espécies.

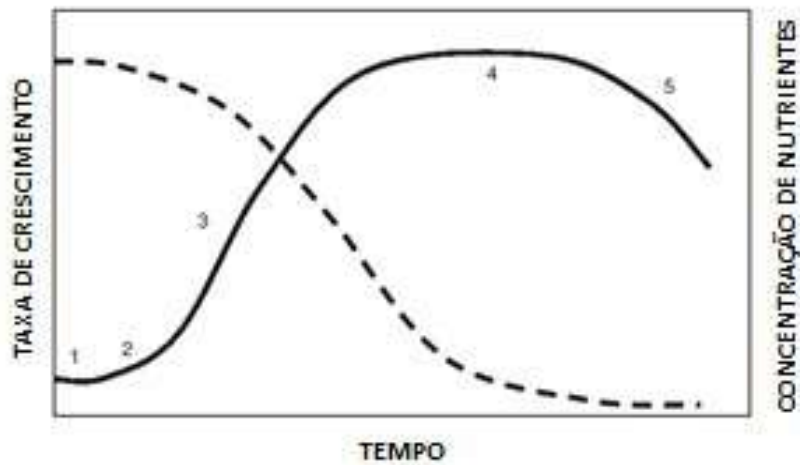
### **III.5.5. Disponibilidade de nutrientes**

A taxa de crescimento das microalgas está relacionada as concentrações de nutrientes intracelulares. Senso assim, a concentração de nutrientes para a manutenção e crescimento de cada microalga vai depender de sua capacidade específica de armazenar nutrientes. No que desrespeito a relação da concentração de nutrientes do e a taxa de crescimento, observam-se quatro zonas: uma zona deficiente de nutrientes que limita o crescimento, e quando essas são expostas a concentrações de nutrientes adequados tem um crescimento exponencial; uma zona crítica, na qual o crescimento é pouco afetado pelo aumento da concentração de nutrientes, essa é aponta como a zona de concentração ótima; uma zona que não importa o aumento da concentração de nutrientes, não há crescimento da biomassa; e finalmente, uma zona em que o aumento da concentração de nutriente, diminui o crescimento microalgáceo, sendo considerada uma zona tóxica.

O crescimento lento na zona deficiente pode aumentar a presença de espécies exóticas tornando-as dominantes, além disso, pode apresentar contaminação por bactérias, fungos e vírus, resultando finalmente em colapso total dos cultivos (SALAZAR, 2015). Entretanto, as microalgas tendem a modificar sua estrutura com adaptações bioquímicas e fisiológicas para otimizar o consumo dos recursos disponíveis. E ainda, podem excretar substâncias que limitem o crescimento dessas outras espécies competidoras.

Nos cultivos em batelada, normalmente, o aumento do crescimento celular está associado ao decaimento da concentração de nutrientes, como demonstrado na figura III.4. Até que taxa de crescimento com concentração de células constante diminuirá pela grande diminuição dos nutrientes.

Figura III.4 - Curva de crescimento de um cultivo descontínuo, em que as diferentes fases podem ser observadas: 1= fase lag; 2= fase exponencial que representa a taxa máxima de crescimento celular; 3= fase de crescimento linear; 4= fase estacionária de crescimento, e 5= declínio ou fase de morte. Os nutrientes (linha tracejada) segue o padrão oposto, indicando depleção de nutrientes durante as fases de cultivo. Em sistemas autotróficos a luz para a fotossíntese geralmente se torna o fator limitante



Fonte: RICHMOND, 2004.

Como citado anteriormente, o fósforo e o nitrogênio são nutrientes essenciais para o crescimento e manutenção das microalgas. A redução da concentração desses no meio de cultivo acarreta no maior acúmulo de carboidratos e lipídeos. Em concentrações baixas de nitrogênio, as células mantêm sua capacidade fotossintética, porém com taxas reduzidas, e o carbono fixado é redirecionado da síntese protéica para a síntese dessas reservas de carbono (LI *et al.*, 2011). O acúmulo de amido é realizado com menor gasto energético do que o acúmulo de lipídeos; no entanto, a energia liberada pelo catabolismo de lipídeos é maior do que a liberada pela degradação de amido (SUBRAMANIAN *et al.*, 2013). O ponto negativo dessa restrição de nutrientes é a diminuição da produtividade de biomassa e de proteínas. E por isso, é indicado primeiro focar no crescimento da biomassa e posteriormente, no aumento da porcentagem de lipídios na biomassa total.

### III.6. Lipídeos

As microalgas possuem uma alta produtividade por área, sendo assim uma boa fonte de lipídeos. A composição dos lipídeos é variável com a espécie, mas também pode ser alterado com as condições de cultivo. Entretanto, os ácidos graxos saturados e monoinsaturados são os mais predominantes nas microalgas de modo geral (BOROWITZKA, 1988). As funções dos lipídeos variam desde armazenamento de

energia, na forma de gordura e ácidos graxos até a composição das membranas celulares, através dos fosfolipídios.

Os lipídeos são classificados em polares e apolares. Sendo os polares fosfolipídeos e glicolipídeos, relacionados à estrutura e funcionalidades da membrana celular. E os apolares, os glicerídeos (mono-, di- e triglicerídeos). Usualmente, as microalgas apresentam uma pequena produção de lipídeos durante a fase exponencial, geralmente polares e poliinsaturados, com um aumento na síntese quando as culturas alcançam a fase estacionária decrescimento, predominando os apolares, produto de reserva (PIORRECK *et al.*,1984). Para a produção de biodiesel, lipídeos de armazenamento, como os triglicerídeos, são os mais interessantes. Os triglicerídeos (lipídios neutros) são formados por três ácidos graxos. A quantidade e tipo de lipídeos produzidos por diferentes classes de microalgas está apresentada na tabela III.1.

Tabela III.1 - Tabela de porcentagem de lipídeos na biomassa seca e a porcentagem dos diferentes tipos em relação aos lipídeos totais

Classe	Lipídeos totais (% biomassa seca)	Porcentagem (em relação aos lipídeos totais)		
		Neutros	Glicolipídeos	Fosfolipídeos
<b>Cyanobacteria</b>	2 - 23	11 - 68	12 - 41	16 - 50
<b>Chlorophyceae</b>	1 - 70	21 - 66	6 - 16	17 - 53
<b>Crysophyceae</b>	12 - 72	-	-	-
<b>Prymnesiophyceae</b>	5 - 48	-	-	-
<b>Cryptophyceae</b>	3 - 17	-	-	-
<b>Xanthophyceae</b>	6 - 16	44	17	39
<b>Rhodophyceae</b>	1 - 14	41 - 58	42 - 49	-
<b>Bacillariophyceae</b>	1 - 39	14 - 60	13 - 44	10 - 47

Fonte: adaptado de Becker, 1994

### III.6.1. Síntese de ácidos graxos e triglicerídeos

Nas microalgas, diferente da maioria dos seres vivos, a produção de ácidos graxos ocorre no estroma do cloroplasto, já que nesse ocorre a fotossíntese produzindo NADPH e ATP necessário para a síntese. A síntese de ácidos graxos nas microalgas é inicialmente dirigida à formação das membranas celulares, organelas, cofatores enzimáticos, transportadores, mensageiros intracelulares e lipídeos de reserva (HAKALIN, 2014). Esta síntese está dividida em três etapas principais: carboxilação do

acetil-CoA para formar malonil-CoA, alongamento da cadeia acil e formação dos triglicerídeos (COURCHESNE *et al.*, 2009).

A síntese de ácido graxo se inicia a partir da acetil Co-A (Acetilcoenzima A), resultado da oxidação total de moléculas orgânicas como o piruvato, ácidos graxos e aminoácidos. Porém a formação dos ácidos graxos não se dá pela inversão do processo oxidativo que forma a acetil Co-A, sendo necessário outro aparato enzimático. Entre estas enzimas está a acetil-CoA-carboxilase, que permite a conversão da acetil Co-A em malonil-CoA. Tal enzima possui um grupo prostético, a biotina. A reação de formação de malonil-CoA, então, ocorre em duas etapas catalisada por essa enzima. Primeiramente, um grupo carboxil derivado do bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) é transferido para a biotina em uma reação dependente de ATP. A biotina age como transportador temporário de  $\text{CO}_2$ , transferindo-o para a acetil-CoA na segunda etapa, gerando malonil-CoA (NELSON & COX, 2014).

As longas cadeias de carbono dos ácidos graxos são construídas por uma sequência de reações repetitivas catalisadas por um sistema coletivamente conhecido como ácido graxo-sintase (AGS) que contém sete sítios ativos, tal sistema em microalgas gera uma variedade de produtos como ácidos graxos saturados de vários comprimentos, insaturados, ramificados e hidróxiácidos graxos. O AGS possui a proteína transportadora de grupos acila (ACP), essa primeiramente é combina ao acetil Co-A, esse então é transferido a cisteína específica (SH-), deixando o sítio SH- da ACP novamente livre. Então, esse é combinado ao malonil-CoA, e após essa combinação o grupo acetila que estava na cisteína é transferido ao grupo malonila, formando o acetoacetil-ACP. O acetatoacetil-ACP tem suas ligações entre o grupamento acetila e malonila reduzida, utilizando NADPH. Após essa redução, ocorre uma desidratação, formando uma ligação dupla entre esses grupos e novamente uma redução, gastando mais um NADPH e formando uma ligação simples entre o grupo acetila e malonila. E finalmente, o grupamento ligado ao ACP é transferido ao HS- da cisteína, liberando novamente o ACP para combinar-se novamente ao malonil-CoA. Todo esse processo está explicitado na Figura III.5.

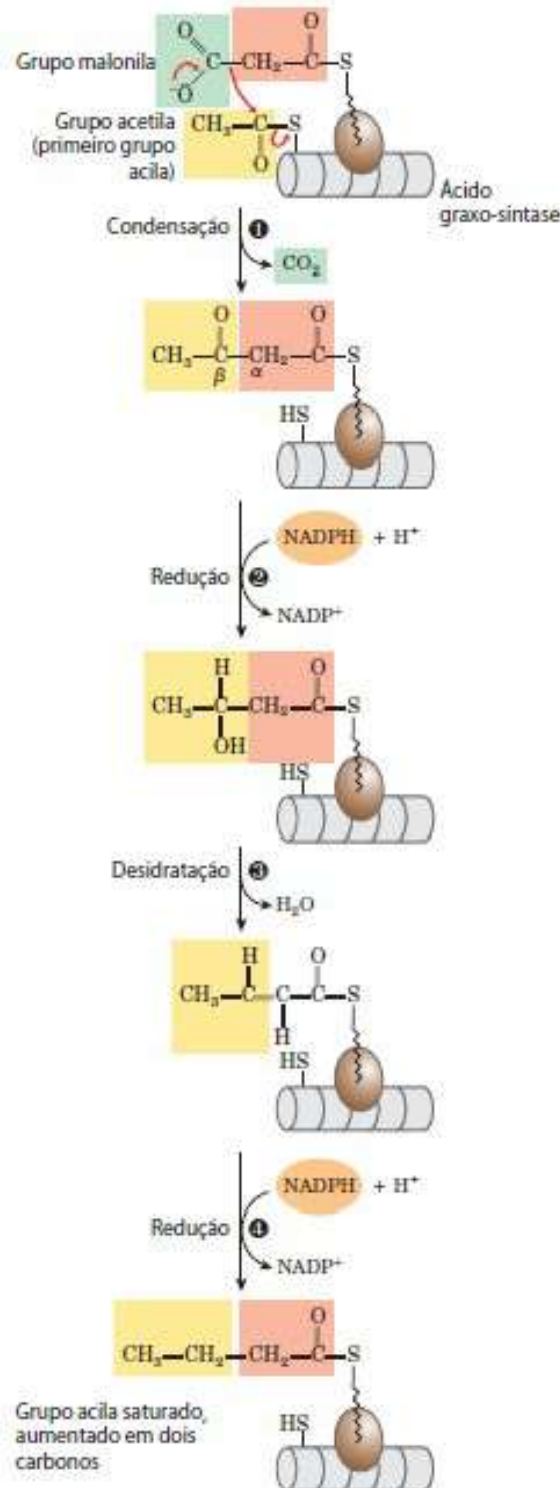
Esse ciclo de inclusão de dois carbonos pelo malonil-CoA é repetido diversas vezes até sejam totalizados 16 ou 18 carbonos. A repetição desta sequência de evento faz do 16:0-ACP e do 18:0-ACP os principais produtos da síntese dos ácidos graxos, mas

dependendo da espécie de microalga o produto final pode ter 20 a 22 carbonos (SALAZAR, 2015).

Os triacilgliceróis são compostos por três ácidos graxos e podem representar cerca de 11% a 68% dos lipídios totais na biomassa seca. A síntese se dá a partir do L- $\alpha$ -fosfoglicerol, oriundo da via glicolítica, e acil-CoA. A transferência de resíduos de acilas se dá a partir da acil-CoA transferase que forma o ácido lisofosfatídico que, através da L-acilglicerol-3-fosfato-aciltransferase, transfere outra acila formando o ácido L- $\alpha$ -fosfatídico. Este composto é a origem dos fosfolipídios ou depois da ação de uma fosfatase e incorporação do terceiro resíduo de acila, através da diacilglicerol aciltransferase, se transforma em triacilglicerol (HUANG *et al.*, 2010).



Figura III.5 - Adição de dois carbonos a uma cadeia acil graxo em crescimento. 1- A condensação de um grupo acila ativado (um grupo acetil da acetil-CoA é o primeiro grupo acila) e dois carbonos derivados da malonil-CoA, com a eliminação de CO<sub>2</sub> do grupo malonila, alonga a cadeia acila em dois carbonos. O produto β-cetônico dessa condensação é, então, reduzido em três etapas 2- o grupo β-cetônico é reduzido a um álcool, 3- a eliminação de H<sub>2</sub>O cria uma ligação dupla, e 4- a ligação dupla é reduzida, formando o grupo acil graxo saturado correspondente.



Fonte: NELSON & COX, 2014

### **III.7. Sistemas de cultivo de microalgas**

Normalmente os meios de cultivo são constituídos por macronutrientes (Carbono, Nitrogênio, Fósforo, Oxigênio, Magnésio, Cálcio, Hidrogênio, Enxofre, Potássio e Silicato), micronutrientes (Cobre, Molibdênio, Ferro, Manganês, Zinco e Cobalto) e vitaminas (GUILLARD, 1975). Os cultivos para produção de microalgas podem ser divididos em três: o autotrófico, utilizando uma fonte de energia luminosa e CO<sub>2</sub> como fonte de carbono; o heterotrófico, utilizando compostos orgânicos, glicose e acetato, por exemplo, como fonte de carbono e os mixotróficos que apresentam as fases autotrófica e heterotróficas. Neste trabalho o foco está no cultivo autotrófico em sistema fechado. Visto que esse tipo de cultivo pode ser realizado em sistema aberto, fechado ou híbrido.

#### **III.7.1. Sistemas abertos**

Os sistemas de cultivo abertos recebem a energia luminosa do sol e ficam em contato direto com a atmosfera. Este último fator aumenta o risco de contaminação do sistema, ou seja, o crescimento de microrganismos que podem competir com os nutrientes da microalga pré-selecionada. Mais uma desvantagem do sistema aberto é a dificuldade de se manter as condições de cultivo constantes. Isso tudo causa uma baixa produtividade de biomassa se comparado aos sistemas de cultivo fechados. Sendo assim, esse sistema é indicado para espécies de ambientes peculiares e rápido crescimento.

Entretanto, esses sistemas são os mais utilizados e potencialmente os mais baratos de se construir e operar e, portanto, os mais cogitados para o cultivo de microalgas em larga escala com o intuito de fornecer matéria prima para a produção de biocombustíveis (AZEREDO, 2012). Entre os sistemas abertos, os *raceways* (Figura III.6) são os mais comumente utilizados para cultivo comercial de microalgas (BOROWITZKA, 1999).

Figura III.6 - Sistema raceway, tanques de forma a permitir uma boa iluminação em toda sua extensão e presença de um agitador que faz com que a água percorra um circuito.



Fonte: Department of Mechanical Engineering Colorado State University – Engines and Energy Conversion Laboratory.

### III.7.2. Sistema Fechados

O sistema de cultivo fechado, também conhecido como fotobiorreatores, são caracterizados pela regulação e controle de quase todos os parâmetros bióticos e abióticos importantes para o cultivo de microalgas. Esse controle reduz o risco reduzido risco de contaminação por espécies invasoras ou predadores, não há perdas de CO<sub>2</sub> e evaporação, aumentando assim a produtividade de biomassa comparado ao sistema aberto.

Entre os sistemas fechados mais utilizados estão os tubulares, em colunas (Figura III.7) e em placas (ERIKSEN, 2008a). Quanto ao modo de operação, há duas categorias: mistura realizada por bombeamento mecânico ou ar; reatores monofásicos, onde há somente o meio de cultura líquido nos reatores e as trocas gasosas ocorrem em um compartimento separado; e os reatores bifásicos, nos quais a fase líquida e gasosa estão presentes e a transferência contínua de gás ocorre no próprio reator (AZEREDO, 2012).

Figura III.7 - Fotobiorreator em coluna. Em comparação com outros tipos de fotobiorreatores, os fotobiorreatores em coluna apresentam uma mistura da cultura mais eficiente, a maior taxa de transferência de gases e um maior controle sobre as condições do meio de cultura (ERIKSEN, 2008a).



Fonte: Utilização de algas para a produção de biocombustíveis (INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial, 2010).

### III.7.3. Sistemas híbridos

O sistema híbrido associa o sistema aberto e fechado. Esse sistema diminui as desvantagens de ambos os sistemas, pois inicialmente utiliza-se um sistema fechado para aumentar a produção de biomassa e depois o sistema aberto, a fim de causar estresse à biomassa produzida, como deficiência de nitrogênio e fósforo e alta luminosidade, para aumentar a produção de lipídeos, por exemplo.

E mesmo utilizando o sistema aberto, a principal desvantagem desse sistema, a contaminação, consegue ser reduzida. Pois, com a primeira fase em fotobiorreatores a concentração de células no meio é bem maior e pura, fazendo com que essas colonizem rapidamente e dominem o meio do sistema aberto.

### III.8. Principais aplicações das microalgas

As principais aplicações de microalgas em escala comercial se dão por essa ser fonte de nutrientes que podem ser utilizados na alimentação humana e animal e fonte de produtos de alto valor agregado, como os carotenoides. Há também pesquisas relacionadas ao uso da biomassa microalgácea para a produção de biocombustíveis (etanol, biodiesel, hidrogênio, entre outros).

As microalgas são fonte de proteínas, até 70% da composição da biomassa seca. Microalgas, de um modo geral, possuem em sua composição todos os aminoácidos essenciais para a alimentação humana (BECKER, 2007). Entre outros nutrientes estão os carboidratos, acumulados na forma de amido dentro das células das microalgas. Esse amido é fonte de glicose e pode ser utilizada na produção de diversas moléculas-plataforma por processos químicos e bioquímicos, inclusive, seu uso está sendo proposto para a produção de etanol de terceira geração.

Além disso, as microalgas são fonte de lipídeos. Certas espécies de microalgas, quando cultivadas sob estresse, exibem conteúdo lipídico acima de 30 % da biomassa seca que, ao ser recuperado, pode ser utilizado na produção de biocombustíveis (MATA *et al.*, 2010). A alta produtividade de óleo por área cultivada (Tabela III.2) incentiva o uso de microalgas como fonte de óleo para a produção de biodiesel.

Tabela III.2 - Tabela com a produtividade de óleo em litro por hectares de diferentes matérias-primas.

Cultura	Rendimento de óleo (L.ha <sup>-1</sup> )
Milho	172
Soja	446
Canola	1190
Jatropha	1892
Coco	2689
Palma	5950
Microalga*	58700

\* 30 % de óleo na biomassa (peso seco)

Fonte: adaptado de Chisti, 2007

Porém, a produção de lipídeo por microalgas não tem uso exclusivo para a produção de biocombustíveis, as microalgas produzem ácidos graxos essenciais à alimentação humana e de alto valor agregado como os ácidos graxos poli-insaturados. Outra molécula de alto valor agregado são os carotenoides, que além de serem precursores de vitamina A, possuem ação antioxidante.

## Capítulo IV

### IV. Metodologia Experimental

Trabalho realizado no Laboratório de Tecnologias Verdes (GREENTEC), localizado no Departamento de Engenharia Química na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

#### IV.1. Microrganismo

A microalga utilizada em todos os ensaios experimentais foi a *Chlorella* sp. cedida pelo Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (LETC) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ. A microalga foi mantida em seu meio de manutenção o ASM-1 a 23 °C e fotoperíodo de 12 horas.

#### IV.2. Meios de Cultivo

A fim de analisar o crescimento da microalga, *Chlorella* sp., foram utilizados dois meios: ASM-1 e BG 11.

Os nutrientes, vitaminas e elementos traços de cada meio foram misturados e avolumados com água deionizada, todos os meios e materiais utilizados no desenvolvimento dos cultivos nos diferentes ensaios foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121°C. Na tabela IV.1 estão descritas as concentrações dos componentes, em miligramas por litro ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), do meio ASM-1 e na tabela IV.2 os do meio BG 11.

Tabela IV.1- Composição do meio de cultivo ASM-1.

Componentes	Composição ( $\text{mg.L}^{-1}$ )
$\text{NaNO}_3$	170
$\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	49
$\text{MgCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$	41
$\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$	29
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	17,4
$\text{Na}_2\text{HPO}_4.12\text{H}_2\text{O}$	35,6

FeCl <sub>3</sub>	0,65
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,48
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,39
ZnCl <sub>2</sub>	0,335
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,019
CuCl	0,0014
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	8,24

Tabela IV.2 - Composição do meio de cultivo BG 11.

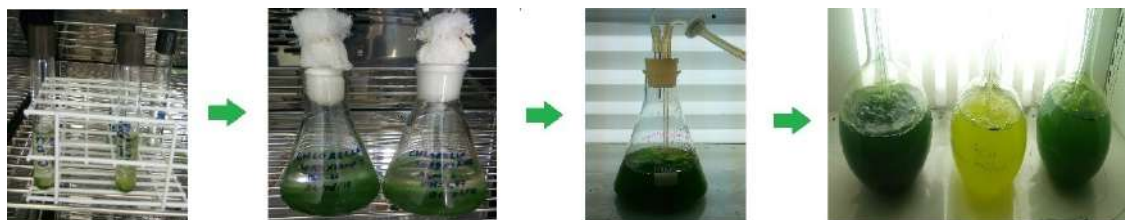
Componentes	Composição (mg.L <sup>-1</sup> )
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	6
Citrato férrico	6
NaNO <sub>3</sub>	1500
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	30,53
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	75
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	36
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	20
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	1
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,017
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,22
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,079
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,391
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0404

### IV.3. Manutenção e Propagação dos cultivos

A manutenção e propagação dos meios foi realizada através de repicagens do inóculo. A propagação se deu em ordem sequencial do crescimento do volume dos cultivos (Figura IV.1). Após recebimento da cepa de origem, 5 mL (mililitros) da cultura original foi propagada em 55 mL de meio de cultivo, usando Erlenmeyer de 100 mL disposto em incubadora (Incubadora B.O.D. 411D, Nova Ética). Depois, são transferidos os 60 mL de cultura para Erlenmeyer de 1000 mL, contendo 540 mL de meio, esses são mantidos em prateleiras. E finalmente, do Erlenmeyer de 1000 mL é

possível inocular o balão contendo 3L (litros) de meio com densidade inicial de  $5,2 \times 10^5$  células por litro (cél.L<sup>-1</sup>), também mantidos nas prateleiras.

Figura IV.1 - Sequência de propagação da cultura.



Fonte: Aatoria Própria

A fim de preservar os inóculos, após quatro dias de propagação da cultura de origem, nos Erlenmeyers de 1000 mL, são retiradas alíquotas de 5 mL que são transferidas para tubos de vidro estéreis contendo 15 mL do meio do qual a alíquota foi retirada, esses são mantidos em incubadora.

Na incubadora, as condições de cultivo utilizadas foram temperatura de 23°C, sob intensidade luminosa de  $80 \mu\text{mol.m}^2\text{s}^{-1}$  dentro de um fotoperíodo de 12 h e agitação manual três vezes por semana promovendo a ressuspensão das células com o objetivo de impedir sua decantação prolongada. A incubadora possui um sistema de controle digital de temperatura e iluminação artificial fornecida por duas lâmpadas fluorescentes na vertical (Luz do dia, 20 W, 80 cm, OSRAM).

Na prateleira, as condições de cultivo utilizadas foram 23°C, fotoperíodo 12 h e uma intensidade luminosa de  $400 \mu\text{mol.m}^2\text{s}^{-1}$ , agitação por ar comprimido a uma vazão de 1,0 litro por minuto (L.min<sup>-1</sup>) feita por compressor conectado a mangueiras de silicone ligadas a varetas de vidro dispostas no interior da vidraria. Nelas a iluminação é fornecida unilateralmente e artificialmente por meio de lâmpadas fluorescentes tubulares (Luz do dia especial, 20 W, 60 cm, OSRAM) fixadas no fundo da estante de cultivo. O circuito elétrico da estante de cultivo que controla a iluminação tem um temporizador (*timer*) acoplado que permite a regulação do fotoperíodo.

A densidade do fluxo de fótons da radiação fotossinteticamente ativa foi estimada por meio de um sensor quântico LI – 250A (Li-Cor Inc., USA) acoplado a um integrador radiométrico (Li-Cor Inc., USA). As medidas foram realizadas na superfície externa dos Erlenmeyers e balões de cultivo. A esterilização do ar comprimido injetado



ocorre através de um filtro (porosidade de  $0,20\mu\text{m}$ , 25 mm de diâmetro, CHROMAFIL) que se conecta entre o tubo de vidro e a rede de aeração via conectores de silicone.

#### IV.4. Cultivo em balão de 3 L da microalga *Chlorella* sp.

O processo de crescimento necessário para inocular o balão de 3L foi realizado, como descrito pela seção (IV.3). Após esse processo, os balões de 3L, com os diferentes meios e já esterilizados, foram inoculados com uma concentração inicial de células de  $5,2 \times 10^5 \text{ cél.L}^{-1}$ . Esses balões foram mantidos a temperatura controlada em  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , intensidade luminosa  $400 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e agitação constante, por meio de aeração com um fluxo de ar de  $1\text{L.min}^{-1}$  distribuído por um compressor por meio de mangueiras de silicone conectadas a varetas de vidro dispostas no interior dos balões, como demonstrado na Figura IV.2.

Figura IV.2 - Cultivo da microalga *Chlorella* sp. em balão de 3L.



Fonte: Autoria Própria

Todos os experimentos foram realizados em 3L de meio como descrito acima, e em todos foi analisada a produtividade de biomassa, a cinética de crescimento celular e o teor de lipídeos acumulado pela microalga *Chlorella* sp. Foram coletadas amostras de 50 mL de todos os cultivos a cada 24h para determinar a densidade celular e a biomassa seca, e utilizou-se água deionizada estéril para repor a água evaporada dos meios. No final de cada experimento o cultivo foi centrifugado a 8000 rpm durante 15 minutos e determinado o teor de lipídeos pelo Método J: Schmid-Bondzynski-Ratzlaff (modificado) (IDF, 1986).

#### IV.5. Avaliação de diferentes meios de cultivo para a produção de biomassa.

Com o intuito de analisar a produtividade de biomassa, a cinética de crescimento celular e o teor de lipídeos acumulado pela microalga em diferentes meios de cultivo foram realizados dois cultivos (Tabela IV.3), um em meio ASM-1 e o segundo em meio BG 11 durante 15 dias, todos submetidos às mesmas condições de cultivo. Sendo essas condições: fotoperíodo de 12h, aeração a1 L.min<sup>-1</sup> e intensidade luminosa 400 μmol fótons m<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>. Todos os meios foram iniciados com densidade de 5,2x10<sup>5</sup> cél.L<sup>-1</sup> em balões volumétricos de 3L contendo 3L dos diferentes meios.

Tabela IV.3 - Tabela demonstrativa dos cultivos realizados para a avaliação da produtividade de biomassa, a cinética de crescimento celular e o teor de lipídeos da *Chlorella* sp. em diferentes meios de cultivo.

Cultivos	Meios de cultivo
Cultivo I	ASM-1
Cultivo II	BG 11

Fonte: Autoria Própria

Durante o período de 15 dias, amostras do cultivo foram retiradas a cada 24h para análise de densidade celular e análise de biomassa seca com o objetivo de avaliar a cinética de crescimento. Ao final do período de cultivo, as culturas foram centrifugadas a 8000 rpm por 15 min, e analisou-se o teor de lipídeos na biomassa utilizando o método Método J: Schmid-Bondzynski-Ratzlaff (modificado) (IDF, 1986).

#### IV.6. Avaliação do efeito das diferentes condições de cultivo no crescimento e acúmulo de lipídeos na microalga *Chlorella* sp.

A partir dos resultados da densidade linear e produtividade de biomassa, os meios ASM-1 e o BG 11 foram utilizados para se estudar o efeito de diferentes condições de cultivo, incluindo situação de stress (depleção de nitrato e fosfato). Novamente, a produtividade de biomassa, a cinética de crescimento celular e o teor de lipídeos em todos os cultivos realizados nessa etapa foram avaliados.

Com o intuito de tentar aumentar a produção de lipídeos acumulados pela *Chlorella* sp., os cultivos em condição de depleção de nitrato ou fosfato foram divididos em duas etapas, como sugerido por BECKER (1994). Primeiro, cultivou-se, durante 7 dias microalgas nas concentrações normais dos componentes dos meios de cultivos selecionados, e numa segunda fase essa cultura foi suplementada com seus específicos

meios com carência da concentração ora de fosfato ora de nitrogênio em relação a concentração do cultivo original.

O experimento se deu em quatro fases (Tabela IV.4). Na primeira, foram realizados dois cultivos, um utilizando meio ASM-1 (C1), outro meio BG 11 (C2), suplementados ao sétimo dia com 100 mL dos meios de cultivo esterilizados, contendo neles a concentração original dos componentes necessários para 3L de meio. Tais experimentos serviram como controle para os experimentos das fases seguintes.

Na segunda fase, foram realizados dois cultivos, também com ASM-1 (A1) e BG 11 (B1) suplementados ao sétimo dia com 100 mL de meio de cultivo contendo a concentração original dos componentes necessários para 3L de meio, exceto, pela concentração de nitrato que é reduzida à metade de seus respectivos meios originais.

Na terceira fase, os cultivos com os meios ASM-1 e BG 11 foram suplementados ao sétimo dia com 100 mL de meio de cultivo contendo a concentração original dos componentes necessários para 3L de meio, exceto, pela concentração de fosfato também reduzida à metade da concentração desse em seus respectivos meios originais.

Na quarta fase, foram realizados dois cultivos, com meios ASM-1 e BG 11 suplementados ao sétimo dia com 100 mL de meio de cultivo contendo a concentração original dos componentes necessários para 3L de meio, exceto, pela concentração de nitrato que foi reduzida à 25% de seus respectivos meios originais.

No processo chamado de suplementação eram retirados 100 mL da cultura, e esse volume era repostos por 100 mL de meio esterilizado, contendo a quantidade de compostos necessários para os 3L de cultivo (com as concentrações de alguns nutrientes alteradas de acordo com a necessidade de cada experimento), todos os processos realizados em câmara de fluxo. E assim como nos cultivos anteriores, as condições de cultivo em todas as fases foram: fotoperíodo de 12 h, aeração a  $1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  e intensidade luminosa  $400 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^2\text{s}^{-1}$ . Todos os experimentos foram iniciados com densidade de  $5,2 \times 10^5 \text{ c\u00e9l}\cdot\text{L}^{-1}$  em bal\u00e7es volum\u00e9tricos de 3L contendo 3L dos diferentes meios.

Tabela IV.4 - Tabela demonstrativa dos experimentos realizados, exibindo a concentração no nitrato e fosfato suplementados à cultura no sétimo dia de cultivo.

Fases do experimento	Meios de cultivo	Experimento	Concentração de nitrato do suplemento (mg.L <sup>-1</sup> )	Concentração de fosfato do suplemento (mg.L <sup>-1</sup> )
Fase I	ASM-1	C1	170	53
	BG 11	C2	1500	30,53
Fase II	ASM-1	A1	85	53
	BG 11	B1	750	30,53
Fase III	ASM-1	A2	170	26,5
	BG 11	B2	1500	15,265
Fase IV	ASM-1	A3	42,5	53
	BG 11	B3	375	30,53

Fonte: Autoria Própria

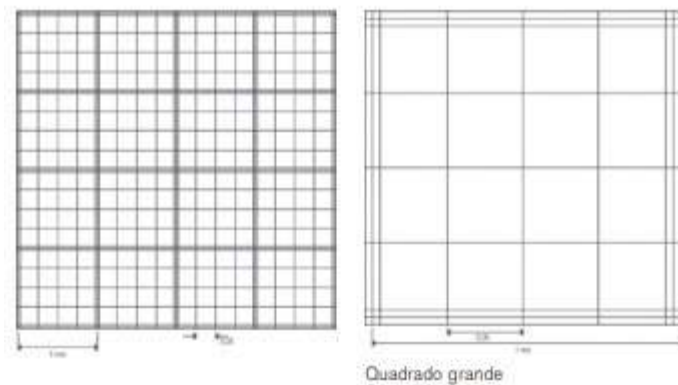
Diariamente, amostras foram retiradas de todos os cultivos para o acompanhamento da densidade celular e o peso seco da biomassa. Os tempos de cultivo foram baseado no crescimento de cada cultura pela densidade celular, a partir do momento que o crescimento celular entrava na fase estacionária ou de morte os cultivos eram centrifugados a 8000rpm por 15 minutos e a biomassa utilizada para análise do teor de óleo. Por isso, os diferentes tempos de cultivo nas fases específicas do experimento.

## IV.7. Métodos analíticos

### IV.7.1. Densidade celular

A densidade celular da microalga *Chlorella* sp., ao longo de todos os cultivos, foram acompanhadas diariamente pela contagem de células em microscópio (modelo Olympus SC30) com um aumento de 40 vezes, utilizando uma câmara de Fuchs-Rosenthal (Figura IV.3). A densidade celular foi expressa em número de células por litro de cultivo (cel.L<sup>-1</sup>), sendo esse o valor médio de três contagens. Com os dados experimentais obtidos foi possível a construção de gráfico da densidade em função do número de dias dos cultivos.

Figura IV.3 - Câmara de Fuchs-Rosenthal, a direita sua visão ampla e a esquerda um "quadrado grande" ampliado.

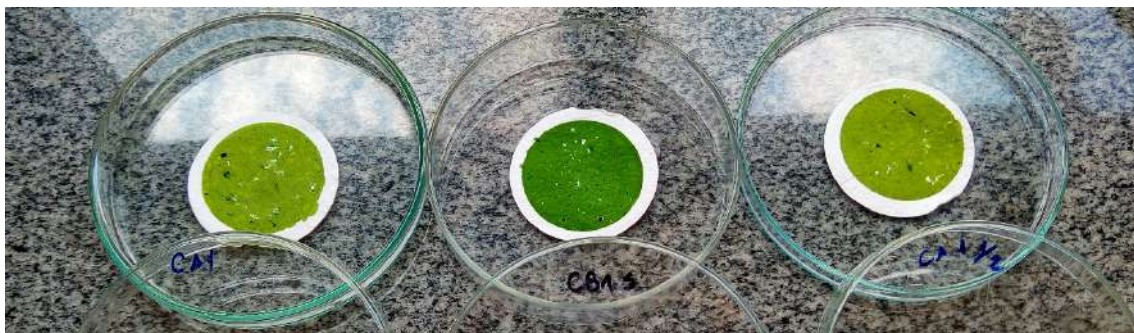


Fonte: BLAUBRAND

#### IV.7.2. Determinação da biomassa seca

A determinação da biomassa seca foi determinada por gravimetria. Inicialmente, membranas são calcinadas por 1h a 575°C, resfriadas e pesadas para determinação de seu peso inicial ( $m_i$ ). E então, 15 mL de amostra de cada cultivos são lavadas com 15 mL de água deionizada em tubos Falcon a biomassa separada com auxílio de centrífuga a 3500 rpm por 15 minutos e posteriormente, o sobrenadante é descartado. O processo de lavagem e centrifugação são repetidos por três vezes. E então, o decantado é filtrado num processo de filtração a vácuo e as membranas são lavadas com 15 ml de solução de  $0,25 \text{ mol.L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Finalmente, a membrana é posta em estufa a 60°C por 1h, depois e novamente resfriada em dessecador, e tem seu peso final ( $m_f$ ) registrado (Figura IV.4). A determinação de peso seco de cada amostra foi realizada em triplicata.

Figura IV.4 - Membranas após o processo para a determinação do peso seco da microalga *Chlorella* sp.



Fonte: Autorial Própria

A biomassa seca de cada cultivo foi determinada pelo valor médio da triplicata do processo de cada amostra e expresso em miligramas por litro (mg.L<sup>-1</sup>), sendo calculado a partir da Equação IV.1.

$$X = \frac{m_f - m_i}{0,015}$$

**Equação IV.1**

Onde:

X = concentração de biomassa seca em g L<sup>-1</sup>

m<sub>i</sub> = massa da membrana calcinada sem amostra filtrada em g

m<sub>f</sub> = massa da membrana com amostra filtrada em g

### **IV.7.3. Determinação da velocidade específica de crescimento e tempo de duplicação**

A velocidade específica de crescimento (μ) e o tempo de duplicação foram determinados na fase exponencial do crescimento da biomassa microalgácea. Ambos foram obtidos utilizando, respectivamente, a Equação IV.2 e a Equação IV.3 proposta por STEIN (1973). O tempo de duplicação é o tempo necessário para que a população inteira se duplique.

$$\mu = \frac{\ln X_f - \ln X_i}{t_f - t_i}$$

**Equação IV.2**

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

**Equação IV.3**

Onde:

μ = velocidade específica de crescimento (d<sup>-1</sup>)

X<sub>i</sub> = densidade celular inicial (cel.L<sup>-1</sup>)

X<sub>f</sub> = densidade celular final (cel.L<sup>-1</sup>)

t<sub>i</sub> = tempo inicial da fase exponencial de crescimento (d)

t<sub>f</sub> = tempo final da fase exponencial de crescimento (d)

t<sub>d</sub> = tempo de duplicação (d)

#### IV.7.4. Determinação da produtividade em biomassa e em células

O cálculo da produtividade em biomassa e em células da microalga foi avaliado a partir da Equação IV.4.

$$P = \frac{X_f - X_i}{t}$$

**Equação IV.4**

Onde:

P= produtividade em biomassa (mg.L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) ou em células (cel.L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>)

X<sub>i</sub>= biomassa seca inicial (mg.L<sup>-1</sup>) ou densidade celular inicial (cel. L<sup>-1</sup>)

X<sub>f</sub>= biomassa seca final (mg.L<sup>-1</sup>) ou densidade celular final (cel. L<sup>-1</sup>)

t= intervalo de tempo entre X<sub>i</sub> e X<sub>f</sub> (d)

#### IV.7.5. Determinação do teor de lipídeos

A determinação de lipídeos pelo método J: Schmid-Bondzynski-Ratzlaff modificado (IDF, 1986) é baseado na hidrólise da biomassa com ácido clorídrico, adição de álcool etílico e subsequente extração com éter etílico e éter de petróleo.

O procedimento foi realizado em triplicata da seguinte forma: pesou-se de 1 g de biomassa liofilizada, adicionou-se 10 mL da solução de ácido clorídrico 8M (mol.L<sup>-1</sup>) e homogeneizou-se manualmente. As amostras foram aquecidas diretamente na placa de aquecimento a 70°C por 10 minutos diretamente na placa de aquecimento. Após o tempo da digestão, observou-se no microscópio a estrutura da parede celular da microalga. Posteriormente foram adicionados 10 mL de álcool etílico, agitando-se manualmente por 30 segundos; adicionou-se 25 mL de éter etílico e 25 mL de éter de petróleo, agitando-se por mais 1 minuto. A seguir a amostra foi centrifugada a 3500 rpm por 15 min. A fase etérea foi transferida para um funil de separação e lavada com água deionizada para remoção do HCl até alcançar um pH entre 6-7, em seguida foi transferida para um balão previamente tarado. Os solventes foram rota-evaporados a 65°C a pressão ambiente e o balão com o óleo foi seco em estufa a 60°C até peso constante.

Figura IV.5 - Lavagem fase etérea com água deionizada para remoção do HCl.



Fonte: Autoria Própria

O teor de óleo foi determinado de acordo com a Equação IV.5.

$$T_{oi} = 100 \cdot \frac{m_3 - m_1}{m_2}$$

**Equação IV.5**

Onde:

$T_{oi}$  = teor de óleo (%)

$m_1$  = massa do balão (g)

$m_2$  = massa da amostra (g)

$m_3$  = massa do balão com material extraído e seco (g)

#### **IV.7.6. Determinação da produtividade de óleo**

A produtividade de óleo foi obtida de acordo com a Equação IV.6.

$$P_{oi} = \frac{(X_f - X_i) \cdot T_{oi}}{t}$$

**Equação IV.6**

Onde:

$P_{oi}$  = produtividade de óleo ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )

$X_i$  = biomassa seca inicial ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )

$X_f$  = biomassa seca final ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )



$T_{ol} = \text{teor de \u00f3leo (\%)}$

$t = \text{intervalo de tempo entre } X_i \text{ e } X_f \text{ (d)}$

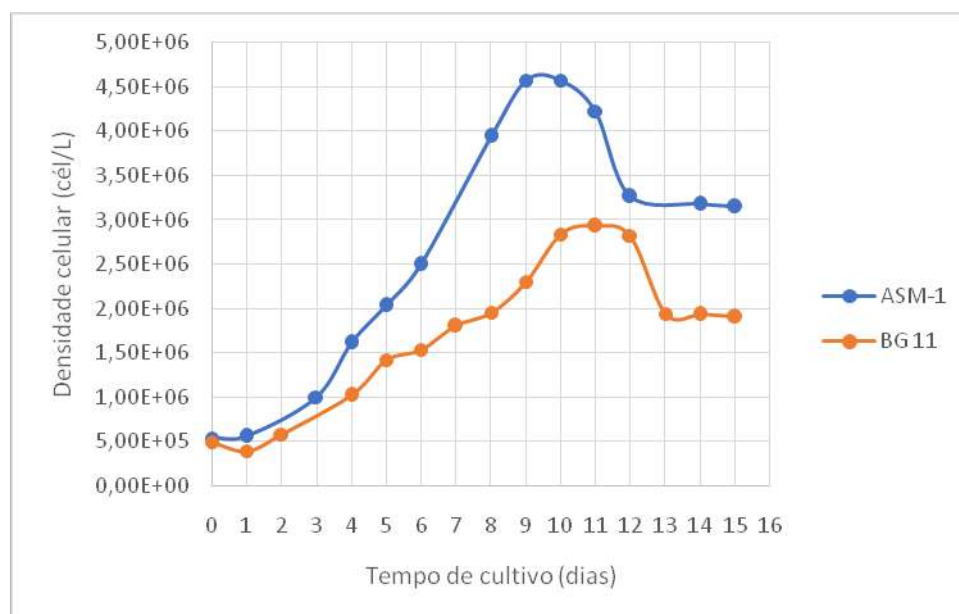
## Capítulo V

### V. Resultados e Discussões

#### V.1. Crescimento celular e produtividade da microalga *Chlorella* sp. em diferentes meios de cultivo.

Na Figura V.1 apresenta-se o crescimento celular no cultivo do inóculo da microalga *Chlorella* sp. em meio de cultivo ASM-1 e BG 11 com uma concentração inicial de aproximadamente  $5,2 \pm 0,27 \times 10^5$  cél.L<sup>-1</sup>, 3L de cultivo, temperatura controlada de  $23 \pm 2$  °C, intensidade luminosa  $4000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^2\text{s}^{-1}$ , pH inicial 7.0 para o meio ASM-1 e 8.0 para o meio BG 11, agitação constante, por meio de aeração com um fluxo de ar atmosf\u00e9rico de  $1\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Figura V.1 - Curva de crescimento celular no cultivo do in\u00f3culo da microalga *Chlorella* sp. em diferentes meios. Os valores s\u00e3o a m\u00e9dia de tr\u00eas r\u00e9plicas  $\pm$  desvio padr\u00e3o.

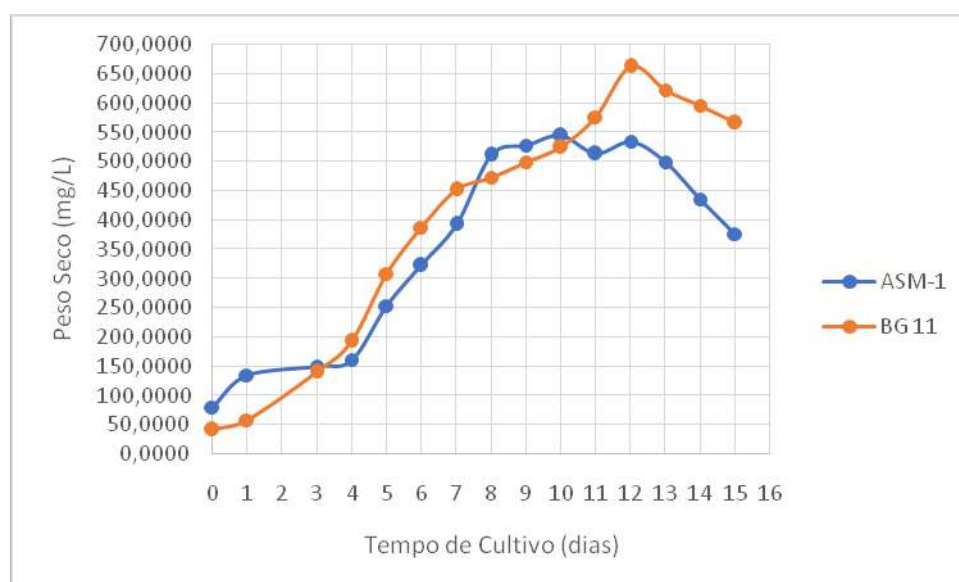


A fase exponencial de crescimento nos meios ASM-1 e BG 11 tiveram início após a fase de adaptação, aproximadamente 24 horas para ambos os meios, tendo crescimento exponencial até o nono dia para o meio ASM-1, atingindo  $4,58 \times 10^6$  cél.L<sup>-1</sup>, e até o décimo para o meio BG 11, atingindo  $2,84 \times 10^6$  cél.L<sup>-1</sup>. O intervalo de tempo relativo à fase exponencial foi utilizado para os cálculos dos parâmetros da Tabela V.1.

A velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) para as células em meio ASM-1 foi de  $0,23 \pm 0,1 \text{ d}^{-1}$  e em meio BG 11  $0,20 \pm 0,2 \text{ d}^{-1}$ , resultando num tempo de duplicação ( $t_d$ ) de  $3,0 \pm 0,1 \text{ d}$  e  $3,5 \pm 0,1 \text{ d}$ . Apesar dos resultados terem valores bem aproximados, a produtividade de células ( $P_{cél}$ ) no meio ASM-1 foi superior ao cultivo em meio BG 11, sendo  $4,5 \pm 0,3 \times 10^5 \text{ cél.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  para o ASM-1 e  $2,5 \pm 0,2 \times 10^5 \text{ cél.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ . Todos esses parâmetros estão apontados na Tabela V.1.

Na figura V.2 apresenta-se a variação da biomassa seca ao longo do tempo de cultivo dos inóculos nos diferentes meios. A partir desses dados, estimou-se a produtividade de biomassa, valor apontado na Tabela V.1.

Figura V.2 - Variação da biomassa seca da microalga *Chlorella* sp. ao longo do tempo de cultivo dos inóculos nos diferentes meios. Os valores são a média de três réplicas  $\pm$  desvio padrão.



Apesar da produtividade de células ( $P_{cél}$ ) do cultivo do meio ASM-1 ter sido maior que a do cultivo com BG11, o inverso se observa com a produtividade de biomassa ( $P_{bio}$ ). Sendo a  $P_{bio}$  do cultivo ASM-1 de  $43,75 \pm 0,2$  e do cultivo BG 11,  $51,83 \pm 0,3$ . Entretanto, o teor de lipídeos aferido nos cultivos teve valores bem próximos, sendo 3,47 % para o cultivo do meio ASM-1 e 3,48 % para o meio BG11.

Tabela V.1 - Velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ), tempo de duplicação ( $t_d$ ), máxima biomassa seca atingida durante o cultivo ( $X$ ), produtividade de células ( $P_{cél}$ ) e de biomassa ( $P_{bio}$ ), teor de óleo ( $T_{óle}$ ) e produtividade de óleo ( $P_{óle}$ ).

Meios	$\mu (\text{d}^{-1})$	$t_d (\text{d})$	$P_{cél} (\text{cél.L}^{-1}.\text{d}^{-1})$	$X_{máx} (\text{mg.L}^{-1})$	$P_{bio} (\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1})$	$T_{óle} (\%)$	$P_{óle} (\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1})$
ASM-1	$0,23 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,1$	$4,5 \pm 0,3 \text{E}+05$	$544,44 \pm 27,76$	$43,75 \pm 0,2$	$3,47 \pm 0,67\%$	$0,69 \pm 0,1$
BG 11	$0,20 \pm 0,2$	$3,5 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,2 \text{E}+05$	$662,67 \pm 47,70$	$51,83 \pm 0,3$	$3,48 \pm 0,69\%$	$1,22 \pm 0,2$

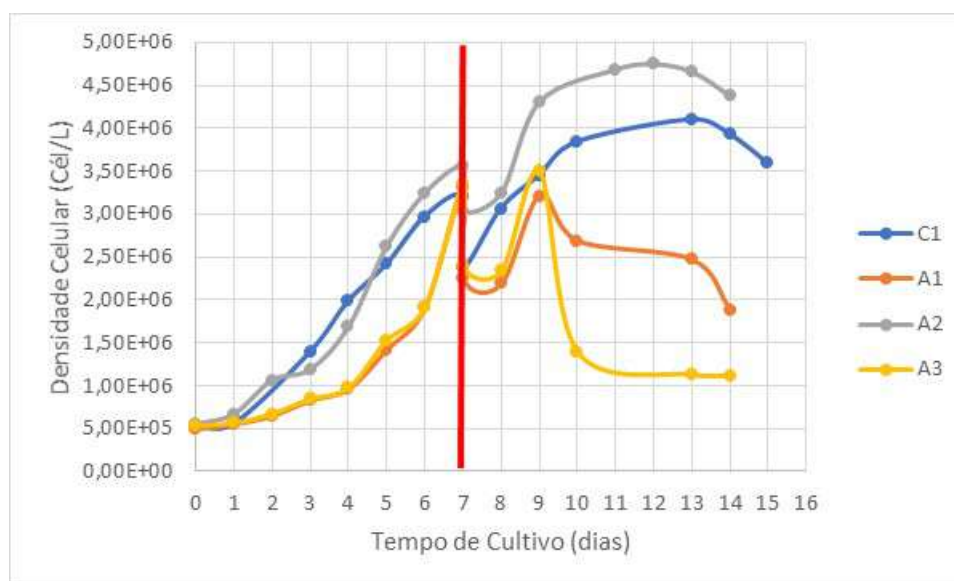
Fonte: Autoria Própria

## V.2. Crescimento celular e produtividade da microalga *Chlorella* sp. em diferentes condições de cultivo.

A avaliação do crescimento e da produtividade de células e biomassa foram realizadas pela contagem de células por intermédio de microscópio e determinação de peso seco, ambas análises realizadas com amostras diárias ao longo do cultivo. Os meios usados foram o ASM-1 e BG 11, todos os cultivos foram realizados com uma concentração inicial de aproximadamente  $5,2 \times 10^5$  cél.L<sup>-1</sup>, 3L de cultivo, temperatura controlada de  $23 \pm 2$  °C, intensidade luminosa  $4000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^2\text{s}^{-1}$ , pH inicial 7.0 para o meio ASM-1 e 8.0 para o meio BG 11 e agitação constante, por meio de aeração com um fluxo de ar atmosférico de 1 L.min<sup>-1</sup>. Porém, foram empregadas diferentes alterações ao longo dos cultivos com o intuito de otimizar a produtividade de biomassa e óleo.

A Figura V.3 demonstra as curvas de crescimento relativas aos experimentos C1, A1, A2 e A3, todos realizados em meio ASM-1. Sendo o C1 suplementado ao sétimo dia com a concentração integral de nitrogênio e fósforo ( $170 \text{ mg. L}^{-1}$  de nitrato e  $53 \text{ mg. L}^{-1}$  de fosfato), o A1 suplementado ao sétimo dia com metade da concentração de nitrogênio ( $85 \text{ mg. L}^{-1}$  de nitrato), o A2 suplementado ao sétimo dia com metade da concentração de fósforo ( $26,5 \text{ mg. L}^{-1}$  de fosfato) e o A3 suplementado ao sétimo dia com um quarto da concentração de nitrogênio ( $42,5 \text{ mg. L}^{-1}$  de nitrato).

Figura V.3 - Curva de crescimento da microalga *Chlorella* sp. em meio ASM-1 relativas aos experimentos C1, A1, A2 e A3.



Fonte: Autoria Própria

A fase exponencial de crescimento dos experimentos C1, A1, A2 e A3 tiveram início após a fase de adaptação, aproximadamente 24 horas. Ao sétimo dia a fase exponencial foi interrompida para a suplementação dos cultivos. Nesse dia, os experimentos C1, A1, A2 e A3 atingiram uma densidade celular de  $3,20 \times 10^6$  cél.L<sup>-1</sup>,  $3,31 \times 10^6$  cél.L<sup>-1</sup>,  $3,56 \times 10^6$  cél.L<sup>-1</sup> e  $3,35 \times 10^6$  cél.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Não havendo grande diferença na densidade, pois todos os cultivos se mantiveram com condições idênticas até o sétimo dia, tendo um produtividade em células ( $P_{cél}$ ) média de  $3,96 \pm 0,2 \times 10^5$  cél.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, velocidade de crescimento específico ( $\mu$ ) média de  $0,25 \pm 0,2$  d<sup>-1</sup> e tempo de duplicação ( $t_d$ ) de  $2,8 \pm 0,1$  d.

Após a suplementação, entretanto, se torna mais difícil identificar a fase log da curva. Porém, analisa-se que o experimento A1 e A3 com depleção de nitrato entram em fase de morte ao décimo dia, não sendo observada fase estacionária, a fim de calcular os parâmetros da Tabela V.2 considerou-se a fase exponencial desses cultivos entre o oitavo e nono dia. Enquanto, os experimentos C1 e A2, entram em fase estacionária entre o décimo e nono dia, respectivamente, sem apresentar fase lag. As maiores densidades celulares na segunda etapa do experimento foram de  $4,10 \times 10^6$  cél.L<sup>-1</sup> para C1,  $3,21 \times 10^6$  cél.L<sup>-1</sup> para A1,  $4,75 \times 10^6$  cél.L<sup>-1</sup> para A2 e  $3,50 \times 10^6$  cél.L<sup>-1</sup> para A3.

Tabela V.2 – Tabela com os parâmetros específicos de cada experimento antes da suplementação (1ª etapa) e após suplementação (2ª etapa) em meio ASM-1.

Experimentos	$\mu$ (d <sup>-1</sup> )		td (d)		$P_{cél}$ (cél.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )		Densidade Celular ao 7º dia (cél.L <sup>-1</sup> )		Densidade celular <sub>máx</sub> (cél.L <sup>-1</sup> )	
	ANTES	DEPOIS	ANTES	DEPOIS	ANTES	DEPOIS	ANTES	DEPOIS	ANTES	DEPOIS
C1	0,25	0,12	2,8	5,8	3,78E+05	3,66E+05	3,20E+06	2,38E+06	3,20E+06	4,10E+06
A1	0,25	0,19	2,7	3,6	3,94E+05	5,13E+05	3,31E+06	2,25E+06	3,31E+06	3,21E+06
A2	0,24	0,12	2,9	5,9	4,14E+05	4,25E+05	3,35E+06	2,40E+06	3,35E+06	4,75E+06
A3	0,25	0,20	2,7	3,4	3,98E+05	5,80E+05	3,56E+06	3,04E+06	3,56E+06	3,50E+06

Fonte: Autoria Própria

A Tabela V.2 demonstra que a maior produtividade celular, na segunda etapa do experimento, se deu nos cultivos com depleção de nitrato, sendo de  $5,13 \times 10^5$  cél.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para A1 e  $5,80 \times 10^5$  cél.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para A3. Porém, como ambos os cultivos com redução de concentração de nitrogênio entram em fase de morte rapidamente e tem um período de crescimento exponencial muito curto, os maiores valores de densidade celular foram alcançados pelos cultivos C1 e A2.

A Figura V.4 demonstra o avanço da biomassa seca em  $\text{mg.L}^{-1}$  ao longo do tempo de cultivo para os experimentos C1, A1, A2 e A3.

Figura V.4 - Variação da biomassa seca da microalga *Chlorella* sp. ao longo do tempo de cultivo dos inóculos em meio ASM-1 relativa aos experimento C1, A1, A2 e A3. Os valores são a média de três réplicas  $\pm$  desvio padrão.



Fonte: Autorial Própria

O mesmo período exponencial de crescimento celular em dias, anteriormente utilizado para o cálculo dos parâmetros da Tabela V.2, foi utilizado para calcular a produtividades de biomassa ao longo dos cultivos ( $\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ), demonstradas na Tabela V.3. Ou seja, para a primeira etapa dos experimentos C1, A1, A2 e A3 se consideraram a fase exponencial do primeiro ao sétimo dia; para os experimentos A1 e A3, na segunda etapa considerou-se a fase exponencial do oitavo ao nono dia, e para os cultivos C1 e A2 após suplementação (DEPOIS), a fase exponencial foi considerada entre o sétimo e décimo dia para C1 e do sétimo ao nono dia para A2.

Tabela V.3 – Tabela com parâmetros relativos a biomassa seca dos experimento C1, A1, A2 e A3 cultivados em meio ASM-1.

Experimentos	$P_{\text{bio}}$ ( $\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ )		X ao 7º dia ( $\text{mg.L}^{-1}$ )		$X_{\text{máx}}$ ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	
	ANTES	DEPOIS	ANTES	DEPOIS	ANTES	DEPOIS
C1	78,73 $\pm$ 0,2	73,89 $\pm$ 0,2	668,89 $\pm$ 12,13	586,67 $\pm$ 10,18	668,89 $\pm$ 12,13	931,11 $\pm$ 36,71
A1	60,32 $\pm$ 0,1	9,44 $\pm$ 0,3	551,11 $\pm$ 27,32	548,89 $\pm$ 12,33	548,89 $\pm$ 27,32	835,56 $\pm$ 73,43
A2	52,70 $\pm$ 0,1	47,07 $\pm$ 0,1	460,00 $\pm$ 4,56	432,11 $\pm$ 9,34	460 $\pm$ 4,56	802,22 $\pm$ 10,18
A3	61,44 $\pm$ 0,3	21,30 $\pm$ 0,1	595,56 $\pm$ 3,85	594,55 $\pm$ 8,81	595,56 $\pm$ 3,85	863,47 $\pm$ 12,23

Fonte: Autorial Própria

A partir da Tabela V.3 pode-se notar que a produtividade em relação à biomassa, assim como em relação à densidade celular, é menor nos experimentos A1 e A3 com depleção de nitrato. Entretanto, com exceção do controle 1, esses foram os que tiveram maior peso de biomassa seca no período de cultivo, 835,56 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para A1 e 863,47 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para A3.

Os resultados de produtividade tanto em células como em biomassa, a velocidade específica e o tempo de duplicação para esses experimentos não demonstraram ser muito representativos, pois levam o tempo da fase exponencial em consideração e os cultivos A1 e A3 tiveram essa fase muito reduzida.

Na Tabela V.2, verifica-se que a produtividade em número de células é maior em A1 e A3. Entretanto, produzem as menores densidades celulares em relação aos outros cultivos. Assim como, a produtividade em biomassa dos cultivos A1 e A3 são menores, mas a concentração de biomassa seca é maior em relação aos outros experimentos.

Em A2 obteve-se a maior densidade celular, 4,75x10<sup>6</sup> cél.L<sup>-1</sup>, em contrapartida a menor densidade de biomassa seca, 802,22±10,18 mg.L<sup>-1</sup>. Se comparada ao cultivo ASM-1 sem alterações tanto o valor da densidade celular como o da densidade de biomassa seca tiveram aumento. Entretanto em relação ao controle (C1), a densidade celular aumentou e a biomassa seca diminuiu.

Após ser verificado que os meios com depleção de nitrogênio (A1 e A3) tiveram uma menor concentração em número de células e uma maior concentração de biomassa seca. Infere-se que o carbono fixado está sendo direcionado, principalmente a síntese de reserva de carbono, deixando a células mais pesada, como proposto por LI *et al.* (2011). Porém, existem duas fontes principais de reserva de carbono, amido e lipídios. Para a produção de biodiesel, a reserva de interesse é a lipídica e na Tabela V.4, está exposta a produtividade de óleo para cada experimento.

Os resultados de teor de óleo para os experimentos A1 e A3 se mostraram superiores ao teor obtido na biomassa cultivada sem suplementação. O meio alterado A2 não teve seu resultado de teor de óleo diferenciado do meio ASM-1 sem suplementação. Enquanto o controle (C1) teve o maior teor de óleo dentre todos os meios, sendo um resultado esperado visto à densidade da biomassa seca máxima alcançada nesse experimento.

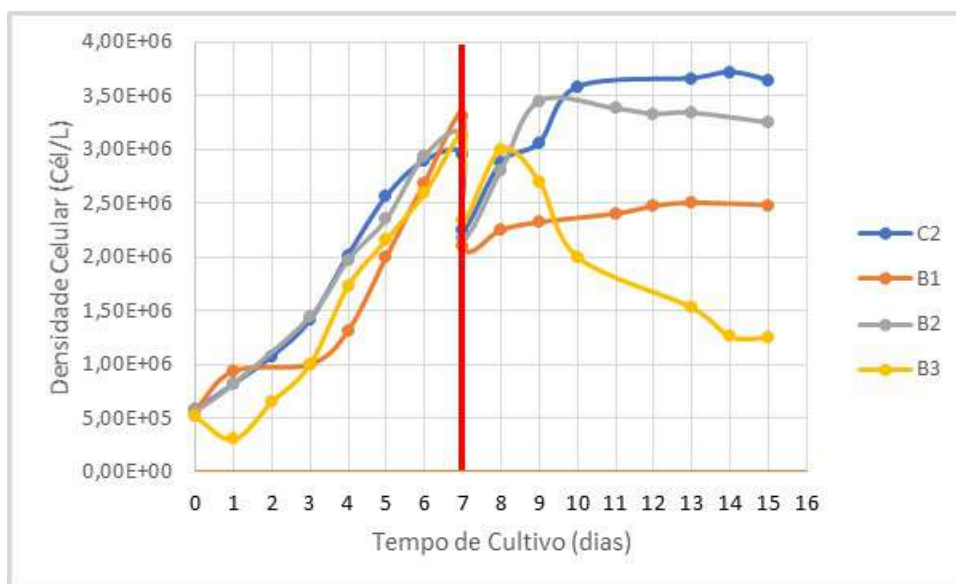
Tabela V.4 – Tabela com os teor e produtividade de óleo no meio de cultivo sem alterações (ASM-1) e nos meios com alterações (C1, A1, A2 e A3).

Experimentos	$T_{\text{óle}}$ (%)	$P_{\text{óle}}$ (mg.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )
ASM-1	3,47±0,67%	0,69±0,1
C1	8,39±0,11%	5,07±0,1
A1	5,24±0,26%	2,71±0,1
A2	3,06±0,47%	1,88±0,2
A3	6,34±0,25%	3,70±0,1

Fonte: Autorial Própria

A Figura V.5 exibe as curvas de crescimento relativas aos experimentos C2, B1, B2 e B3, todos realizados em meio BG11. Sendo o C2 suplementado ao sétimo dia com a concentração integral de nitrogênio e fósforo (1500 mg. L<sup>-1</sup> de nitrato e 30,53 mg. L<sup>-1</sup> de fosfato), o B1 suplementado ao sétimo dia com metade da concentração de nitrogênio (750 mg. L<sup>-1</sup> de nitrato), o B2 suplementado ao sétimo dia com metade da concentração de fósforo (15,265 mg. L<sup>-1</sup> de fosfato) e o B3 suplementado ao sétimo dia com um quarto da concentração de nitrogênio (375 mg. L<sup>-1</sup> de nitrato).

Figura V.5 - Curva de crescimento da microalga *Chlorella* sp. em meio BG 11 relativas aos experimentos C2, B1, B2 e B3.



Fonte: Autorial Própria

A fase de adaptação das cepas nos experimentos C2 e B2 não foram identificadas, enquanto, o tempo de adaptação de B1 e B3 foram de aproximadamente 3 e 1 dia, respectivamente. Ao sétimo dia a fase exponencial foi interrompida para a suplementação dos cultivos. Nesse dia, os experimentos C2, B1, B2 e B3 atingiram uma



densidade celular de  $2,95 \times 10^6$  cél.L<sup>-1</sup>,  $3,31 \times 10^6$  cél.L<sup>-1</sup>,  $3,13 \times 10^6$  cél.L<sup>-1</sup> e  $3,13 \times 10^6$  cél.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Os cultivos se mantiveram com condições idênticas até o sétimo dia, tendo um produtividade em células ( $P_{cél}$ ) média de  $3,71 \pm 0,3 \times 10^5$  cél.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, velocidade de crescimento específico ( $\mu$ ) média de  $0,25 \pm 0,2$  d<sup>-1</sup> e tempo de duplicação ( $t_d$ ) de  $2,9 \pm 0,1$  d.

Na Tabela V.5 foram calculados os parâmetros para o crescimento celular nas primeira e segunda etapas dos experimentos, tais cálculos necessitam do tempo de crescimento exponencial para serem realizado. Entretanto, após a suplementação, a fase log do B1 não foi identificada, passando o experimento por uma fase lag de 24 h e depois entrando em fase estacionária. Para o experimento B3 a base de cálculos foi com o período de crescimento exponencial entre o sétimo e oitavo dia. Por fim, o experimento C2 e B2 não apresentam fase lag, e seu crescimento exponencial foi até o décimo e nono dia, respectivamente. As maiores densidades celulares na segunda etapa do experimento foram de  $3,72 \times 10^6$  cél.L<sup>-1</sup> para C2,  $2,50 \times 10^6$  cél.L<sup>-1</sup> para B1,  $3,45 \times 10^6$  cél.L<sup>-1</sup> para B2 e  $3,00 \times 10^6$  cél.L<sup>-1</sup> para B3.

Tabela V.5 - Tabela com os parâmetros específicos de cada experimento antes da suplementação (1ª etapa) e após suplementação (2ª etapa) em meio BG 11.

Experimentos	$\mu$ (d <sup>-1</sup> )		td (d)		$P_{cél}$ (cél.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )		Densidade Celular ao 7º dia (cél.L <sup>-1</sup> )		Densidade celular <sub>máx</sub> (cél.L <sup>-1</sup> )	
	ANTES	DEPOIS	ANTES	DEPOIS	ANTES	DEPOIS	ANTES	DEPOIS	ANTES	DEPOIS
C2	0,21	0,12	3,4	6,0	2,98E+05	3,33E+05	2,95E+06	2,25E+06	2,95E+06	2,25E+06
B1	0,24	12,29	2,9	0,1	4,62E+05	5,00E+04	3,31E+06	2,10E+06	3,31E+06	2,10E+06
B2	0,22	0,15	3,2	4,5	3,22E+05	4,25E+05	3,13E+06	2,18E+06	3,13E+06	2,18E+06
B3	0,33	0,12	2,1	5,6	4,03E+05	3,30E+05	3,13E+06	2,34E+06	3,13E+06	2,34E+06

Fonte: Autoria Própria

A Tabela V.5 demonstra que a maior produtividade celular, na segunda etapa do experimento, se deu no cultivo com depleção de fósforo, sendo de  $4,25 \times 10^5$  cél.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para B2. Os cultivos C2 e B3 tiveram valores de produtividade, após suplementação, bem próximo. Porém, os cultivos B1 e B3, com depleção de nitrato, apresentaram os menores valores de densidade celular.

A Figura V.6 demonstra o avanço da biomassa seca em mg.L<sup>-1</sup> ao longo do tempo de cultivo para os experimentos C2, B1, B2 e B3.

Figura V.6 - Variação da biomassa seca da microalga *Chlorella* sp. ao longo do tempo de cultivo dos inóculos em meio BG 11 relativa aos experimento C2, B1, B2 e B3. Os valores são a média de três réplicas  $\pm$  desvio padrão.



Fonte: Autoria Própria

O mesmo período exponencial de crescimento celular em dias, anteriormente utilizado para o cálculo dos parâmetros da Tabela V.5, foi utilizado para calcular a produtividades de biomassa ao longo dos cultivos ( $\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ), demonstradas na Tabela V.6. Ou seja, para a primeira etapa dos experimentos C2 e B2 considerou-se a fase exponencial do zero ao sétimo dia (sem fase lag); para o experimento B1, na primeira etapa considerou-se a fase exponencial do terceiro ao sétimo dia, e na segunda etapa não se identificou fase exponencial. No cultivo B3 anteriormente a suplementação, a fase exponencial foi considerada entre o primeiro e sétimo, e após esse processo do sétimo ao oitavo dia.

Tabela V.6 - Tabela com parâmetros relativos a biomassa seca dos experimento C2, B1, B2 e B3 cultivados em meio BG 11.

Experimentos	$P_{\text{bio}}$ ( $\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ )		X ao 7º dia ( $\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ )		$X_{\text{máx}}$ ( $\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ )	
	ANTES	DEPOIS	ANTES	DEPOIS	ANTES	DEPOIS
C2	72,95 $\pm$ 0,1	75,00 $\pm$ 0,2	648,89 $\pm$ 15,40	591,11 $\pm$ 10,18	648,89 $\pm$ 15,40	1120,00 $\pm$ 6,56
B1	54,44 $\pm$ 0,3	-	437,78 $\pm$ 13,88	428,89 $\pm$ 11,37	437,78 $\pm$ 13,88	1242,22 $\pm$ 10,36
B2	39,17 $\pm$ 0,1	35,93 $\pm$ 0,1	380,00 $\pm$ 3,85	344,44 $\pm$ 5,21	380,00 $\pm$ 3,85	1102,22 $\pm$ 12,54
B3	66,17 $\pm$ 0,2	65,56 $\pm$ 0,2	546,67 $\pm$ 21,43	508,89 $\pm$ 3,68	546,67 $\pm$ 21,43	1224,31 $\pm$ 21,27

Fonte: Autoria Própria

A partir da Tabela V.6 pode-se notar que nas condições de cultivo do experimento B1 foi obtido o maior peso de biomassa seca no período de cultivo, 1242,22  $\text{mg.L}^{-1}$ .

Porém, a fase exponencial de crescimento não foi identificada para a realização do cálculo da produtividade em biomassa.

Como visto anteriormente, os resultados de produtividade tanto em células como em biomassa, não são completamente representativos pelo curto tempo ou não identificação da fase de crescimento exponencial de alguns cultivos na segunda etapa dos experimentos. Assim, o tempo da fase log não representa o comportamento das células em todo seu período de cultivo após suplementação.

Na Tabela V.5, verifica-se que a produtividade em número de células na condição B2 é maior que a do controle (C2). Os cultivos B1 e B3 produzem as menores densidades celulares em relação aos outros cultivos. O inverso desse comportamento aconteceu com a densidade de biomassa seca nos mesmos cultivos, tendo os maior valores para B1 e B3,  $1242,22 \pm 10,36 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $1224,31 \pm 21,27 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente.

Os resultados obtidos para B2 se aproximam dos resultados obtidos pelo controle (C2). Contudo, se comparado ao cultivo do meio BG 11 sem suplementação, tanto o valor da densidade celular como o da densidade de biomassa seca tiveram aumento.

ÖRDÖG *et al.* (2012), comprovaram a elevação dos valores da densidade celular mediante redução da concentração de nitrogênio. O mesmo ocorreu com B1 e B3. Com o objetivo de analisar se esse aumento do peso seco da biomassa está relacionado com a otimização da produção de lipídeos pelas células, realizou-se o método J:Schmid-Bondzynski-Ratzlaff e a partir dele o cálculo de teor de lipídeos apresentado na Tabela V. 7.

Tabela V.7 - Tabela com os teor e produtividade de óleo no meio de cultivo sem alterações (BG 11) e nos meios com alterações (C2, B1, B2 e B3).

Experimentos	Teor de Óleo (%)	$P_{\text{óleo}}(\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1})$
BG 11	$3,48 \pm 0,69\%$	$1,22 \pm 0,2$
C2	$3,76 \pm 0,70\%$	$2,64 \pm 0,5$
B1	$4,67 \pm 0,12\%$	$3,67 \pm 0,1$
B2	$3,29 \pm 0,95\%$	$2,27 \pm 0,7$
B3	$6,57 \pm 0,15\%$	$5,09 \pm 0,1$

Fonte: Autoria Própria

Os resultados de teor de lipídeos para os experimentos B1 e B3 se mostraram superiores ao teor obtido na biomassa cultivada BG 11 sem suplementação. Os meios alterados C2 e B2 não tiveram seus resultados de teor de óleo diferenciado do meio BG

11 sem suplementação. Este resultado corrobora mostra que na condição de depleção de nitrogênio a microalga acumula maior teor de lipídeos.

## Capítulo VI

### VI. Conclusões

Diante dos resultados da depleção ora de nitrogênio, ora de fósforo nos meios de cultivo ASM-1 e BG 11 para o cultivo da microalga *Chlorella* sp. com objetivo de avaliar a produtividade de biomassa e lipídeos, foram propostas as seguintes conclusões:

1. O meio ASM-1 mostrou-se mais eficiente para o aumento do número de células da *Chlorella* sp., e o BG 11 mais eficiente na produtividade de biomassa. Porém, os teores de lipídeos encontrado nas células de ambos meios de cultivo apresentaram valores aproximados. Isso sugere que a acumulação de carbono nas células cultivadas em BG 11 seja dada por moléculas não lipídicas, como o amido, por exemplo.
2. Em condições de depleção de nitrogênio em meio ASM-1 a densidade relativa ao número de células decresceu, a concentração da biomassa seca e teor de lipídeos aumentaram em relação ao cultivo em ASM-1 sem suplementação. O experimento A3 com concentração de nitrato de 42,5 % (25% da concentração original do meio) teve maior concentração de biomassa seca e maior teor e produtividade de lipídeos que o A1 (depleção de 50%) de nitrogênio.
3. Em condições de depleção de fósforo em meio ASM-1 a *Chlorella* sp. se comportou semelhantemente ao cultivo em ASM-1 sem suplementação quanto ao teor de lipídeos. Entretanto, teve maior densidade de células e biomassa que esse. Pode ter ocorrido acumulação de carbono por outras vias que não a de formação de lipídeos.
4. Em condições de depleção de nitrogênio em meio BG 11 (B1 e B3), assim como nos cultivos A1 e A3, apresentaram aumento da densidade de biomassa e do teor de lipídeos. Porém, diferente do cultivo em meio ASM-1 sem suplementação, a densidade celular permaneceu bem semelhante ao do cultivo em meio BG 11

sem suplementação. A concentração de biomassa seca e o teor de óleo foi maior em A3 que utilizou 25% da concentração de nitrato do cultivo BG 11 original que em A1 com 50% da concentração deste componente.

5. A *Chlorella* sp. em depleção de 50% de fosfato (A2) se comportou semelhantemente ao cultivo em BG 11 sem suplementação quanto ao teor de lipídeos. Porém, a concentração celular máxima alcançada e a densidade de biomassa seca foram maiores em relação a esse. Novamente, acredita-se que esse comportamento ocorre, pois, as microalgas podem acumular carbono em outras formas, além dos lipídeos.
6. De forma geral, os controles cultivados em meio ASM-1 (C1) e BG 11 (C2) alcançaram valores maiores de densidade de biomassa e teor de lipídeos que as amostras cultivadas nos respectivos meios sem suplementação. O mesmo não ocorreu para a densidade celular.
7. De acordo com os resultados obtidos nas duas fases de cultivo, baixas concentrações de nitrato permitiram aumentar o conteúdo de lipídeos. Entretanto, a diminuição da concentração de fósforo aumentou o peso seco máximo de biomassa atingido pelos meios, mas diminuiu seus teores de lipídeos. Como sugerido por SUBRAMANIAN *et al.* (2013), acúmulo de amido é realizado com menor gasto energético do que o acúmulo de lipídeos. E o fósforo é indispensável nas reações de transferência de energia, podendo ser esse o motivo da redução do teor de óleo nos meios com depleção desse nutriente.

## Capítulo VII

### VII. Referências Bibliográficas

ANDERSEN, R. A. (2005). *Algal culturing techniques*. Ed. Elsevier Academic Press, USA, 578 p.

Anuário 2018 – Óleo Diesel. Plural, 2018. Disponível em:  
<<https://anuario2018.somosplural.com.br/oleo-diesel/>>. Acesso em: 25 de jun. de 2018.

AZEREDO, Vinícius Barbosa Salles. Produção de Biodiesel a partir do Cultivo de Microalgas: Estimativa Preliminar de Custos e Perspectivas para o Brasil. Dissertação (Mestrado em Ciências em Planejamento Energético) - Programa de Pós-Graduação em Planejamento Energético, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

BALL, S. et al. *The evolution of glycogen and starch metabolism in eukaryotes gives molecular clues to understand the establishment of plastidendo symbiosis*. Journal of Experimental Botany, v. 62, n. 6, p. 1775–1801, 2011.

BECKER, E. W. (1994). *Microalgae: biotechnology and microbiology*, Cambridge University Press.

BECKER, E. W. *Microalgae as a source of protein*. Biotechnol Adv, v. 25, p. 207–210, 2007.

BOROWITZKA, M. (1988). *Fats, oils and hydrocarbons*. In Microalgal Biotechnology. M. A. Borowitzka and L. J. Borowitzka. Cambridge, UK, Cambridge University Press: pp. 257–287.

BOROWITZKA, M. A. *Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters*. Journal of Biotechnology, v. 70, n. 1–3, p. 313–321, 1999.

BREUER, G., LAMERS, P.P., MARTENS, D.E., DRAAISMA, R.B., WIJFFELS, R.H., 2012. *The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains*. Bioresour Technol. 124, 217–226.

BROWN, M. L.; ZEILER, K. G. *Aquatic biomass and carbon dioxide trapping*. Energy Convers Manage. v.34, p.1005 – 1013, 1993.

CHISTI, Y., 2007. *Biodiesel from microalgae*. Institute of Technology and Engineering, Massey University, Private Bag 11 222, Palmerston North, New Zealand.

COSTA J. A.; RADMANN E. M.; CERQUEIRA V. S.; SANTOS G. C.; CALHEIROS M.N. Perfil de Ácidos Graxos das Microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* Cultivadas em Diferentes Condições. Alim. Nutr., Araraquara. v.17, n.4, p.429-436, 2006.

COURCHESNE, N.M.D., PARISIEN, A., Wang, B. and LAN, C.Q. (2009) *Enhancement of Lipid Production Using Biochemical, Genetic and Transcription Factor Engineering Approaches*. Journal of Biotechnology, 141, 31-41.

ERIKSEN, N. (2008a). *The technology of microalgal culturing*. Biotechnology Letters 30(9): 1525-1536.

GUILLARD, R.R.L. (1975) *Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates*. In: Smith, M.L. and Chanley, M.H., Eds., *Culture of Marine Invertebrates Animals*, Plenum Press, New York, 29-60.

GRIMA, E. M.; FERNADEZ, F. G. A.; CAMACHO, F. G.; CHISTI, Y. *Photobioreactors: light regime, mass transfer and scaleup*. Journal of Biotechnology, v.70, p. 231-247, 1999.

HAKALIN, Neumara Luci Silva. Otimização das condições de cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. para a produção de biodiesel. Dissertação (Doutorado em Biologia Molecular) - Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, 2014.

HALIM, R.; DANQUASH, M.K.; WEBLEY, P.A., 2012. *Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review*. Biotechnology Advances, v. 30, p.709-732.

HENRIKSON, R. *Microalga Spirulina: Superalimento del futuro*. Barcelona: Ediciones S.A. Urano, 1994;

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



IDF (International Dairy Federation) (1986). *Determination of Fat Content-Gravimetric Method* (Reference Method). Standard FIL-IDF 5B: 1986. International Dairy Federation, Brussels, Belgium

KUMAR, K., DASGUPTA, C.N., NAYAK, B., Lindblad, P., Das, D., 2011. *Development of suitable photobioreactors for CO<sub>2</sub> sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria*. *Bioresour Technol.* 102 (8), 4945–4953.

LI, Y. et al. *Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga Pseudochlorococcum sp. (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions*. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 1, p. 123–129, 2011.

LOURENÇO, S. O. *Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações*. 1ed. São Paulo: Rima, p.606, 2006.

MATA, T. M., A. A. MARTINS, et al. (2010). *Microalgae for biodiesel production and other applications: A review.*" *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14(1):217-232.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*: 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

OGBONNA, J. C.; TANAKA, H. *Night biomass loss and changes in biochemical Composition of cells during light/dark clyclic culture of Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v.82, n.6, p.558-564, 1996.

ÖRDÖG, V., STIRK, W.A., BÁLINT, P., STADEN, J. V., LOVÁSZ, C., 2012. *Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed Chlorella minutissima cultures*. *Journal of Applied Phycology*, 24(4):907-914

PIORRECK, M.; BAASCH, K. H.; POHL, P. (1984). *Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of fresh water green and blue-green algae under different nitrogen regimes*. *Phytochemistry*, v. 23, n. 2, p. 207-216.

RICHMOND, A. (2004). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. A. Richmond, Blackwell Science.

SALAZAR, Ivan Alberto Sandoval. *Avaliação da produtividade de biomassa e o conteúdo de óleo da microalga Desmodesmus sp. em diferentes condições de cultivo para aplicações industriais*. Dissertação (Mestrado em Ciências em Tecnologia de

processos químicos e bioquímicos) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2015.

STEIN, J.R. *Handbook of Phycological Methods: culture methods and growth measurements*. Cambridge University, 448p, 1973.

SOUZA, Marcella Fernandes. Acúmulo de amido por *Chlorella sorokiniana* posterior processamento em um contexto de biorrefinaria. Dissertação (Doutorado em Ciências em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2017.

SUBRAMANIAN, S. et al. *Comparative energetic and kinetics of autotrophic lipid and starch metabolism in chlorophytic microalgae: implications for biomass and biofuel production*. Biotechnology for Biofuels, v. 6, n. 1, p. 1, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*: 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

VIEIRA, Tamires de Queiroz. Uso de resíduos líquidos no cultivo da microalga *Chlorella* sp. com potencial para produção de biocombustíveis. Dissertação (Bacharel em Engenharia Sanitária e Ambiental) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências e Tecnologias, 2013.

VONSHAK, A. *Spirulina: growth, physiology and biochemistry*. In *Spirulina platensis* (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology. Vonshak, A. (Ed.), Taylor & Francis, London, 1997, p.43-65.

YAMAMOTO, M. et al. *Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga Chlorella vulgaris (Chlorophyta, Trebouxiophyceae)*. Journal of Plant Research, v. 117, n. 4, p. 257–264, 2004.